



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES DE OPERACIÓN DE BIOFILTROS
MIXOTRÓFICOS DE MATRIZ INMOVILIZADA PARA LA
MAXIMIZACIÓN DE LAS TASAS DE DEPURACIÓN EN SISTEMAS DE
RECIRCULACIÓN ACUÍCOLA.**

Por
PABLO IGNACIO ARANDA JIMÉNEZ

Profesor guía
TERESITA MARZIALETTI BERNARDI

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas para optar al
título de
Ingeniero en Biotecnología Marina y Acuicultura

CONCEPCIÓN - CHILE
SEPTIEMBRE, 2019

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Ingeniería Química en conjunto con la Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.



Profesor Guía:

Dra. Teresita Marzialetti Bernardi
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de Concepción, Concepción

Profesor Co-Tutor:

Ing. Jorge Amador Silva Acosta
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción, Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Teresita Marzialetti Bernardi
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de Concepción, Concepción



Ing. Jorge Amador Silva Acosta
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción, Concepción

Ing. Sergio Rodríguez Leal
Gerente General
Ingeniería y Bionegocios FDM

Coordinador Seminario de Título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción, Concepción

DEDICATORIA

A la Tierra, al mar, a la vida, a la lucha diaria por contribuir, reestablecer y progresar, por hacer de este planeta sabio el cual nos acoge, un lugar de esperanza para la vida.

Se lo dedico también a toda mi familia, principalmente a mis padres Ana y Sergio, a quienes agradezco profundamente por el esfuerzo dado día a día y el apoyo incondicional, a mis hermanos por su paciencia y cariño, a mis tías, primos y a mis amigos, que sin duda su confianza, alegría y sinceridad hicieron esto posible.



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial a mis padres Ana Jiménez Alarcón y Sergio Aranda Mallea, mis hermanos y sobrina, quienes son mi pilar fundamental, son los que me han dado la fuerza y apoyo incondicional para culminar esta etapa. A mi familia y amigos los que han estado a mi lado a lo largo de este proceso.

Agradezco profundamente a quienes contribuyeron de manera fundamental, ya que sin ellos no hubiese sido posible este trabajo, mi profesora guía la Dra. Teresita Marzialetti Bernardi y el profesor Jorge Silva Acosta, por sus críticas, comentarios, consejos y apoyo, los cuales me guiaron para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco también al equipo de trabajo FDM, principalmente a Sergio Rodríguez Leal, los que se hicieron partícipes en este proceso y su apoyo fue clave para la culminación de este trabajo.

Agradecer también al laboratorio de bioprocesos microalgales y a la facultad de Ingeniería Química, ya que gracias a sus dependencias pude llevar a cabo mi investigación.

y por último agradecer a la comisión por acceder a evaluar esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE DE CONTENIDOS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	14
1.1 LA ACUICULTURA Y SU IMPACTO AMBIENTAL	15
1.3 EL USO DE MICROALGAS COMO ORGANISMOS DEPURADORES	19
1.6 INMOVILIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	25
1.7 DISEÑO DE REACTOR	26
1.8 VARIABLES DE OPERACIÓN	27
1.8.1 Luz	27
1.8.2 Tasa de Retención Hidráulica	28
1.8.3 Agitación	28
1.8.4 Transferencia de masa de CO ₂ y O ₂	28
1.8.5 Nutrientes	29
1.8.6 Temperatura	30
1.8.7 pH	30
1.9 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES OPERACIONALES	31
2.0 HIPÓTESIS	33
2.1 OBJETIVO GENERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3.0 MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 PREPARACIÓN DE LOS FOTOBIORREACTORES	35
3.1.1 Sistema de iluminación	37
3.1.2 Sistema termorregulador	38
3.1.3 Sistema hidráulico	39
3.1.4 Sistema de agitación	40

3.1.5 Contención de las esferas	41
3.1.6 Pruebas preliminares	42
3.2 OBTENCIÓN E INMOVILIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	42
3.3 OBTENCIÓN DE LOS VALORES MÁXIMOS Y MÍNIMOS DE LAS VARIABLES OPERACIONALES.	43
3.3.1 Tasa de retención hidráulica	43
3.3.2 Agitación	44
3.3.3 Irradiancia	44
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	45
3.6 EXPERIMENTACIÓN PRELIMINAR	46
3.7 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE DEPURACIÓN	46
4.0 RESULTADOS	48
5.0 DISCUSIÓN	70
6.0 CONCLUSIÓN	77
REFERENCIAS	78
ANEXOS	82



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama básico del ciclo de tratamiento de agua en un sistema de recirculación acuícola (RAS).	14
Figura 2 Esquema representativo del consorcio entre microalgas y bacterias con agua residual como medio de cultivo.	17
Figura 3 Esquema general del sistema, incluye los tres fotobiorreactores acoplados al intercambiador de calor, al sistema de iluminación y al de agitación. Se muestra los flujos de agua, aire y electricidad en azul, gris y rojo, respectivamente. FR corresponde al flujómetro ubicado justo después de la válvula de bola y antes del ingreso de agua al reactor.	31
Figura 4 Sistema de iluminación ubicado dentro del reactor, unido al sistema de aireación.	33
Figura 5 Sistema termoregulador equipado con el Chiller con monitoreo de la temperatura, equipo ubicado a la derecha de esta imagen, y a la izquierda se encuentra el sistema de intercambio de calor ubicado dentro de la caja de plumavit.	34
Figura 6 A la izquierda, sistema de acumulación de aire que dirige el aire hacia la tubería del sistema de iluminación que, además, está asociado al sistema de aireación que culmina en el difusor el cual entrega las burbujas al sistema como se muestra en la imagen de la derecha.	35
Figura 7 A la izquierda, sistema de contención de biomedios durante el funcionamiento del reactor. A la derecha, sistema de contención de biomedios, desde una perspectiva transversal.	36
Figura 8 Evolución de la concentración del nitrógeno amoniacal en el tiempo para los 17 experimentos	44
Figura 9 Evolución de la concentración de nitrato para los 17 experimentos realizados en 17 horas de experimentación	45
Figura 10 Curvas de comportamiento de fosfato para los 17 experimentos realizados en las 17 horas de experimentación	46
Figura 11 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 4 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).	48
Figura 12 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 4 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).	49
Figura 13 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 4 horas a una irradiancia máxima (30000 LUX).	49
Figura 14 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO3 a las 4 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).	51
Figura 15 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO3 a las 4 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).	51
Figura 16 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO3 a las 4 horas, a una irradiancia máxima (30000 LUX).	52

Figura 17 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO ₄ a las 4 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).	53
Figura 18 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO ₄ a las 4 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).	53
Figura 19 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO ₄ a las 4 horas, a una irradiancia máxima (30000 LUX).	54
Figura 20 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 6 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).	55
Figura 21 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 6 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).	55
Figura 22 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 6 horas a una irradiancia máxima (30000 LUX).	56
Figura 23 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO ₃ a las 6 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).	57
Figura 24 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO ₃ a las 6 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).	57
Figura 25 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO ₃ a las 6 horas, a una irradiancia máxima (30000 LUX).	58
Figura 26 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO ₄ a las 6 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).	59
Figura 27 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO ₄ a las 6 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).	59
Figura 28 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO ₄ a las 6 horas, a una irradiancia máxima (30000 LUX).	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ventajas y desventajas de los distintos tipos de fotobiorreactores de cultivo de microalgas.	18
Tabla 2 Valores máximos y mínimos de las variables operacionales estudiadas en esta investigación.	39
Tabla 3 Matriz del diseño experimental definida por el programa Modde v12.0.	42
Tabla 4 Valores de las tasas de depuración (mg L-1h-1) para cada uno de los experimentos a las 4, 6 y 17 horas	47
Tabla 5 Esta tabla indica los valores de algunas de las variables que se controlaron durante la fase experimental.	
Tabla 6 Esta tabla indica las concentraciones promedio junto a su desviación estándar de los nutrientes amonio, nitrato y fosfato, en función de los días de experimentación	71
Tabla 7 ANOVA 4 Horas	72
Tabla 8 ANOVA 6 Horas	73



RESUMEN

El acelerado crecimiento que ha tenido la industria salmonera en Chile, ha generado el incremento de las emisiones de contaminantes hacia el medio acuático. Es por esta razón que la industria se ve obligada a buscar alternativas para reducir su impacto al ambiente acuático. Actualmente la tendencia de la industria se basa en utilizar sistemas de recirculación acuícola (SRA), sin embargo, esta no es la única tecnología existente, en los últimos años se han estudiado los biofiltros mixotróficos, que comprenden microalgas y bacterias en una simbiosis que resulta en una mayor eficiencia en la remoción de contaminantes presentes en el agua. El cultivo de estos microorganismos es llevado a cabo en fotobiorreactores los cuales son capaces de controlar las condiciones de cultivo, tales como luz, temperatura, pH, agitación, nutrientes e intercambio gaseoso (CO_2 y O_2). Estas condiciones de cultivo o también denominadas variables de operación, en los niveles adecuados que requieren los microorganismos, permitirán al fotobiorreactor alcanzar su máximo rendimiento de remoción de nutrientes

El objetivo de esta investigación es optimizar las variables de operación de un fotobiorreactor de columna para maximizar las tasas de depuración de nutrientes utilizando como medio de cultivo, agua residual proveniente de un sistema de recirculación acuícola. Las variables operacionales que se estudiaron en esta investigación fueron la irradiancia, agitación por aire y agitación por agua. Las variables respuesta fueron las tasas de depuración de amonio, nitrato y fosfato. Esto fue posible estudiarlo mediante la construcción de un sistema de fotobiorreactores, fabricados de modo que permitieran controlar las variables operacionales. Las tasas de depuración fueron obtenidas a partir de las pendientes de las curvas de concentración cuantificada por medio de un espectrofotómetro. Para llevar a cabo esta optimización se utilizó un diseño de cara central compuesta (CCF), que permitió obtener el diseño experimental, el cual fue la base para llevar a cabo los experimentos y conocer los valores que fueron capaces de maximizar las tasas de depuración de estos nutrientes. Los resultados obtenidos de esta investigación, no permitieron validar el modelo estadístico a causa de la alta dispersión de los datos. Sin embargo, sí fue posible determinar los rangos óptimos donde se maximizan las tasas de depuración mediante las gráficas de superficie de respuesta, que para el caso del amonio son: irradiancia 500-15250 LUX, caudal de aire 2-4 L/min y el caudal de agua 2,2-5 L/min. Para el caso del nitrato los rangos óptimos son irradiancia 15250 LUX, caudal de aire 0 L/min y caudal de agua 1-3 L/min. Por último, el fosfato posee su rango óptimo con irradiancia 500-1520 LUX, caudal de aire 2-4 L/min y caudal de agua 1,5-3,5 L/min. El hecho de que el modelo estadístico aplicado no fuese válido indica que no hay una variable operacional en particular, que tenga mayor influencia por sobre las otras variables; Esto quiere decir que las variables operacionales estudiadas se encuentran

íntimamente interrelacionadas entre sí, ya que no fue posible determinar si existían diferencias significativas entre ellas.

Palabras clave: Biofiltros mixotróficos, microorganismos, tasas de depuración, variables operacionales, variables respuesta, superficie de respuesta, optimización.

ABSTRACT

The accelerated growth that has had the salmon industry in Chile, has generated the increase in emissions of pollutants into the aquatic environment. It is for this reason that the industry its forced to seek alternatives to reduce its impact on the aquatic environment. Currently, the industry trend is based on using aquaculture recirculation systems (SRA), however, this is not the only existing technology, in recent years mixotrophic biofilters have been studied, comprising microalgae and bacteria in a symbiosis that results in a greater efficiency in the removal of contaminants present in the water. The cultivation of these microorganisms is carried out in photobioreactors which are capable of controlling the culture conditions, such as light, temperature, pH, agitation, nutrients and gas exchange (CO₂ and O₂). These culture conditions or also called operating variables, at the appropriate levels required by the microorganisms, will allow the photobioreactor to reach its maximum nutrient removal performance.

The objective of this research is to optimize the operation variables of a column photobioreactor to maximize nutrient clearance rates using, as a culture medium, wastewater from an aquaculture recirculation system. The operational variables studied in this investigation were irradiance, air agitation and water agitation. The response variables were the clearance rates of ammonium, nitrate and phosphate. This was possible to study through the construction of a system of photobioreactors, manufactured in a way that allowed control of operational variables. The purification rates were obtained from the slopes of the quantified concentration curves by means of a spectrophotometer. To carry out this optimization, a composite central face design (CCF) was used, which allowed us to obtain the experimental design, which was the basis for carrying out the experiments and knowing the values that were able to maximize the purification rates of these nutrients. The results obtained from this research did not allow the statistical model to be validated due to the high dispersion of the data. However, it was possible to determine the optimum ranges where the purification rates are maximized by means of the response surface graphs, which in the case of ammonia are: irradiance 500-15250 LUX, air flow 2-4 L / min and the water flow 2,2-5 L / min. In the case of nitrate, the optimum ranges are irradiance 15250 LUX, airflow 0 L / min and water flow 1-3 L / min. Finally, phosphate has its optimum range with irradiance 500-1520 LUX, airflow 2-4 L / min and water flow

1.5-3.5 L / min. The fact that the statistical model applied was not valid indicates that there is no particular operational variable that has a greater influence over the other variables; This means that the operational variables studied are intimately interrelated, since it was not possible to determine if there were significant differences between them.

Keywords: Mixotrophic biofilters, microorganisms, purification rates, operational variables, response variables, response surface, optimization.



1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura en los últimos años ha tenido tal crecimiento, que se ha llegado a posicionar como la tercera actividad económica del país. Sin embargo, este crecimiento conlleva a una serie de impactos ambientales que tiene importantes efectos negativos en el ambiente donde se desarrolla la actividad. Dentro de los impactos más destacables se encuentra la eutrofización de ecosistemas acuáticos, cambios en la biodiversidad, mortalidades y acumulación de químicos tóxicos, además del uso intensivo de agua.

La acumulación de los nutrientes producidos por la actividad, corresponde al problema más grande que posee esta industria. Actualmente se utilizan los sistemas de recirculación acuícola (RAS), cuyo objetivo es limpiar para reutilizar el agua del cultivo, haciendo pasar el agua por distintos procesos que permiten que el agua se purifique para así, volver a utilizarla.

Las microalgas y bacterias en simbiosis han demostrado ser eficientes depuradores de nutrientes en RILes, y más aún cuando se encuentran inmovilizadas en una matriz polimérica. El hecho de encontrarse inmovilizada en una matriz, permite una separación simple y económica del agua libre de contaminantes y la biomasa. Estos microorganismos son cultivados en fotobiorreactores, donde se controlan las condiciones de cultivo o variables de operación.

El control de estas condiciones de cultivo o variables de operación, resulta de vital importancia, ya que conociendo cuáles son los valores de cada variable de operación, donde se obtiene la mayor tasa de depuración de nutrientes, se puede replicar éste tipo de fotobiorreactor sin necesidad de realizar una gran cantidad de pruebas de las distintas condiciones, para llegar a la condición de cultivo ideal en la que se depure la máxima cantidad de nutrientes.

Este tipo de biofiltración en este tipo de sistemas de cultivo, permite no solo la depuración de contaminantes del agua, sino que también, produce biomasa, la cual ha sido vastamente estudiada, junto a sus potenciales usos y aplicaciones biotecnológicas donde se puede realizar economía circular sustentable a partir de la filtración de aguas contaminadas de la industria salmonera.

1.1 LA ACUICULTURA Y SU IMPACTO AMBIENTAL

La acuicultura es una actividad productiva que ha sufrido un importante crecimiento durante las últimas dos décadas. El caso particular de Chile, ha sido tal el crecimiento que se ha llegado a posicionar como el segundo productor mundial de salmones y primero en truchas del mundo (FAO, 2018). Parte del éxito económico que ha tenido Chile en materia del cultivo de salmónidos se debe a la calidad de las aguas y a las condiciones ambientales favorables que se dan en el sur de nuestro país, en comparación a otras regiones del hemisferio norte donde también se practica esta actividad (Buschmann & Fortt, 2005).

El incremento de esta actividad ha producido un aumento en las emisiones de contaminantes hacia el medio ambiente, ya que las operaciones de acuicultura, y especialmente las de salmonicultura, generan una amplia variedad de desechos que contienen materia orgánica disuelta y particulada que es necesario tratar y, posteriormente, eliminar (Oladoja, Adelagun, Ahmad, & Ololade, 2017). Dentro de los contaminantes vertidos al ambiente, es posible destacar el carbono en forma de dióxido de carbono (CO_2), los compuestos nitrogenados como el amoníaco (NH_3), amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), y por último el fósforo que se encuentra en forma de fosfatos (PO_4^{3-}) (Crab et al., 2007). La acumulación de estos contaminantes en el medio acuícola puede provocar problemas a corto plazo como eutrofización del medio, disminución del oxígeno, aumento de patógenos, mortalidad de organismos tanto en el cultivo como fuera de éste, y también otros a largo plazo como la acumulación de químicos tóxicos y perturbación de la biodiversidad del sistema (Jones, Freeman, & Sánchez-Rodríguez, 2016). Tanto como para el funcionamiento básico del centro de cultivo como para solucionar problemas asociados a la acumulación de éstos contaminantes, se vuelve necesario el uso de aportes externos, como la adición de oxígeno, alimento, antibióticos, energía y alta demanda de agua (Bartoli et al., 2005).

El aprovechamiento de recursos hídricos en la acuicultura está relacionado directamente con el tipo de cultivo o especie que se desarrolle. Si bien, se podría hacer una separación de forma general entre los productos de origen marítimo (como

crustáceos, algas y moluscos) y los de agua dulce (como son principalmente, salmón y trucha arco iris), éstos últimos se desarrollan en un ambiente acuícola mixto. Es en éste último grupo donde se presentan las más altas demandas de agua, debido a sus elevados volúmenes productivos, además de representar el 46% del total de centros de acuicultura inscritos en el país. Estas demandas corresponden al uso de recursos superficiales, a través del ejercicio de derechos de aprovechamiento de tipo consuntivo, principalmente en el sur de nuestro país.

1.2 EL CAMINO HACIA LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE

La creciente escasez de los recursos hídricos, la gestión para el control de la contaminación del medio ambiente y la sanidad de los centros de cultivo, son algunos de los motivos por los cuales la acuicultura ha estado mejorando sus prácticas de descontaminación desarrollando nuevas tecnologías para llegar a la producción sustentable. Estas tecnologías se basan principalmente en la reducción del volumen de agua utilizada y la reducción de los contaminantes emitidos al medio acuático (Hepp, C., 2012; Sánchez I. et al., 2016). Una de las alternativas adoptadas actualmente por la salmonicultura son los sistemas de recirculación acuícola (RAS o RSA), que son un conjunto de procesos y componentes que se utilizan para el cultivo de organismos acuáticos, donde el agua es continuamente acondicionada y re-utilizada teniendo como ventaja el uso racional del agua ya que el volumen de recambio es menor al 10% diario del volumen total del sistema (Jiménez., 2006).

Los sistemas RAS permiten el monitoreo y control constante de los parámetros fisicoquímicos del agua permitiendo la producción continua a lo largo del año; además, manteniendo los parámetros fisicoquímicos adecuados, se puede tener mejores tasas de crecimiento y conversión alimentaria de los organismos cultivados (Jiménez., 2006). Sin embargo, si el sistema de recirculación de agua no cumple con su función depuradora, los compuestos nitrogenados y compuestos de fosfato comenzarán a acumularse dentro del sistema quedando a libre exposición de los organismos cultivados o bien el sistema no podrá utilizarse de la manera intensiva para la cual se utilizan estos sistemas. Estos contaminantes al acumularse pueden

alcanzar concentraciones letales y subletales que afectan ciertas funciones del organismo, tales como la actividad nerviosa, capacidad natatoria, funciones musculares, crecimiento y apetito (Grobler & Wood, 2018). Además, su acumulación genera toxicidad, lo que provoca una disminución de la tasa de crecimiento de los peces, aumento de la mortalidad de huevos, larvas e incluso deformidades esqueléticas en los peces (Davidson, et al., 2011). En la figura (1) se muestra el diagrama básico de un sistema de recirculación acuícola cuyos componentes son la filtración mecánica, filtración biológica, oxigenación, desinfección UV y desgasificación.

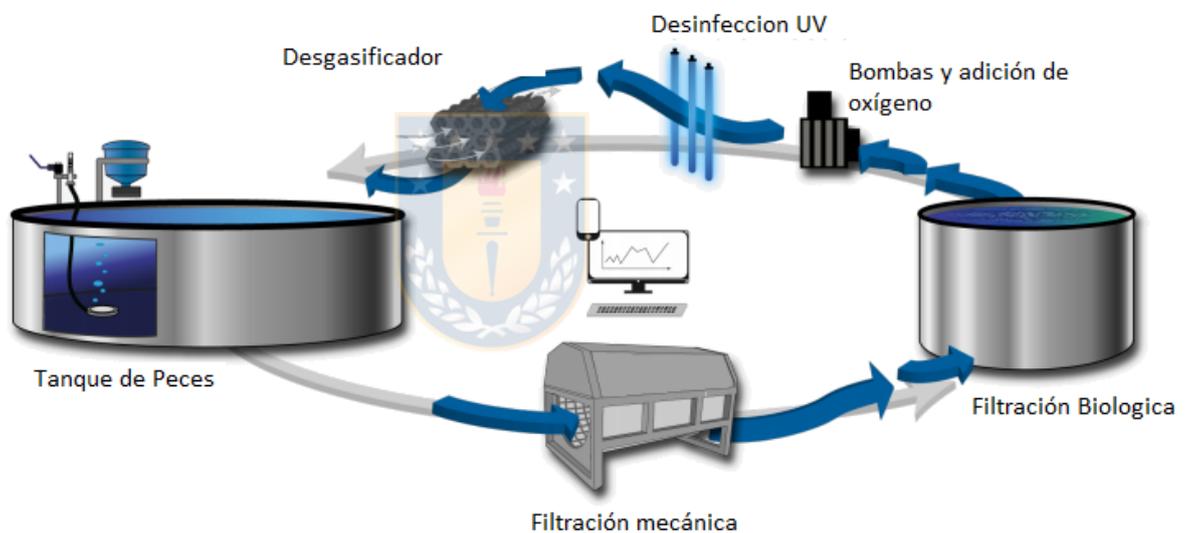


Figura 1. Diagrama básico del ciclo de tratamiento de agua en un sistema de recirculación acuícola (RAS).

Considerando las complicaciones asociadas a los altos niveles de nutrientes en el sistema, es de crucial importancia abatir la acumulación de estos. Esta situación convierte a la biofiltración en un proceso indispensable para lograr la disminución de nutrientes como contaminantes en el sistema. La depuración del agua en los sistemas de recirculación acuícola funciona removiendo los desechos sólidos y metabólicos que son originados por la comida no consumida, y las pérdidas fecales y no fecales de los peces (Ramli, et al., 2017). El correcto uso de los biofiltros permite mantener las

condiciones de cultivo a bajos niveles de nutrientes, lo cual se traduce en la posibilidad de aumentar la densidad del cultivo y lograr mayores cosechas.

Los biofiltros basan su funcionamiento en un sistema de biorreactores en línea que se alimentan con el flujo de agua desde el mismo sistema de cultivo, y donde también se cultivan bacterias aeróbicas reductoras de nitrógeno, que remueven el amonio (NH_4^+) en un proceso de dos pasos denominado nitrificación. El primer paso de este proceso es la nitrificación como tal, donde el amonio tóxico es oxidado a nitrito (NO_2^-) por bacterias del género *Nitrosomonas* sp.; el segundo paso corresponde a cuando el nitrito (NO_2^-) es oxidado por bacterias del género *Nitrobacter* sp. a su forma menos tóxica, el nitrato (NO_3^-). La desnitrificación puede llevarse a cabo también por bacterias anaeróbicas, lo cual cambiaría las condiciones del biofiltro. Estas dos etapas normalmente ocurren de manera simultánea (El-Sheshtawy et al., 2017). Si no hay organismos capaces de remover el nitrato del sistema, este nutriente se acumula junto con otros desechos metabólicos como los fosfatos y el dióxido de carbono que no son removidos por el sistema de biofiltración.

Los inconvenientes asociados a los biofiltros incluyen problemas de oxígeno disuelto para las bacterias desnitrificantes, aporte extra de oxígeno para las bacterias nitrificantes y nitrificantes, acumulación de materia orgánica y dificultad de retro enjuague. Las bacterias ocupadas en los biofiltros actuales son ion 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 energía utilizada para depurar otros compuestos presentes en el agua residual (Mook et al., 2012). Existen distintas configuraciones de biofiltros y según las necesidades de cada sistema de cultivo es que se escoge una configuración para tratar el agua del sistema de recirculación. Sin embargo, este método no es el único mecanismo existente para la remoción de nutrientes, siendo la mejor alternativa para eliminar los nutrientes de desecho de los RAS es exponerlos a un organismo que requiera toda la gama de nutrientes producidos por estos sistemas de recirculación acuícola (Rodríguez S., 2018). La ósmosis inversa y la tecnología electroquímica también remueven compuestos nitrogenados, pero a un alto costo de operación, ya que estas tecnologías

requieren de una mayor cantidad de energía externa (Mook et al., 2012). Otros mecanismos de remoción de nutrientes, pueden ser mediante filtros hidropónico que utilizan plantas vasculares, también existe el tratamiento de aguas residuales utilizando macroalgas y microalgas, las cuales últimamente se han utilizado ampliamente para este fin.

1.3 EL USO DE MICROALGAS COMO ORGANISMOS DEPURADORES

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos unicelulares capaces de asimilar el nitrógeno inorgánico, el fósforo, y otros componentes xenobióticos presentes en el agua de RAS, resultan una alternativa viable para este proceso. El tratamiento de aguas con microalgas asegura la eliminación de nutrientes como fosfato y diversas formas de nitrógeno (nitrato, nitrito y amonio), además de ser capaz de reducir la demanda química y biológica de oxígeno, DQO y DBO, respectivamente (Leyva et al., 2016). El uso de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales tiene como resultado principal, la depuración del agua y como consecuencia de esto se genera una biomasa microalgal que ha sido intensivamente estudiada en los últimos años. Esta biomasa microalgal generada, posee múltiples usos y aplicaciones tales como la obtención de biodiesel, bioetanol, biometano, biohidrógeno, biofertilizantes, producción de calor y electricidad, productos comerciales en nutrición, salud y cosméticos (Santos Montes, González-Arechavala, Martín-Sastre, 2014). El uso de las microalgas para tratamiento de aguas residuales, y el posterior uso de la biomasa generada resulta ser una de las alternativas más atractiva, sustentable y prometedoras (Whitton et al., 2018).

Actualmente se utiliza el concepto de consorcio microalga-bacteria, que es la base ecológica para la depuración natural del agua. En esta simbiosis entre la microalga y las bacterias, se aprovecha de la actividad fotosintética de la microalga para producir el oxígeno que las bacterias heterotróficas necesitan para degradar los contaminantes orgánicos. En este proceso se libera CO₂ por la respiración bacteriana y luego es asimilado por las microalgas durante la fotosíntesis. Esta sinergia entre microalgas y

bacterias permite la oxidación y descomposición de la materia orgánica por bacterias aerobias que producen nitrógeno amoniacal además de fosfato y dióxido de carbono. Estos nutrientes son utilizados por las microalgas, junto con la luz como fuente de energía, para sintetizar fotosintéticamente biomasa celular. En este proceso se libera oxígeno el cual permite a las bacterias continuar la descomposición de la materia orgánica (Ji, Jiang, Zhang, Jiang, & Zheng, 2017). Esta sinergia entre microalgas y bacterias permite la utilización costo-efectiva de ciertos aportes externos al sistema, como es el caso del oxígeno, que no es necesario incorporarlo externamente ya que el oxígeno es producido por las mismas microalgas. Es importante mencionar que la capacidad de remoción de contaminantes es mayor utilizando esta sinergia entre microalgas y bacterias, en comparación a si se utiliza cada organismo por sí solo (Shen et al., 2017). En este trabajo, llamaremos biomasa al consorcio microalga-bacteria que se cosecha de los biofiltros luego de cumplir su ciclo de operación.

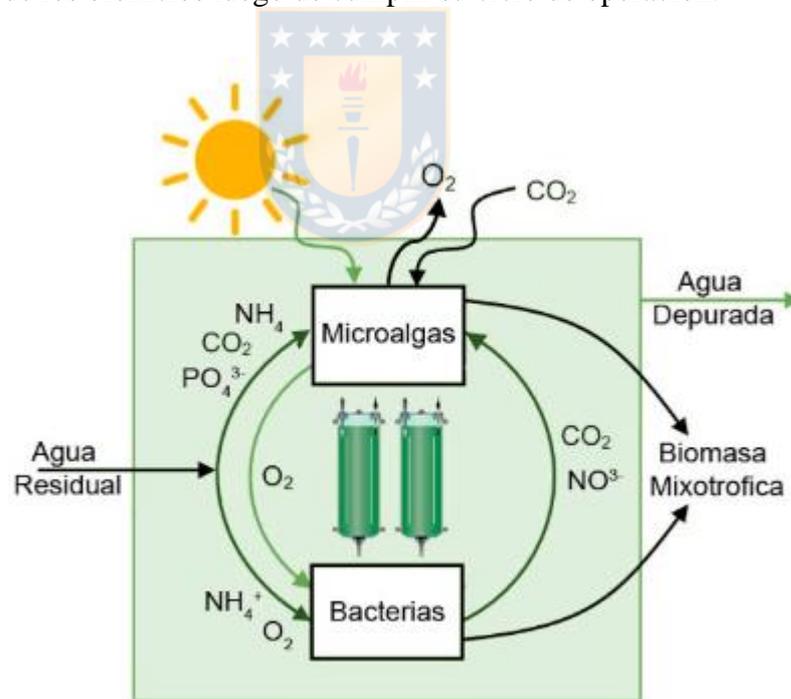


Figura 2 Esquema representativo del consorcio entre microalgas y bacterias con agua residual como medio de cultivo.

1.4 CULTIVO DE MICROALGAS

En el cultivo de microalgas se tiene una gran variedad de sistemas de cultivo. La elección de éste sistema dependerá de las características de la microalga y su requerimiento nutricional, condiciones de cultivo y la finalidad del cultivo. Existen dos grandes categorías para caracterizar estos sistemas de cultivo, los cuales corresponden a sistemas de cultivo abierto y sistemas de cultivo cerrado. Estos sistemas pueden ser construidos al aire libre o en espacios cerrados como laboratorios y pueden ser de configuración cilíndrica, con membrana, columna de burbuja, tubulares, entre otros. Su principal desventaja es el alto costo de capital que conlleva su instalación y manejo (Vo et al., 2019).

Algunas de las ventajas más destacables de los sistemas de cultivo abierto, se refiere a que poseen un diseño simple, bajo costo de instalación, mantenimiento y operación; la principal desventaja que poseen este tipo de sistemas, es la contaminación microbiana que se produce porque los estanques están abiertos a la atmósfera, permitiendo el crecimiento de especies indeseadas de microalgas u otros organismos. Además, posee pérdidas de agua por evaporación, dependencia de las condiciones climáticas como falta de luz o cambios de temperatura, requerimiento de grandes espacios y baja productividad (Vo et al., 2019). Es por esta razón que los sistemas cerrados como los fotobiorreactores son la opción más viable para evitar todas estas problemáticas que conllevan el uso de sistemas abierto. Las principales ventajas y desventajas de cada uno de los tipos de fotobiorreactores se muestran en la tabla (1), donde también se detallan los distintos beneficios que posee cada sistema de cultivo.

1.5 FOTOBIORREACTORES

Los fotobiorreactores tienen la ventaja de generar baja probabilidad de contaminación con microorganismos no deseados y favorecer los monocultivos ya que se pueden controlar con mayor facilidad en comparación a los cultivos en estanques abiertos. Los fotobiorreactores se caracterizan por poseer eficientes y robustas técnicas de cultivo, los cuales son capaces de crear un ambiente artificial donde se proveen las condiciones necesarias, como la luz, la temperatura, los nutrientes y el proceso de homogeneización. El diseño de estos fotobiorreactores debe realizarse en base a las condiciones de cultivo y pueden ser construidos al aire libre o en espacios cerrados, también pueden encontrarse tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial. Estos sistemas de cultivo pueden ser de configuración cilíndrica, con membrana, columna de burbuja, tubulares, entre otros. Su principal desventaja es el alto costo de capital que conlleva su instalación y manejo (Vo et al., 2019).



Tabla 1 Ventajas y desventajas de los distintos tipos de fotobiorreactores de cultivo de microalgas.

Tipo de Fotobiorreactor	Ventajas	Desventajas
Fotobiorreactor de cara plana	<ul style="list-style-type: none"> ● Amplia cobertura de luz ● Permite el cultivo en exterior ● Alto rendimiento de biomasa ● Configuración modular 	<ul style="list-style-type: none"> ● Requiere disponibilidad de espacio y tierra ● Efecto fotoinhibición ● Formación de zonas oscuras ● Alto costo en construcción y energía
Fotobiorreactor de columna	<ul style="list-style-type: none"> ● Alta transferencia de masa ● Buena mezcla ● Compacto y fácil de operar ● Buen Hold-Up del gas ● Potencialmente escalable ● Mejor exposición a ciclos luz/oscuridad ● Fácil de escalar ● Problemas de fouling menores 	<ul style="list-style-type: none"> ● Baja cobertura de iluminación, se prefiere iluminación interna ● Es más caro que los sistemas abiertos ● Materiales sofisticados ● Problemas en la iluminación al escalar
Fotobiorreactor tubular	<ul style="list-style-type: none"> ● Alta cobertura de iluminación ● Adecuada para el exterior ● Fácil de construir, mantener y limpiar ● Alta transferencia de masa ● Bajo consumo energético 	<ul style="list-style-type: none"> ● Gradiente de pH ● Efecto fouling ● Requieren grandes áreas ● Sobre calentamiento ● Alto costo operacional
Fotobiorreactor Soft-frame	<ul style="list-style-type: none"> ● Flexible ● Plegable ● Reemplazable ● Requiere poco espacio 	<ul style="list-style-type: none"> ● Material dañable ● Dificultad en control de temperatura ● Mezclado insuficiente ● Fouling
Fotobiorreactores híbridos	<ul style="list-style-type: none"> ● Tamaño pequeño del reactor ● Operable en alta dilución ● Biomasa rica en carbohidratos y bajo en proteínas ● Bajo costo operación y mantenimiento 	<ul style="list-style-type: none"> ● Fouling ● Balance de energía negativo

Fuente: H.N.P. Vo et al., 2019

Los fotobiorreactores de columna resultan ser una de las opciones que mejor se adapta a la depuración de aguas residuales, ya que es posible controlar mejor las variables operacionales. Además, este tipo de fotobiorreactores posee una gran capacidad de transferencia de masa en la fase gas-líquida (Pham et al. 2017). Un fotobiorreactor de columna vertical está formado por tubos verticales (vidrio o acrílico) que son transparentes para permitir la transferencia de la luz al cultivo autótrofo de microalgas. Un sistema de difusor de aire se instala en la parte inferior del reactor convirtiendo el gas de entrada en pequeñas burbujas, lo que proporciona una fuerza impulsora para la mezcla y la transferencia de masa de CO₂, además de eliminar el O₂ producido durante la fotosíntesis. Normalmente no se implementa ningún sistema de agitación física en el diseño del fotobiorreactor de columna vertical porque la agitación se logra con el aire. Los fotobiorreactores tubulares verticales se pueden dividir en una columna de burbujas y un reactor de transporte aéreo en función de sus patrones de flujo de líquido dentro del fotobiorreactor (Yen, Hu, Chen, & Chang, 2013).

Los fotobiorreactores de columna son recipientes cilíndricos con una altura mayor que el doble del diámetro. Se caracterizan por su bajo costo de capital, alta relación entre el área superficial y el volumen, ausencia de partes móviles, buena transferencia de masa y de calor, homogéneo ambiente de cultivo, y eficiente liberación de O₂ y de mezcla de gases residuales. El aire burbujea hacia arriba desde el difusor que proporciona la homogeneización del cultivo y la transferencia de gases. Por lo que el diseño del difusor resulta ser crítico en el rendimiento de la columna de burbuja. El suministro de luz para el cultivo autótrofo normalmente proviene del exterior de la columna. Sin embargo, el diseño de la iluminación interna es aceptable debido a su mayor eficiencia en la penetración y distribución de la luz (Yen, Hu, Chen, & Chang, 2013). Para utilizar un fotobiorreactor de columna es necesario primero diseñarlo, teniendo en consideración las condiciones de cultivo que se quieren controlar para mejorar su eficiencia.

Una de las principales complicaciones en el cultivo de microalgas a gran escala es la dificultad para recuperar o cosechar la biomasa producida, ya que se requiere una gran cantidad de energía o la adición de compuestos coagulantes o floculantes, incluso

métodos de variación del pH, para separar la biomasa del agua. Estos compuestos pueden interferir en las características de los subproductos que se pueden obtener de la biomasa, sobre todo si se desea utilizar posteriormente. El proceso de recuperación o cosecha de la biomasa, ya sea para la transformación a materiales de valor comercial, para el tratamiento de aguas residuales o para la captura de CO₂, es, de hecho, el paso más complejo y costoso del sistema hasta la actualidad. Entre los métodos que actualmente se utilizan para la recuperación de la biomasa se encuentran la centrifugación, sedimentación, filtración, flotación y floculación (Hernandez & Labbé., 2014).

1.6 INMOVILIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

La inmovilización de microorganismos resulta ser un tema actual en el campo de la biotecnología. Si bien la mayoría de los estudios realizados corresponden a bacterias, estudios recientes se han enfocado en la inmovilización de microorganismos fotosintéticos como las microalgas (Kandilian, Jesus, Legrand, Pilon, & Pruvost, 2017). La inmovilización de las microalgas ha sido reportada como una efectiva técnica de adecuación de biomedios que ha demostrado aumentar la remoción de nutrientes como contaminantes del medio acuático, si se los compara con un sistema de depuración en cultivos disueltos. Según Ramli et al. (2017), las microalgas inmovilizadas también permiten una mayor producción de biomasa y una mayor producción de clorofila. Se sugiere que cuando las microalgas se encuentran inmovilizadas en una matriz, por ejemplo, de alginato, se encuentran mayormente protegidas de factores de estrés y utilizan la energía normalmente disponible para su sobrevivencia, para alimentarse y crecer; contrario a lo que ocurre con las microalgas disueltas en el medio. En este caso, se encuentran expuestas al factor de estrés, que las obliga a dividir la energía disponible tanto para sobrevivir como para alimentarse (Ramli, Giatsis, Yusoff, Verreth, & Verdegem, 2018). Además, se ha demostrado que las microalgas inmovilizadas favorecen el proceso de cosecha de la biomasa, sin presentar diferencias con aquellas libres en la cantidad y calidad de proteínas y lípidos, ni en la actividad fotosintética (Hernández & Labbé., 2014).

1.7 DISEÑO DE REACTOR

El principio fundamental del diseño de fotobiorreactores es la alta relación entre área superficial y el volumen con el fin de utilizar eficientemente la energía lumínica, la cual es requisito para obtener una alta conversión de fotones. Mayores eficiencias fotosintéticas pueden resultar en alta productividad y concentración de la biomasa. El diseño del reactor se basa en los requerimientos y limitaciones que poseen las microalgas ante diferentes factores. Al seleccionar una configuración determinada de fotobiorreactor se busca entregar las mejores condiciones de cultivo para promover el crecimiento óptimo de las células (Quiñones J., 2017). Los fotobiorreactores utilizan técnicas robustas y eficientes para crear un ambiente artificial, que sea capaz de proveer las condiciones esenciales como la temperatura, luz, nutrientes y la homogeneización para el crecimiento microalgal (Gao et al., 2016). En el diseño de un fotobiorreactor eficiente, la penetración de la luz y la difusión al interior del reactor son los factores dominantes, pero también se espera obtener de una distribución homogénea del fluido, buena transferencia de masa, y una temperatura y pH favorables que mejoren el crecimiento microalgal (Huang et al., 2017).

Estas condiciones de cultivo, también denominadas variables o factores de operación, son las encargadas de brindar las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de la actividad. Sin embargo, hay factores que impactan más sobre el rendimiento de los fotobiorreactores como el diseño del biorreactor, el medio de cultivo, la temperatura y el pH del medio, los microorganismos utilizados, el mezclado asociado a la transferencia de materia, acumulación de O₂, intensidad lumínica y ciclos de luz/oscuridad. Dentro de los parámetros fundamentales para el cultivo de microalgas se encuentran la disponibilidad de luz y la transferencia de masa en la interfase (García JC & López GL., 2018).

1.8 VARIABLES DE OPERACIÓN

En función de lo anterior, las variables de operación claves en el desarrollo de las microalgas bajo condiciones fototróficas incluyen: irradiación lumínica, temperatura, pH, concentración de CO₂, retención hidráulica y aireación. Las microalgas y bacterias, por su calidad de organismos sensibles a las condiciones ambientales, se afectan por las condiciones ambientales que se les aplique. A continuación, se describen las variables de operación seleccionadas como significativas en consorcios microalga-bacteria.

1.8.1 Luz

Las microalgas pueden crecer bajo condiciones autotróficas, heterotróficas, mixotróficas y heterótrofas, sin embargo, todas las microalgas son fotoautótrofas y son capaces de utilizar la luz como su única fuente de energía para la síntesis de biomasa y metabolitos de interés. La fuente de luz puede ser proveniente del sol o de una fuente de luz artificial. Las fuentes de luz artificial son estables y controlables, y son fácilmente integradas en los diseños de fotobiorreactores. Sin embargo, existen aspectos que pueden influenciar en el correcto funcionamiento del fotobiorreactor, éstos aspectos pueden ser tanto; el tipo de luz, la longitud de onda, la intensidad de luz y distribución de ésta, entre otros (Blanken, Cuaresma, Wijffels, & Janssen, 2013).

La elección del tipo de fuente de luz debe considerar el balance entre lo económico y los requerimientos de los productos o servicios finales. El uso de luz artificial ha sido probado por varios autores que consideran que resulta una buena opción cuando se opera a escalas piloto y de laboratorio; sin embargo, a escala industrial sigue siendo más costo-efectivo utilizar la luz solar (Wang, Stiles, Guo, & Liu, 2014). La distribución y la intensidad de la luz es crucial dentro de un fotobiorreactor debido a la absorción y dispersión en el cultivo; la atenuación de la radiación es dependiente de la longitud de onda de la luz, concentración celular, geometría del fotobiorreactor y de la distancia de penetración de la luz. Es bien sabido

que la intensidad lumínica disminuye al aumentar la longitud del camino recorrido, es decir el diámetro del reactor, y al aumentar la concentración de biomasa.

El efecto de la intensidad de luz en el crecimiento fotoautotrófico de microalgas puede ser clasificado en fases, las que se separan en la fase de limitación, la fase de saturación de luz y la fase de inhibición por luz. Para maximizar el rendimiento del cultivo, la intensidad de la fase de saturación por luz debe ser distribuido homogéneamente en todo el sistema de cultivo (Yen et al., 2013).

1.8.2 Tasa de Retención Hidráulica

La tasa de retención hidráulica, por definición, corresponde al tiempo en que un líquido permanece en un recipiente determinado; bajo este concepto, la tasa de retención hidráulica corresponde al tiempo en que el agua residual estará en contacto con los biomedios que contienen a los microorganismos. Para lograr que los fotobiorreactores funcionen adecuadamente y sean eficientes como tratamiento de la carga orgánica de aguas residuales, el proceso debe considerar cierto tiempo de retención hidráulica (TRH) y utilizar el sistema en continuo iniciando como batch o semicontinuo (Boonchai, Seo, Park, & Seong, 2013).

1.8.3 Agitación

La agitación es un parámetro de cultivo importante para mejorar la transferencia de materia. La agitación ayuda en la distribución eficiente de los nutrientes y de los suplementos de gas a las células, evitando el estancamiento de células en zonas no fóticas, evitando la sedimentación del cultivo y permitiendo la adecuada suspensión del cultivo. En sistemas cerrados, como los fotobiorreactores, la mezcla puede provenir de la adición de aire o CO_2 (Yen et al., 2013).

1.8.4 Transferencia de masa de CO_2 y O_2

El carbono es uno de los nutrientes más importantes para el crecimiento microalgal, representando a casi el 50% de su peso seco (1,8 gr de CO_2 es requerido para producir 1 gr de biomasa). En los cultivos de microalgas, el carbono es proporcionado como CO_2 (disuelto en corrientes de aire y/o medio acuoso), HCO_3^- y CO_3^{2-} (disuelto en el medio). En el caso en que se utilice los efluentes de pisciculturas

como medio de cultivo, el CO₂ es proporcionado mediante la respiración aeróbica de los peces. Este gas es disuelto en el medio, formando ácido carbónico que es utilizado por las microalgas durante la fotosíntesis. La adición de CO₂ tiene también un importante rol en el control del pH ya que el CO₂ disuelto reacciona con el agua para formar un equilibrio entre especies químicas iónicas y no iónicas que acidifican el medio: el dióxido de carbono libre en disolución (CO₂ (aq)), el ácido carbónico (H₂CO₃), el bicarbonato (HCO₃³⁻) y el carbonato (CO₃²⁻). La limitación principal de la transferencia de CO₂ desde la fase gaseosa hacia la fase líquida es el bajo coeficiente de transferencia. La reducción del tamaño de la burbuja mejora la transferencia de masa según la ley de Fick, permitiendo una disolución más rápida y una alta relación superficie/volumen.

Por el otro lado, el oxígeno producido en la fotosíntesis puede acumularse en el medio de cultivo a niveles que puede resultar dañino para la microalga en el sentido de producir un estrés oxidativo a causa de la acumulación de oxígeno en el medio. Sin embargo, al tratarse de un cultivo mixotrófico, el oxígeno producido por las microalgas será utilizado por las bacterias encargadas de reducir los compuestos nitrogenados (Pires, Alvim-Ferraz, & Martins, 2017).

1.8.5 Nutrientes

El suministro de nutrientes como el nitrógeno y el fosfato es otro factor de interés ya que corresponde al contenido principal de elementos químicos de los RILes de la salmonicultura. La dinámica de estos nutrientes está fuertemente relacionada entre sí y al proceso metabólico presente en el fotobiorreactor. Estudiar el destino del nitrógeno y de los otros nutrientes a través de las diferentes vías biológicas durante el cultivo en el fotobiorreactor es una herramienta valiosa para diseñar los sistemas a escala comercial (o productiva), con una demanda cada vez mayor de sistemas más eficientes de eliminación de nutrientes. Si existe una deficiencia de nitrógeno, el complejo citocromo b6/f de la cadena transportadora de electrones se ve fuertemente afectado, por lo que el proceso de fotosíntesis se vería afectado también. Para evitar que la población de células se reduzca en exceso por la inhibición fotosintética, es

necesario que el suministro de nutrientes sea el adecuado (García JC & López GL., 2018).

1.8.6 Temperatura

La temperatura corresponde a un factor importante en la reacción fotocatalítica y tiene un impacto en el equilibrio químico de las especies, la solubilidad del gas y el pH. La temperatura óptima para el cultivo de algunas microalgas se encuentra normalmente entre los 20 y 24°C, y la mayoría de las especies de microalgas son capaces de tolerar temperaturas entre los 10 y 35°C. Mientras que la temperatura de los sistemas de cultivo de salmones varía entre los 8 y 12°C, esto significa que los fotobiorreactores deben situarse en este rango de temperatura. Los microorganismos que trabajen en este sistema deben soportar estas temperaturas. Considerando lo mencionado anteriormente, se vuelve imperativo la adición de un sistema de control de la temperatura y posterior proceso de aclimatación de los microorganismos para que ésta se mantenga en el rango deseado y los microorganismos puedan depurar el agua eficientemente (Huang, Jiang, Wang, & Yang, 2017).

1.8.7 pH

El pH posee un alto impacto en el cultivo de microalgas en cuanto a la disponibilidad y asimilación de los nutrientes disueltos en el medio. El equilibrio químico entre las especies carbonatadas (CO_2 , HCO_3^- y CO_3^{2-}), precipitación de fosfatos, volatilización del amonio y la solubilidad de elementos traza son dependientes del pH. Más aún, hay especies de microalgas sensibles a los valores de pH; por lo tanto, este parámetro puede definir la especie dominante en el cultivo. Los valores de pH en el cultivo deben estar entre 7 y 9, con un óptimo entre 8,2 y 8,7. Dadas las condiciones que se presentan en los sistemas de cultivo de peces, el pH tiende a disminuir por la presencia de compuestos que posteriormente tienden a formar ácidos. Sin embargo, el hecho de que las microalgas consuman estos compuestos (CO_2 y CO_3^{2-}) reduce su disponibilidad para la formación de ácidos (HCO_3^-), por ende, el pH del medio tenderá a aumentar (Pires, Alvim-Ferraz, & Martins, 2017).

1.9 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES OPERACIONALES

Para la mayoría de los procesos multivariados, como los sistemas bioquímicos, en los que intervienen numerosos factores potencialmente influyentes, no siempre resulta obvio determinar los factores más influyentes. Por lo tanto, es necesario un proceso de evaluación inicial antes de la optimización. La metodología de Plackett-Burman es una herramienta para realizar la evaluación inicial, ya que permite determinar la influencia de varios factores con solo un pequeño número de ensayos, en lugar de utilizar un diseño factorial extenso, que proporciona un diseño más completo de información pero que implica una complejidad inviable (Kalil, Maugeri, & Rodrigues, 2000).

No obstante, el diseño factorial reducido, de un conjunto limitado de variables es ventajoso en relación con el método convencional de manipulación de un solo parámetro por ensayo, ya que dicho enfoque con frecuencia no logra ubicar las condiciones óptimas para el proceso debido a que no considera el efecto de posibles interacciones entre factores; además, el diseño factorial permite aprovechar el conocimiento práctico sobre el proceso durante el análisis final de la superficie de respuesta. La optimización mediante el diseño factorial y el análisis de superficie de respuesta es una práctica común en biotecnología. Varios investigadores han aplicado esta técnica, especialmente para la optimización de las condiciones de cultivo, la determinación de valores óptimos para parámetros de procesamiento como pH, temperatura, aireación, iluminación y la tasa de alimentación, entre otros (Kalil, Maugeri, & Rodrigues, 2000).

Tanto la capacidad de depurar contaminantes del agua como la producción de biomasa será más eficiente si el reactor utilizado para el cultivo de las microalgas fuese diseñado apropiadamente, esto es, definiendo las variables de operación influyentes en el diseño y sus mejores condiciones (valores de operación). Un método de diseño que considera estos parámetros es una simulación que utiliza modelos teóricos y fenomenológicos. La simulación de un proceso optimizado permite evaluar diferentes condiciones obteniendo una propuesta de desempeño eficiente del reactor.

Las distintas configuraciones de los fotobiorreactores respecto a los parámetros en evaluación como la tasa de retención hidráulica, agitación e irradiancia, tendrán un

desempeño diferente en la capacidad de remoción de contaminantes como el nitrógeno y fósforo. Este desempeño de la capacidad de remoción de contaminantes fue posible visualizarlo y comprenderlo mediante la metodología de superficie de respuesta, la cual entrega los parámetros donde este desempeño se maximiza.

En función al análisis anterior, surgen las preguntas de investigación de este trabajo, donde se cuestiona cuáles son las variables de operación que tienen mayor influencia en la operación eficiente del fotobiorreactor y, más específicamente, cuáles son las condiciones (valores) operacionales de estas variables que permiten maximizar las tasas de depuración en el sistema definido.

Esta investigación se enfoca en la determinación de las variables influyentes y las condiciones óptimas para depurar las aguas residuales de un sistema acuícola ubicado en la Unidad de Biotecnología del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción, utilizando fotobiorreactores de columna de burbujeo cuyas variables y condiciones de operación no estaban optimizadas. Para este estudio se diseñó y fabricó un fotobiorreactor que cumpliera con los requerimientos técnicos. Primero se realizó un análisis teórico de todas las variables de operación y su efecto sobre la eficiencia en diferentes sistemas, datos obtenidos de literatura. Luego, se seleccionó tres de estas variables para evaluar, experimentalmente, las condiciones de operación en los puntos extremos seleccionados en función al diseño del reactor. Finalmente, se utilizó una herramienta computacional para conocer los valores de estas variables operacionales que permitan obtener el máximo rendimiento en depuración de los contaminantes (amonio, nitrato y fosfato) en el fotobiorreactor.

2.0 HIPÓTESIS

La optimización de las condiciones de operación de un biofiltro FDM depende de la interacción y rangos de operación de la irradiancia, caudal de aire y de agua.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar el proceso de depuración de aguas residuales de un sistema de recirculación acuícola (RAS) utilizando un biofiltro mixotrófico de matriz inmovilizada a través del manejo de las variables de operación: tasa de retención hidráulica, agitación e irradiancia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1. Diseñar un modelo experimental mediante el programa “Modde v12.0” de Unimetrics para obtener una superficie de respuesta para tres factores que afectan la eficiencia de un FDM.

Objetivo 2. Determinar, mediante selección multifactorial, las condiciones operacionales que maximizan las tasas de depuración de nitrógeno y fósforo.

Objetivo 3. Evaluar efectos sinérgicos de las distintas variables de operación para maximizar las tasas de depuración de amonio, nitrato y fósforo.

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

La presente metodología describe las actividades que se llevaron a cabo para lograr los objetivos planteados en la sección anterior; la optimización de las variables operacionales seleccionadas para la evaluación de los fotobiorreactores de columna de burbujas en configuración batch-recirculado busca la o las mejores condiciones de cultivo para el tratamiento de aguas residuales en sistemas de recirculación acuícola (RAS). La investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Bioprosos Microalgales perteneciente al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Concepción, Chile, con el patrocinio de la empresa Ingeniería y Bionegocios FDM.

Se construyó un sistema integrado de tres fotobiorreactores de columna de burbujeo de configuración batch-recirculado, con operación en paralelo, para obtener los valores de las variables operacionales que maximizan el proceso de depuración de los contaminantes de las aguas residuales provenientes de un RAS de cultivo de salmónidos perteneciente a la Unidad de Biotecnología del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción. Las variables operacionales estudiadas en esta investigación fueron la irradiancia medida unidades LUX, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tiempo de retención hidráulica medida en función del caudal de agua recirculada (L/min) y la agitación medida como el caudal de aireación (L/min). En la construcción del prototipo se consideró, (1) un sistema de iluminación, (2) un sistema de aireación, (3) un sistema hidráulico, (4) un sistema de termoregulador y (5) un sistema de retención de las matrices contenedoras de los microorganismos (biomedios), encargados de la depuración de nutrientes. A modo de comparación, se realizó un experimento utilizando un control negativo, que utiliza una matriz de alginato y NFC sin los microorganismos (microalga-bacteria) encargados de la depuración de contaminantes. Las condiciones de cultivo para el experimento control negativo son las siguientes: irradiancia: 15250 LUX, caudal de aire: 2 L/min y caudal de agua: 3 L/min. Se consideraron estas condiciones para el experimento de control negativo, ya que teóricamente estas condiciones serían las que tendrían un mejor rendimiento en comparación a los otros experimentos. El experimento de control

negativo, buscó demostrar que los biomedios sin microorganismos, no poseen algún tipo de influencia tanto en la absorción o transformación de los nutrientes.

Este modelo de sistema de fotobiorreactores de columna de burbujas fue diseñado para evaluar las tasas de depuración de los Biofiltros Mixotróficos que utilizan matrices de Alginato-NFC, en las distintas configuraciones de las variables operacionales del diseño experimental.

3.1 PREPARACIÓN DE LOS FOTOBIORREACTORES

Se utilizaron tres fotobiorreactores cilíndricos fabricados de acrílico, cuyas dimensiones fueron de 74 cm de altura y 9 cm de diámetro, equivalentes a 3 litros operativos. A estos tubos de acrílico se le realizó modificaciones a su estructura, de modo que el proceso funcionara como un sistema batch-recirculado; por ende, estas modificaciones se basan principalmente en la instalación de una entrada y una salida de caudal de agua (figura 3). La entrada de agua se encuentra en la generatriz inferior del cilindro y la salida se encuentra en la generatriz superior del cilindro; esta entrada y salida de agua se conectan a un acumulador que consiste en un receptáculo donde se encuentra la bomba sumergible que impulsa el ingreso de agua. La capacidad del acumulador es de 3 litros permitiendo un total volumétrico de 6 litros de agua que se requiere depurar. Este sistema considera un sistema de iluminación interna, un sistema de agitación mediante burbujeo de aire y un sistema de control de temperatura, además del sistema hidráulico anteriormente mencionado. Si bien cada uno de los sistemas funciona independiente, todos deben asociarse de tal modo que los fotobiorreactores hayan operado a las condiciones deseadas. El esquema del sistema general se muestra en la figura 3.

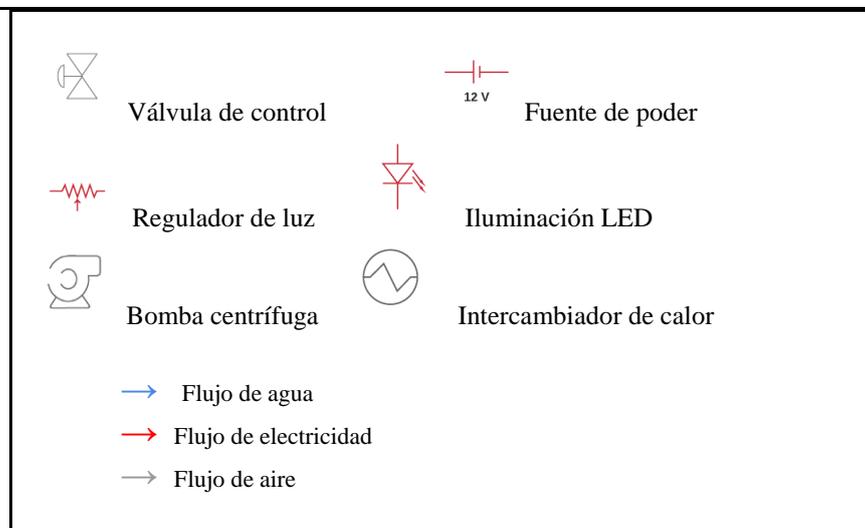
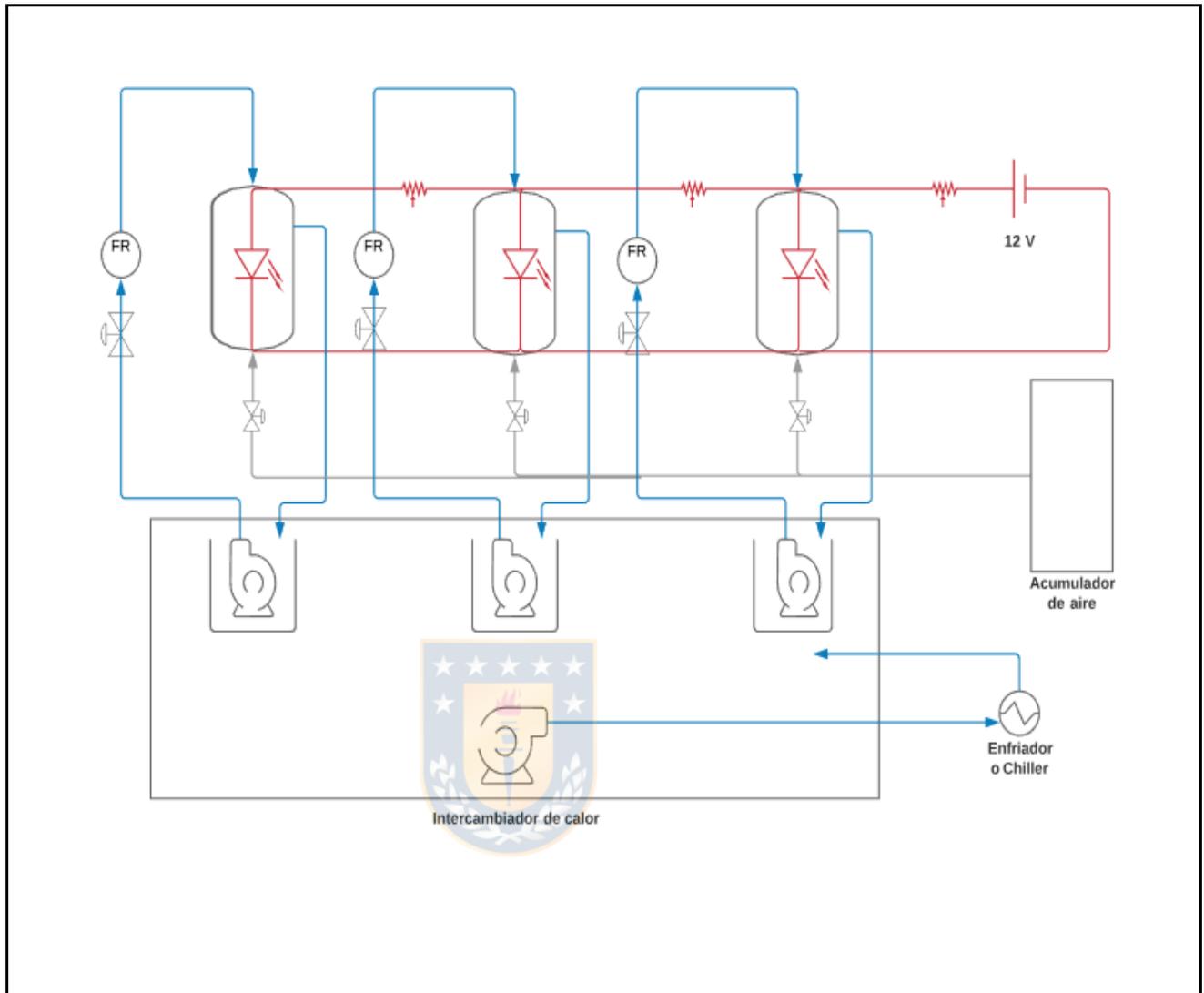


Figura 3 Esquema general del sistema, incluye los tres fotobiorreactores acoplados al intercambiador de calor, al sistema de iluminación y al de agitación. Se muestra los flujos de agua, aire y electricidad en azul, gris y rojo,

respectivamente. FR corresponde al flujómetro ubicado justo después de la válvula de bola y antes del ingreso de agua al reactor.

A continuación, se describe la construcción de cada sistema, y los materiales y herramientas que se utilizaron también para la construcción del sistema de iluminación, el termorregulador, hidráulico, de aireación y de contención de las esferas.

3.1.1 Sistema de iluminación

El sistema de iluminación consta de una barra de acero de 12 mm de diámetro y 49 cm de largo rodeado por cinta LED SMD3014, sin recubrimiento de silicona y procurando no dejar espacios vacíos. La cinta se conectó a un regulador de intensidad, alimentado por una fuente de poder de 650W. Esta barra de acero con las luces integradas se encuentra al interior de una tubería de acrílico de 25 mm de diámetro, cuya función reside en evitar el contacto de la fuente de luz con el agua. El largo de la barra de iluminación se corresponde con el volumen ocupado por el agua dentro del reactor, evitando así que por exceso de calor deteriore la tubería de acrílico. La tubería de acrílico fue unida en la parte superior, a un tubo de PVC de 25 mm con el fin de manipular el sistema de iluminación al momento de cambiar las condiciones para el siguiente experimento. El exterior de la columna se recubrió con papel aluminio con el fin de aumentar la reflectancia de la luz. Los valores de irradiancia fueron cuantificados mediante un Luxómetro modelo “LX1010BS”, tomando las mediciones desde la parte exterior del reactor.



Figura 4 Sistema de iluminación ubicado dentro del reactor, unido al sistema de aireación.

3.1.2 Sistema termorregulador

Este sistema fue diseñado para mantener la temperatura constante dentro del sistema, utilizando un Water Chiller marca “SUNSUN”, modelo “HYH-0.5D-D. Para regular la temperatura del sistema se utilizó un recipiente de poliestireno con una densidad de 20 kg/m³ (58 x 38,5 x 36,5 cm), en el cual se encuentran los acumuladores de agua de cada uno de los tres fotobiorreactores y la bomba independiente conectada al Water Chiller que regula la temperatura de los tres acumuladores de agua. La temperatura se mantuvo a 10°C.

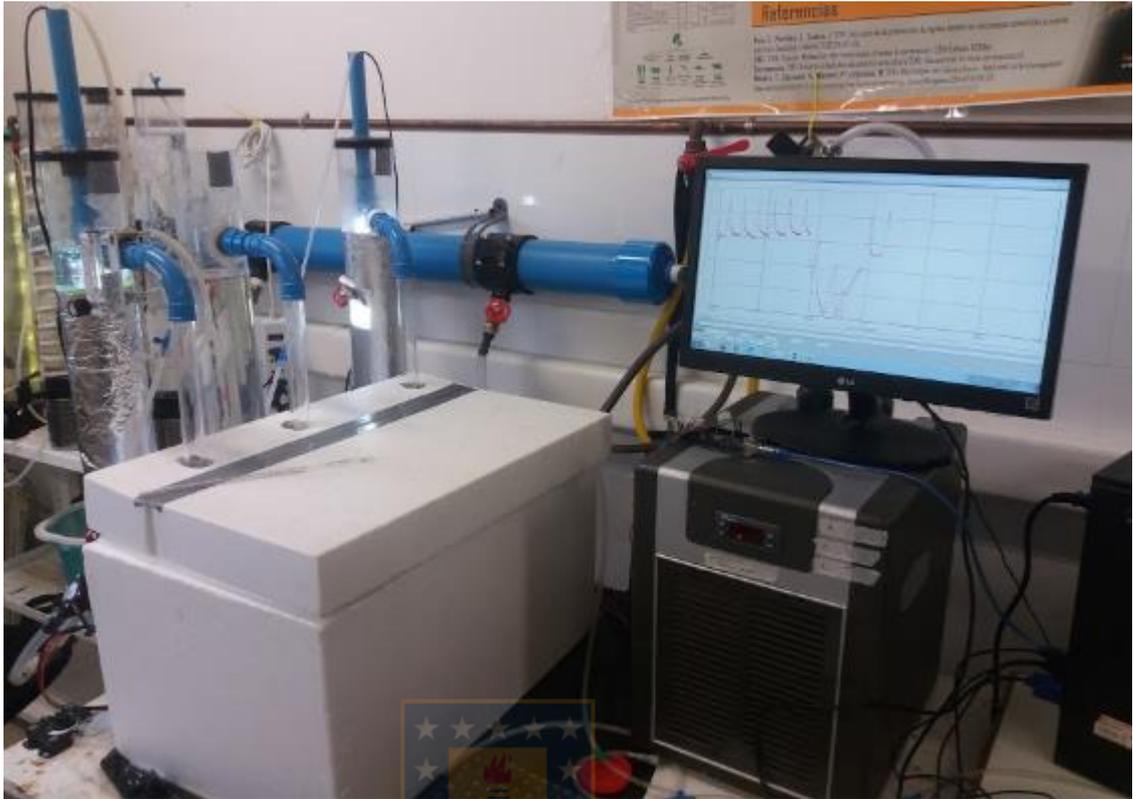


Figura 5 Sistema termorregulador equipado con el Chiller con monitoreo de la temperatura, equipo ubicado a la derecha de esta imagen, y a la izquierda se encuentra el sistema de intercambio de calor ubicado dentro de la caja de plumavit.

3.1.3 Sistema hidráulico

Este sistema fue diseñado para que el agua de los reactores no se mezcle entre sí, haciendo que el agua recircule entre el acumulador y el reactor, y haciendo que los tres reactores funcionasen de manera independiente. Para esto, se utilizaron bombas hidráulicas de 40 W de potencia y un flujo de salida de 1.800 l/h. Las bombas se encontraban en un acumulador de agua, que impulsaba el agua hacia la entrada del reactor, ubicada en la parte inferior del reactor. El ingreso de agua estaba regulado por una válvula de compuerta y el caudal se cuantificó con un flujómetro, ubicado posterior a la válvula señalada. En la salida del reactor, se dispuso un rebalse que consta de una salida en la parte superior del reactor hecha con coplas y tubos de PVC de 25 mm de diámetro para evitar las filtraciones de agua; el sistema se selló mediante anillos de goma y silicona líquida.

3.1.4 Sistema de agitación

El sistema de agitación está dado por aire, por lo que se diseñó y construyó un acumulador de aire, cuyo objetivo fue entregar un caudal independiente y controlado de aire a cada una de las columnas (biofiltros) que se utilizaron en la experimentación. Se utilizó una tubería de PVC hidráulico de 90 mm de diámetro y 1.5 m de largo con cuatro collarines de plástico de 90 mm distanciados cada 30 cm. Cada uno tiene una salida de ½ pulgada con una válvula de bola que regula el paso; en los extremos se pusieron tapas tipo gorro de 90 mm con salidas de estanque para el ingreso del aire. Las tapas tipo gorro cuentan con una válvula de seguridad para regular la presión del sistema. Las salidas de este acumulador inducen la salida del aire hacia los fotobiorreactores a los que ingresa el aire por una manguera de 5,5 mm de diámetro y se conecta a un difusor de aire al final de la tubería de acrílico.

Las tres columnas de fotobiorreactores se mantuvieron en distintos regímenes de agitación. El sistema de aireación estaba acoplado al sistema de iluminación resultando en solo una unidad que facilitaba su manejo.



Figura 6 A la izquierda, sistema de acumulación de aire que dirige el aire hacia la tubería del sistema de iluminación que, además, está asociado al sistema de aireación que culmina en el difusor el cual entrega las burbujas al sistema como se muestra en la imagen de la derecha.

3.1.5 Contención de las esferas

Se fabricó un sistema de retención de biomedios para evitar que se filtren en el sistema e ingresen al acumulador de agua. Este sistema fue fabricado con placas de acrílico diseñado para facilitar la retención y paso de las esferas; a esta placa se le adicionó un filtro de malla de 9 cm de diámetro que permite el paso del agua reteniendo las esferas. Estas placas fueron situadas en la parte superior del tubo de iluminación, impidiendo así que las esferas se desplacen hacia el rebalse.

Una vez terminado el armado y sellado de los sistemas, se verificó la posible existencia de fugas tanto de los sistemas independientes como del sistema general. Para esto se llevaron a cabo distintas pruebas para asegurar el buen funcionamiento de todas las partes de este sistema.

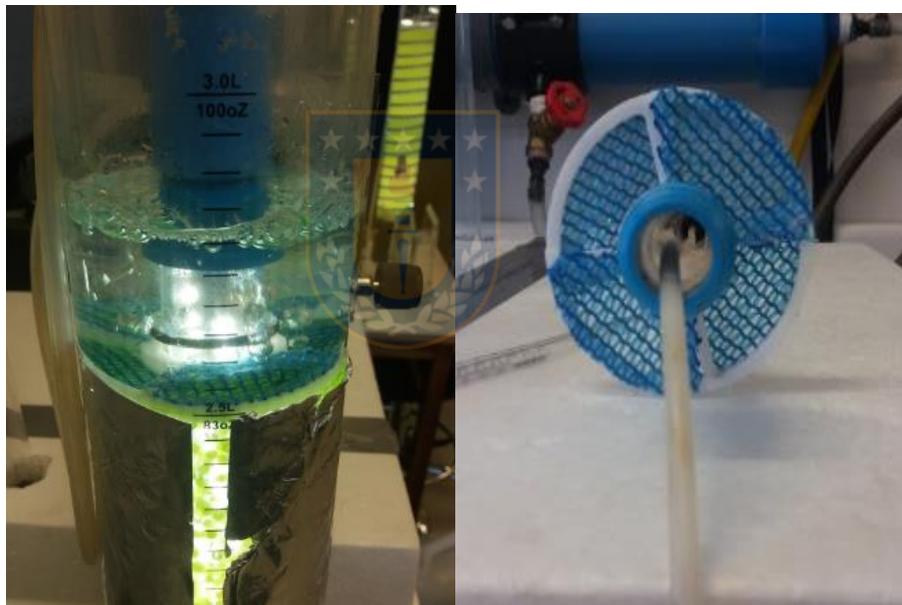


Figura 7 A la izquierda, sistema de contención de biomedios durante el funcionamiento del reactor. A la derecha, sistema de contención de biomedios, desde una perspectiva transversal.

3.1.6 Pruebas preliminares

Se realizaron pruebas de todos los sistemas para verificar que funcionaran de manera correcta como sistemas independientes. Por ejemplo, se verificó el sistema hidráulico para ver si existían fugas de agua en alguna de las uniones del sistema. El sistema de aire también fue chequeado para verificar que no hubiese fugas al aumentar la presión en el interior del acumulador de aire, y se repartiera equitativamente el aire en las tres columnas de los fotobiorreactores. El sistema de iluminación fue probado para verificar que la luz fuera capaz de controlarse mediante el regulador y que no ingrese agua a este sistema ya que impediría el correcto funcionamiento del sistema. Al sistema termo-regulador también se le hicieron pruebas para verificar que fuera capaz de mantener la temperatura deseada (10°C) en las tres columnas.

Por último, se realizaron pruebas de puesta en marcha de todos los sistemas funcionando simultáneamente, verificando que no existiesen problemas en ninguno de los sistemas independientes, y realizó pruebas del funcionamiento y control de ellos durante la experimentación. Cuando ya se comprobó que no existían pérdidas de ningún tipo, se finalizó la etapa de preparación y puesta en marcha de los fotobiorreactores.

3.2 OBTENCIÓN E INMOVILIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos que se utilizaron en este estudio corresponden a un consorcio microalgal-bacteriano proporcionado por la empresa “Ingeniería y Bionegocios FDM”. Los microorganismos utilizados fueron obtenidos de un inóculo mantenido en agua residual proveniente del RSA Los Aguilera del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción. Este inóculo se mantuvo a una temperatura de 10°C y fueron inmovilizados en esferas de alginato y nanofibras de celulosa (NFC), realizando una mezcla de 90% (p/p) alginato y 10% (p/p) nanofibras de celulosa. El alginato fue preparado disolviendo 1,5 grs de alginato en polvo en 100 mL de agua destilada, homogeneizado mediante agitador a 28000 rpm, hasta obtener una mezcla completamente homogénea. Luego, el alginato se mezcló con la

nanofibra de celulosa en estado líquido en una relación 9:1; posteriormente, a esta mezcla se le agregó 20 ml del inóculo de microalgas. El inóculo se encontraba en su fase exponencial de crecimiento, a una densidad óptica de 3 a 4 de absorbancia (ABS) cuantificada a 680 nm. Finalmente, la mezcla se dejó caer gota a gota en una solución de cloruro de calcio (CaCl_2), preparado mezclando de 2 grs de cloruro de calcio en estado sólido y 100 mL de agua destilada y homogeneizado con agitador magnético a 8000 rpm. Una vez que las gotas de la mezcla de alginato-NFC-inóculo entraban en contacto con el cloruro de calcio, las esferas se formaban inmediatamente. El diámetro de la esfera está dado por el diámetro de la punta de descarga; para este estudio se prepararon esferas de 3 mm de diámetro. Las esferas se mantuvieron en la solución de CaCl_2 por 24 horas.

3.3 OBTENCIÓN DE LOS VALORES MÁXIMOS Y MÍNIMOS DE LAS VARIABLES OPERACIONALES.

Para efecto de diseño experimental, se definieron empíricamente los rangos para cada una de las variables de operación seleccionadas. Luego, y con la ayuda del programa Modde v12.0 de Unimetrics, se definieron las condiciones intermedias para cada factor y la combinación de condiciones para el experimento que evalúa la reproducibilidad del estudio; este experimento se realizó por triplicado como lo exige el programa. Para obtener los valores máximos y mínimos de estas variables, fue necesario llevar a cabo una serie de ensayos preliminares, que dieron a conocer el rango de un correcto funcionamiento del fotobiorreactor.

Los rangos estimados de las variables operacionales se muestran en la tabla 2 y los experimentos realizados para evaluar las tasas de depuración son detallados a continuación.

3.3.1 Tasa de retención hidráulica

La tasa de retención hidráulica se define como el tiempo en que el líquido permanece dentro del reactor y está dado en función del caudal medido (L/min). Los valores de los caudales se obtuvieron con un flujómetro digital marca “Se^a”, modelo YF-S201,

para tuberías de ½”; este equipo posee un rango de medición de 1 a 30 L/min. El flujómetro se ubicó en línea estratégicamente para medir el flujo de agua que ingresaba a la columna del fotobiorreactor desde la bomba puesta en el acumulador, tal como se muestra en la figura 3. Para obtener los valores máximos y mínimos de caudal, se observó diferentes valores de caudal que permitían que las esferas permanecieran en suspensión, donde el caudal mínimo era el que permitía mantener en movimiento a aproximadamente el 80% de las esferas y el valor del caudal máximo será aquel que les permitía a las esferas flotar en la parte superior del reactor compactándose en la sección superior del fotobiorreactor.

3.3.2 Agitación

La agitación está dada en función del caudal de aire medido en litros/minuto (L/min). Los valores de esta variable operacional fueron obtenidos con un rotámetro marca “Veto”, con capacidad de lectura de 1-10 L/min. El rotámetro fue puesto a la entrada del fotobiorreactor para medir el flujo de aire necesario para que los biomedios (esferas) puedan suspenderse en la columna y que la mezcla (agua de tratamiento y biomedios) al interior del reactor se encontrase homogénea, como se muestra en la figura 3. El valor de caudal mínimo correspondió al valor ausente de movimiento de los biomedios y el valor máximo fue aquel que le otorgase una agitación tal que los biomedios se encontrasen distribuidos homogéneamente al interior del fotobiorreactor, evitando que se genere caos al interior del fotobiorreactor o que el exceso de agitación provoque el rompimiento de los biomedios.

3.3.3 Irradiancia

La irradiancia se define como la potencia entregada a una superficie determinada (W/m^2). Para este caso puntual, la irradiancia se midió en unidades LUX (Lumen/ m^2) y fue controlada mediante un dimmer o regulador de potencia lumínica capaz de controlar, según requerimiento, la potencia emitida al sistema. La irradiancia mínima que puede entregar el dimmer corresponde a 500 LUX, mientras que la irradiancia máxima que entrega el dimmer corresponde a 30000 LUX. Este rango de irradiancia

fue estimado mediante el criterio de alcanzar los dos extremos de fotoinhibición en caso de que la irradiancia sea máxima y fotolimitación en el caso de que la irradiancia sea mínima (Huang, Jiang, Wang, & Yang, 2017).

Tabla 2 Valores máximos y mínimos de las variables operacionales estudiadas en esta investigación.

Nombre	Unidad	Valores
Caudal Agua	L/min	1 a 5
Caudal Aire	L/min	0 a 4
Irradiancia	LUX	500 a 30000

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Con los valores máximos y mínimos de los parámetros seleccionados, se corrió el programa estadístico ingresando estos parámetros como factores junto a sus respectivos valores. El programa formuló el diseño experimental entregando el número de experimentos a realizar y su combinación. Un diseño central compuesto fue el modelo escogido para evaluar el efecto de los tres factores (Irradiancia, Agitación y Tasa de retención hidráulica) con un total 14 experimentos y tres réplicas (reproducibilidad) propuestas por el modelo, dando un total de 17 experimentos.

Las variables respuestas del proceso de depuración fueron la concentración de amonio, nitrato y fosfato, medidos en mg L⁻¹h⁻¹.

3.5 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado fue agua proveniente de la descarga (RIL) del sistema de recirculación acuícola (SRA) del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción. Es importante mantener durante la experimentación condiciones similares del RIL; para ello, que se acopió 300 L de RIL en un estanque, manteniendo

el sistema en recirculación, haciéndola pasar por un filtro UV, durante 12 horas, con el fin de controlar la formación de microorganismos que pudieran modificar las concentraciones de nutrientes en el medio. El RIL se almacenó en una cámara refrigerada a 3°C y diariamente se cuantificaron los nutrientes (amonio, nitrato y fosfato). La tabla de condiciones de cultivo ubicado en el anexo (tabla 6) muestra el comportamiento de las concentraciones de nutrientes en el tiempo de experimentación. La tabla 5 del anexo muestra las condiciones de cultivo generales de los fotobiorreactores.

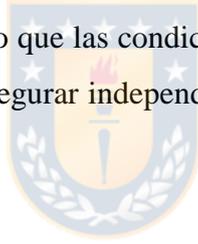
3.6 EXPERIMENTACIÓN PRELIMINAR

Una vez obtenido el diseño experimental, se realizó un experimento de prueba, con el fin de determinar el tiempo de duración de los experimentos; es decir, el tiempo que tardarían los nutrientes en ser absorbidos y transformados por los biomedios contenedores del consorcio microalga-bacteria. Para lo anterior, se consideró aplicar las condiciones menos favorables en términos disponibilidad de luz (500 LUX), nula agitación y máximo caudal de recirculación 5 LPM. La toma de muestras se realizó cada 1 hora, hasta la hora 6, se volvió a medir a las 14 horas y nuevamente cada una hora, hasta llegar a las 17 horas.

3.7 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE DEPURACIÓN

La capacidad depuradora de los fotobiorreactores fue evaluada mediante la medición de la densidad óptica, la cual mediante una curva de calibración se obtuvo la concentración de los nutrientes presentes en el medio. Estas mediciones se llevaron a cabo por medio de métodos colorimétricos utilizando un “Espectrofotómetro para 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 “HANNAH-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 de modo que pudiese realizarse la medición de la absorbancia en una placa de multipocillos. Para este efecto se dispuso de 300 uL de la muestra problema y se le adicionó 10 uL del

reactivo A y 10 uL 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 producido por la nitratación bacteriana respecto a la absorción microalgal, según el método de determinación de nitratos por espectrometría UV (SMC, 2016); consistió en depositar 2 uL de la muestra problema en la placa de micro-volúmenes “Take3”, seguido de la lectura realizada a la longitud de onda de 220 nm, seguida de una corrección para eliminar el sesgo de interferencias, medida a 275 nm. Para la medición de fosfato fecal exudado por los peces respecto a la absorción microalgal, según el método aminoácido (SMC,2016), cuya adaptación consistió en depositar 150 uL de la muestra problema y 150 uL 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. Una vez terminado cada experimento, se realizó un recambio tanto de agua como de las esferas. Se preparó el sistema de modo que las condiciones de limpieza fueran similares para todos los tratamientos para asegurar independencia entre experimentos desarrollados en el fotobiorreactor.



4.0 RESULTADOS

4.1 Diseño Experimental

El diseño experimental entregado por el programa Modde v12,0 para la realización de los experimentos mediante un diseño central compuesto es resumido en la tabla 3. Allí se indica el rango y niveles de las tres variables independientes (caudal de aire, caudal de agua e irradiancia). La información del diseño experimental se representa en número de experimentos, orden de corrida y las condiciones de cada uno de los experimentos (1-14), incluyendo las repeticiones propuestas por el programa para evaluar reproducibilidad (15-17).

Tabla 3 Matriz del diseño experimental definida por el programa Modde v12.0.

Número experimento	Nombre del experimento	Orden de corrida	Caudal de agua (L/min)	Caudal de aire (L/min)	Irradiancia (LUX)
1	N1	7	1	0	500
2	N2	1	5	0	500
3	N3	16	1	4	500
4	N4	12	5	4	500
5	N5	2	1	0	30000
6	N6	11	5	0	30000
7	N7	14	1	4	30000
8	N8	17	5	4	30000
9	N9	13	1	2	15250
10	N10	15	5	2	15250
11	N11	10	3	0	15250
12	N12	8	3	4	15250
13	N13	6	3	2	500
14	N14	4	3	2	30000
15	N15	3	3	2	15250

16	N16	9	3	2	15250
17	N17	5	3	2	15250

4.2 Comportamiento de nutrientes

Los nutrientes evaluados fueron nitrógeno amoniacal total (NAT), nitrato (NO_3) y fosfato (PO_4^{3-}). Si bien las tres curvas de concentración a las 17 horas de experimentación presentan una disminución considerable en la concentración, aun así, hay ciertos experimentos que presentan mayores pendientes entre la hora 4 y 6 de experimentación, respecto a las 17 horas totales de experimentación. Por ejemplo, el amonio, posee un comportamiento distintivo en los experimentos 12, 13 y 14. Estos experimentos poseen las mayores pendientes en la hora 4 y 6 de experimentación.

La evaluación de estas curvas motivó a realizar un análisis más detallado a las horas 4 y 6 de experimentación. En el caso del nitrato, se ve que posee un comportamiento de aumento y disminución de la concentración, debido a la actividad simbiótica presente en el sistema. Al cabo de la 17^{ta} hora es posible visualizar, por medio de las pendientes, la tendencia a la disminución de la concentración, mientras que, a la 4^{ta} y 6^{ta} hora de experimentación, se obtuvieron pendientes tanto negativas como positivas debido a las reacciones de producción de nitrato y la simultánea transformación a nitrito. Como consecuencia, se evaluaron únicamente las pendientes más altas y que sean negativas a esas horas de experimentación. Para el caso del fosfato, se observa que las pendientes a la 17^{ta} hora de experimentación tienen la clara tendencia a disminuir en concentración; sin embargo, la 4^{ta} y 6^{ta} hora de experimentación presenta un comportamiento peculiar en los experimentos 11, 12 y 13 cuyas condiciones corresponden a L15250-A0-C3, L15250-A4-C3 y L500-A2-C3 respectivamente, lo que obliga al análisis en detalle de estos experimentos. Las desviaciones estándar de los datos obtenidos no fueron agregadas al gráfico para no complicar la observación del comportamiento de cada uno de los experimentos. Los datos de este gráfico se encuentran en el anexo 6 y 7 (tabla 7 y 8).

4.2.1 Comportamiento del Amonio

El amonio fue consumido casi en su totalidad en todos los experimentos al cabo de las 17 horas; sin embargo, existen diferencias particulares entre ellos dependiendo de cada tratamiento aplicado. Observando de forma general, es posible visualizar que existen tendencias de disminución de la concentración o aumento de las tasas de depuración por parte de ciertos grupos de experimentos (figura 8). Por ejemplo, los experimentos 12, 13 y 14 presentaron las mayores tasas de depuración respecto al resto de los experimentos a la 4^{ta} hora de experimentación. A la hora 6, la concentración pareció haber llegado a un valor mínimo detectable. Además, en estos tres experimentos (12, 13 y 14), se observaron las mejores tasas de depuración por lo que se profundizó el análisis. Para el caso de las 4 horas, entre los tres tratamientos, el que posee mayor tasa de depuración corresponde al experimento 12 con una tasa de depuración de $0,338 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$, seguido por el experimento 13 con un valor de $0,322 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ y por último el experimento 14 cuya tasa de depuración correspondió a $0,312 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$.

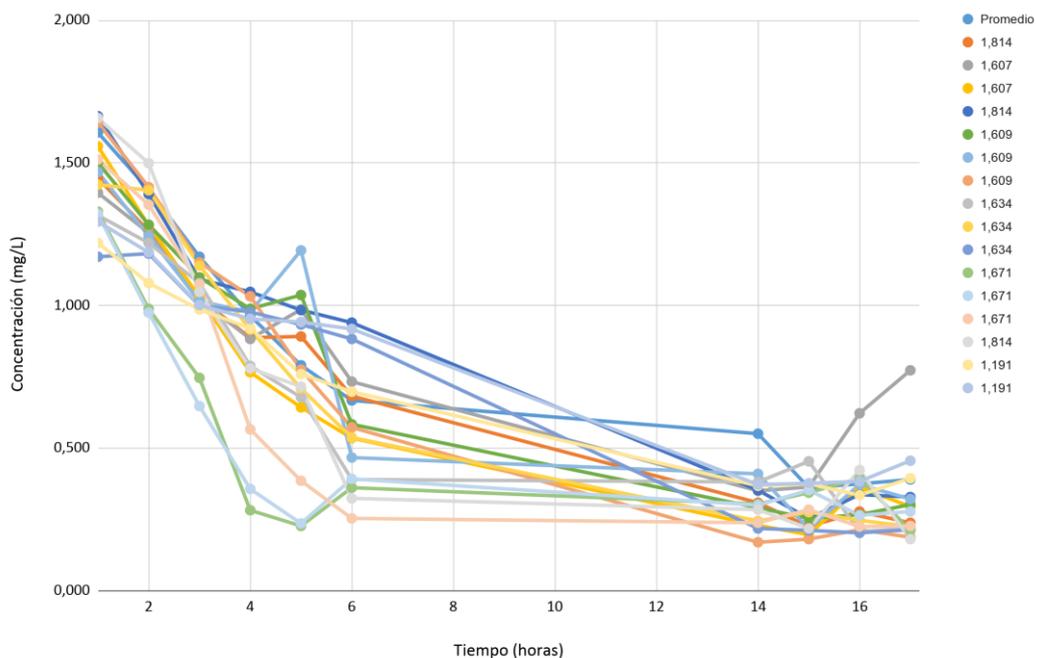


Figura 8 Evolución de la concentración del nitrógeno amoniacal en el tiempo para los 17 experimentos

4.2.2 Comportamiento del Nitrato

El nitrato no fue depurado completamente debido a su alta concentración inicial; sin embargo, de la figura 9 se pudo observar que todos los tratamientos poseen un comportamiento similar de fluctuación de la concentración. Al finalizar las 17 horas de experimentación, se puede ver que hay una clara disminución de la concentración, resultando como máximos depuradores a los experimentos 8, 11 y 13 cuyas tasas de depuración corresponden a 1,45 mg L-1h-1*h, 1,38 mg L-1h-1*h y 1,48 mg L-1h-1*h, respectivamente. A la 4^{ta} hora, los experimentos que presentaron mejores tasas de depuración fueron el 8, 10 y 11, cuyas tasas de depuración alcanzaron los 3,34 mg L-1h-1*h, 3,26 mg L-1h-1*h y 3,78 mg L-1h-1*h, respectivamente. Para las 6 horas, los experimentos 3, 11 y 12 destacaron por sobre los otros experimentos a esta misma hora, y sus tasas de depuración fueron 1,37 mg L-1h-1*h, 3,74 mg L-1h-1*h y 1,33 mg L-1h-1 respectivamente.

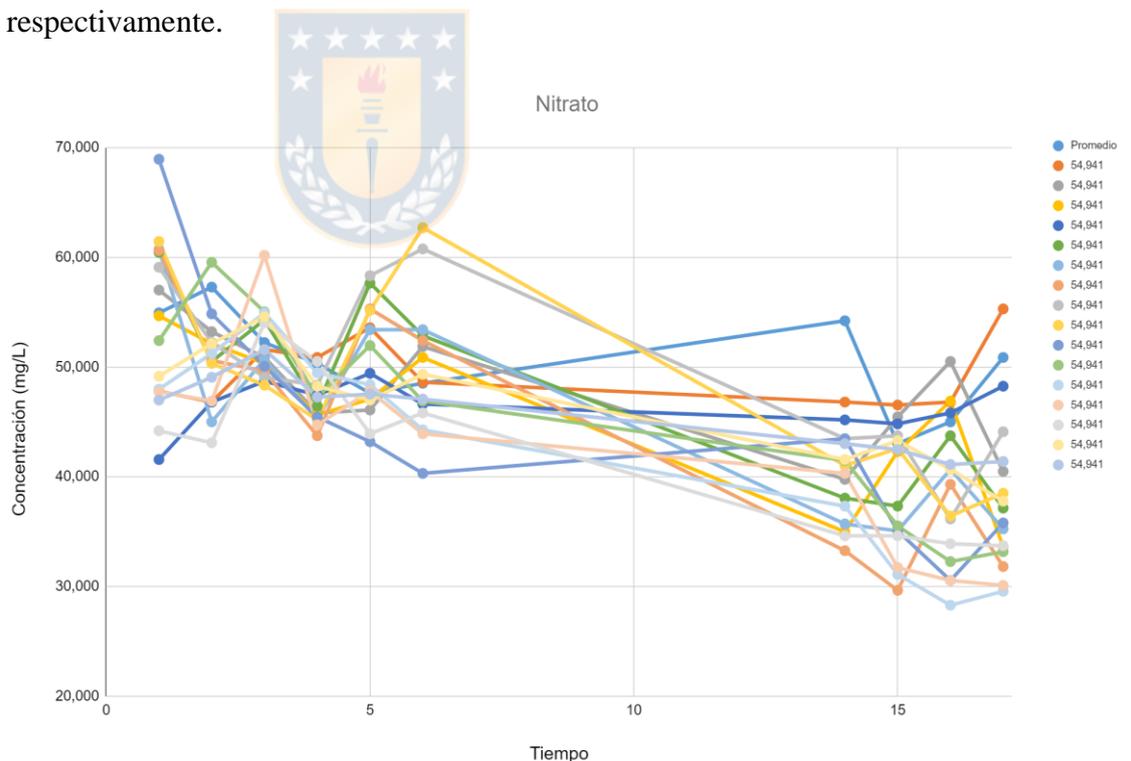


Figura 9 Evolución de la concentración de nitrato para los 17 experimentos realizados en 17 horas de experimentación

4.2.3 Comportamiento Fosfato

En las curvas de comportamiento del fosfato, representadas en la figura 10, se puede identificar claramente una tendencia a la disminución de la concentración hacia las 17 horas. Durante las primeras horas, la mayoría de los experimentos parecen tener una clara actividad depuradora. Sin embargo, los experimentos 2, 5 y 15 muestran un comportamiento de alza de la concentración justo en la 5^{ta} hora de experimentación. Los experimentos que tienen mayor tasa de depuración al final de la experiencia son los experimentos 6, 7 y 8, cuyas tasas de depuración alcanzaron valores de 0,445, 0,409 y 0,409 mg L-1h-1*h, respectivamente. A las 4 horas, los experimentos con mayor tasa de depuración de fosfato fueron los experimentos 9, 12 y 13 con tasas de depuración de 0,643 mg L-1h-1*h, 0,827 mg L-1h-1*h y 0,804 mg L-1h-1*h, respectivamente. A la 6^{ta} hora, las mayores tasas de depuración fueron obtenidas por los experimentos 8, 11 y 12, cuyas tasas de depuración corresponden a 0,832 mg L-1h-1*h, 0,884 mg L-1h-1*h y 0,830 mg /L*h, respectivamente.

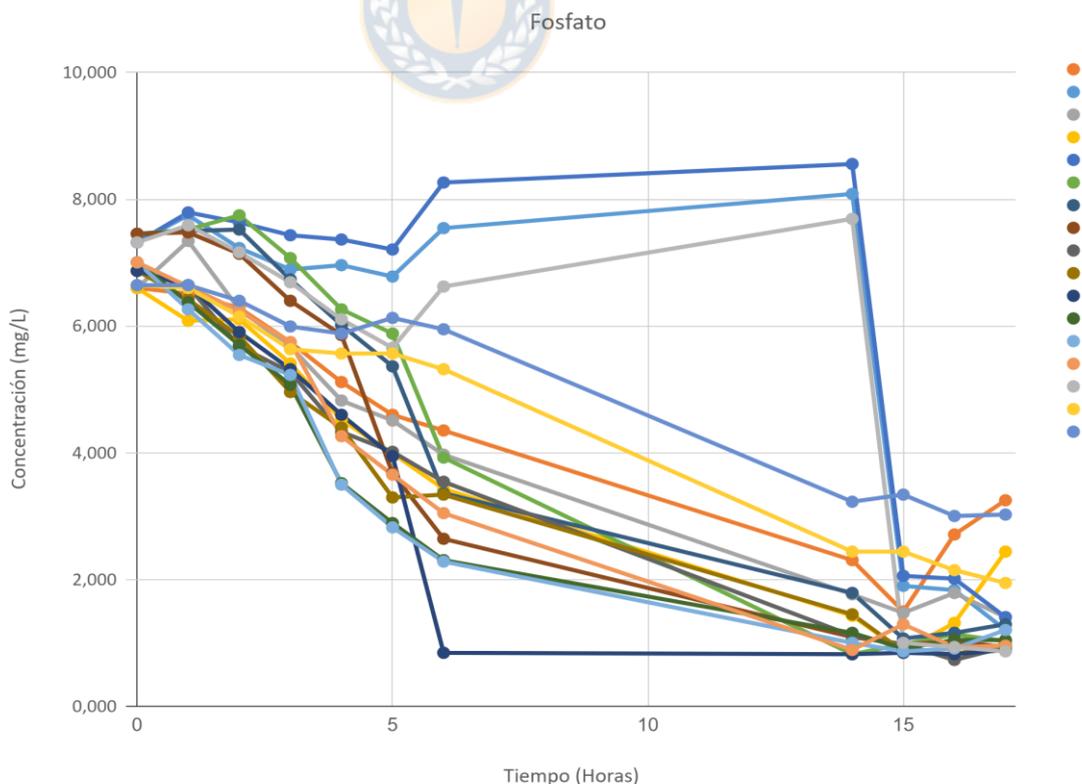


Figura 10 Curvas de comportamiento de fosfato para los 17 experimentos realizados en las 17 horas de experimentación

4.2.4 Tasas de depuración

Las tasas de depuración fueron evaluadas por medio de la pendiente de las líneas de tendencia de cada uno de los experimentos. Se analizaron las pendientes a las horas 4, 6 y 17 de experimentación, como se muestra en la tabla 4. Es posible identificar que las tasas de depuración de los experimentos evaluados en la hora 17 son menores respecto a las horas 4 y 6. Sin embargo también es posible identificar que la hora 4 de experimentación, posee mayores pendientes respecto a la hora 6.

Tabla 4 Valores de las tasas de depuración (mg L-1h-1) para cada uno de los experimentos a las 4, 6 y 17 horas

Ensayo	ID Ensayo	Amonio			Nitrato			Fosfato		
		4 hrs	6 hrs	17 hrs	4 hrs	6 hrs	17 hrs	4 hrs	6 hrs	17 hrs
Exp 1	L500-A0-C1	0,216	0,193	0,063	0,216	0,868	0,571	0,373	0,419	0,256
Exp 2	L500-A0-C5	0,191	0,145	0,067	0,434	0,119	0,106	0,157	0,055	0,319
Exp 3	L500-A4-C1	0,177	0,122	0,044	2,440	1,370	0,624	0,521	0,535	0,330
Exp 4	L500-A4-C5	0,263	0,208	0,064	2,290	1,210	0,917	0,483	0,545	0,301
Exp 5	L30000-A0-C1	0,215	0,140	0,075	0,786	0,306	0,149	0,027	0,050	0,322
Exp 6	L30000-A0-C5	0,172	0,155	0,070	2,310	0,568	1,130	0,283	0,548	0,445
Exp 7	L30000-A4-C1	0,170	0,148	0,064	2,940	0,677	1,170	0,364	0,644	0,409
Exp 8	L30000-A4-C5	0,209	0,211	0,081	3,340	0,897	1,450	0,427	0,832	0,409
Exp 9	L15250-A2-C1	0,172	0,187	0,057	2,320	0,431	0,925	0,643	0,591	0,353
Exp 10	L15250-A2-C5	0,179	0,193	0,070	3,260	0,200	1,070	0,640	0,652	0,338
Exp 11	L15250-A0-C3	0,076	0,063	0,067	3,780	3,740	1,380	0,586	0,884	0,355
Exp 12	L15250-A4-C3	0,338	0,217	0,037	1,270	1,330	1,370	0,827	0,830	0,324
Exp 13	L500-A2-C3	0,322	0,204	0,038	0,397	1,180	1,480	0,804	0,824	0,324
Exp 14	L30000-A2-C3	0,312	0,277	0,061	0,799	1,250	1,320	0,636	0,706	0,357
Exp15*	L15250-A2-C3	0,308	0,265	0,070	0,099	0,732	1,080	0,333	0,250	0,344
Exp 16	L15250-A2-C3	0,099	0,104	0,050	0,795	0,894	0,809	0,312	0,237	0,289
Exp 17	L15250-A2-C3	0,121	0,076	0,054	1,070	0,868	0,596	0,218	0,130	0,237

*: Indica que el experimento no fue considerado para futuros análisis.

4.3 Superficies de Respuesta

Para la obtención de las gráficas de superficie de respuesta provenientes del programa Modde v12,0, se utilizó como variable respuesta las pendientes evaluadas como tasas de depuración (mg L-1h-1*h) de cada una de las curvas a las horas 4 y 6 de experimentación. Para el proceso de optimización en 4 dimensiones, fue necesario especificar las variables operacionales fijas (caudal de aire y caudal de agua) mientras que la irradiancia se dejó como variable de evaluación móvil en los valores máximo

(30000 LUX), mínimo (500 LUX) y medio (15250 LUX), en respuesta a las tasas de depuración de nutrientes. Los valores de las tasas de depuración representadas como pendiente se identificaron mediante colores donde el rojo representa los valores más altos de las tasas de depuración y el azul representa los valores más bajos, considerando sus respectivos intermedios.

Es importante mencionar que los experimentos 15, 16 y 17, que para este caso actúan como los puntos centrales del modelo utilizado en esta investigación, no poseen una buena reproducibilidad, es decir, que las respuestas de estos tres experimentos no son similares, como se esperaba. Los valores de las pendientes de estos experimentos se encuentran en la tabla 4.

4.3.1 Hora 4 de experimentación, variable respuesta TAN (Nitrógeno amoniacal Total)

En el caso del TAN (figura 11, 12 y 13), se visualiza una superficie de respuesta en la cual un bajo nivel de irradiancia (500 LUX) muestra que los valores máximos de las tasas de depuración son obtenidos a un caudal de aire ubicado en un rango entre 2,6 y 4,7 L/min, mientras que, para el caso del caudal de agua, el rango óptimo de trabajo se encuentra entre 3,3 y 5,0 L/min. Si la irradiancia se evalúa a un nivel medio (15250 LUX), se observa que la máxima tasa de depuración se alcanzó para el caso del caudal de aire en un rango entre 1,5 y 4,0 L/min, mientras que el caudal de agua posee su máxima tasa de depuración entre los 2,5 y 4,5 L/min. Cuando la irradiancia se utiliza a su máximo valor (30000 LUX), las máximas tasas de depuración son alcanzadas cuando el caudal de aire está en el rango de 2,95 y 4,0 L/min, mientras que el caudal de agua tiene su rango entre los 2,4 L/min y 3,9 L/min.

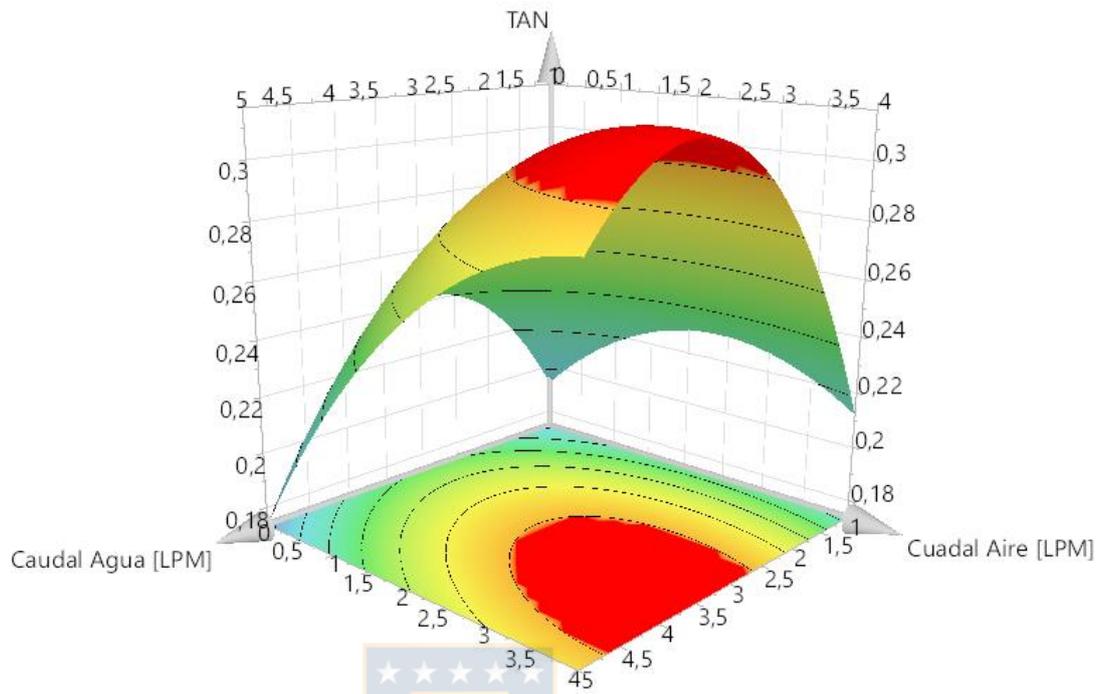


Figura 11 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 4 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).

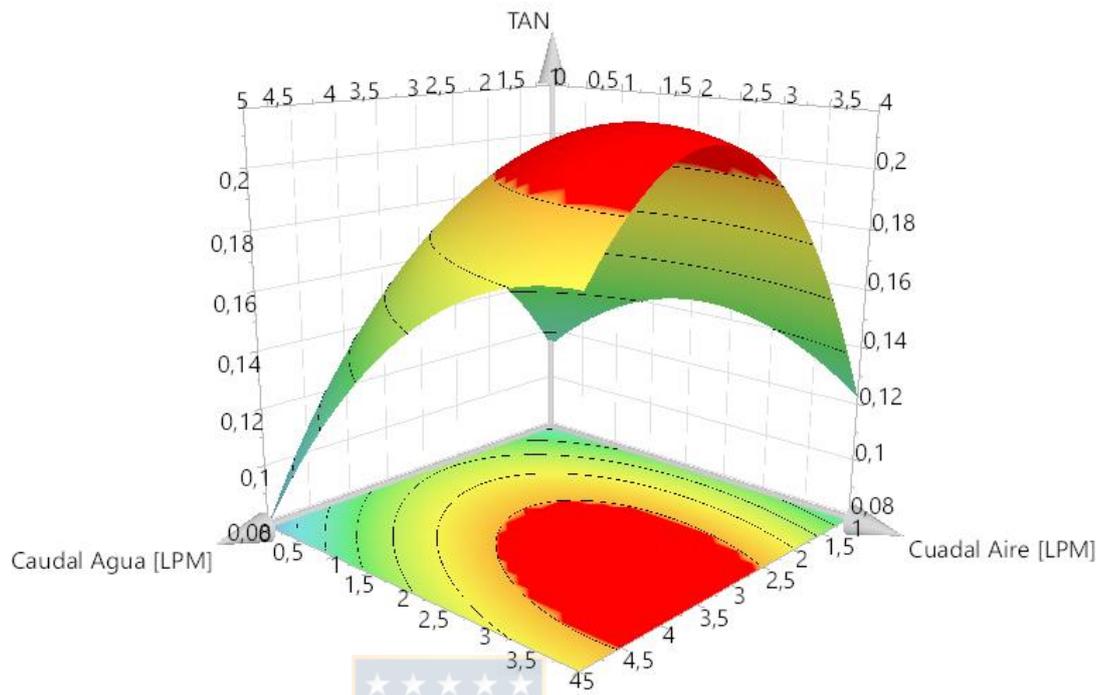


Figura 12 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 4 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).



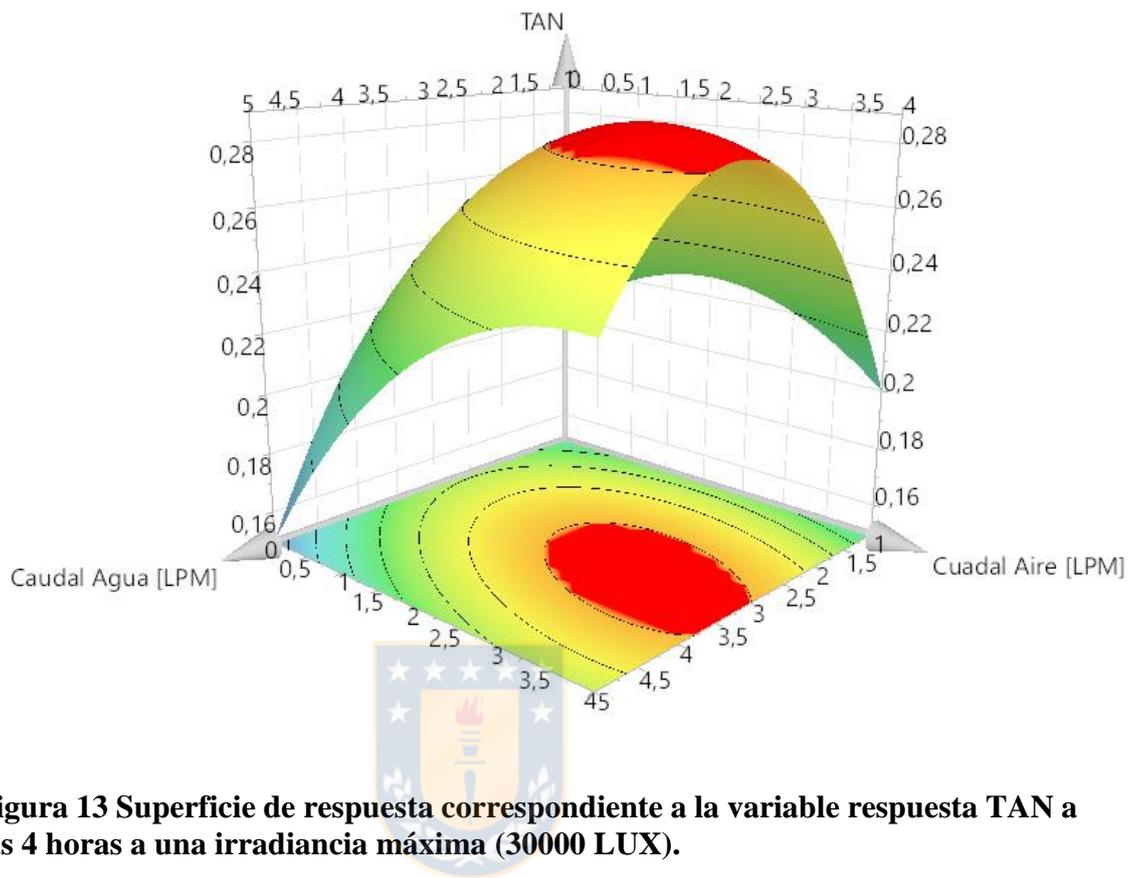


Figura 13 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 4 horas a una irradiancia máxima (30000 LUX).

4.3.2 Hora 4 de experimentación, variable respuesta NO_3

En el caso de la variable respuesta NO_3 a las 4 horas de experimentación, es posible visualizar una superficie de respuesta cuya forma corresponde a una paraboloides elíptica, como muestran las figuras 14, 15 y 16 cuyo rango de respuesta varía entre 2 y 3,5 donde los puntos máximos se encuentran en los extremos de la superficie teniendo mejor respuesta a un nivel de caudal de agua mínimo, esto quiere decir que existen dos puntos donde se puede encontrar la máxima tasa de depuración y estos polos corresponden a máximo y mínimo caudal de aire, teniendo mejor resultado a un bajo caudal de aire. Si la irradiancia se evalúa a un bajo nivel (500 LUX), el valor máximo de depuración en un punto es obtenido a un caudal de aire (rango total entre 1 y 4 L/min) ubicado en un rango entre 3,8 y 4 L/min, mientras que para el caudal de agua (rango total entre 0 y 5 L/min), el rango óptimo de trabajo se encuentra entre 1,0 L/min y 1,25 L/min. Si la irradiancia se evalúa a un nivel medio (15250 LUX), los valores máximos de las tasas de depuración se encuentran en tres puntos y son obtenidas a un caudal de aire de 0 L/min o bien en un rango entre 3,8 L/min y 4,0 L/min, mientras que para el caudal de agua, el rango óptimo de trabajo para el caso de la agitación mínima se encuentra entre 4,8 L/min y 5,0 L/min; y el caso de la agitación

máxima, los valores máximos de depuración se encuentran a caudales de agua cercanos a 1 y a 5, respectivamente. Cuando la irradiancia se utiliza a su máximo valor (30000 LUX), las máximas tasas de depuración alcanzan niveles máximos en condiciones similares al caso de la iluminación a 15250 LUX, y son alcanzadas cuando el caudal de aire se encuentra en niveles máximos y mínimos llevando a mejores resultados en valores máximos mientras que el caudal de agua tiene su óptimo funcionamiento en valores máximos de caudal, aunque los resultados a caudales de aire mínimos son bastante cercanos respecto a los de caudal de aire máximo.

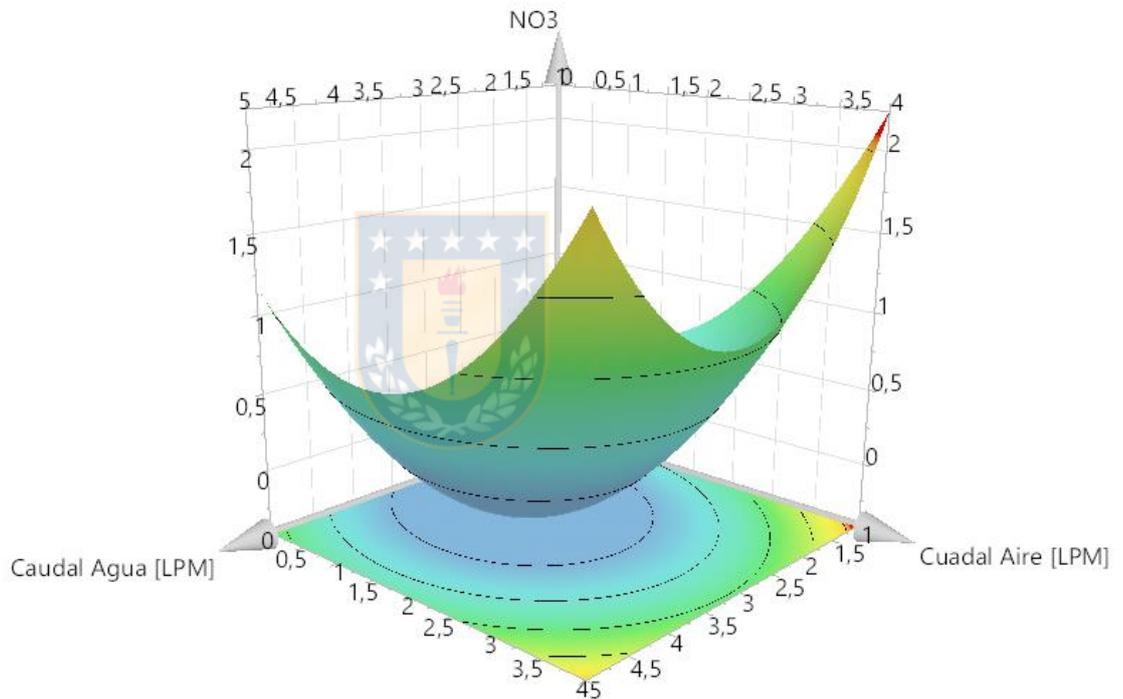


Figura 14 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO3 a las 4 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).

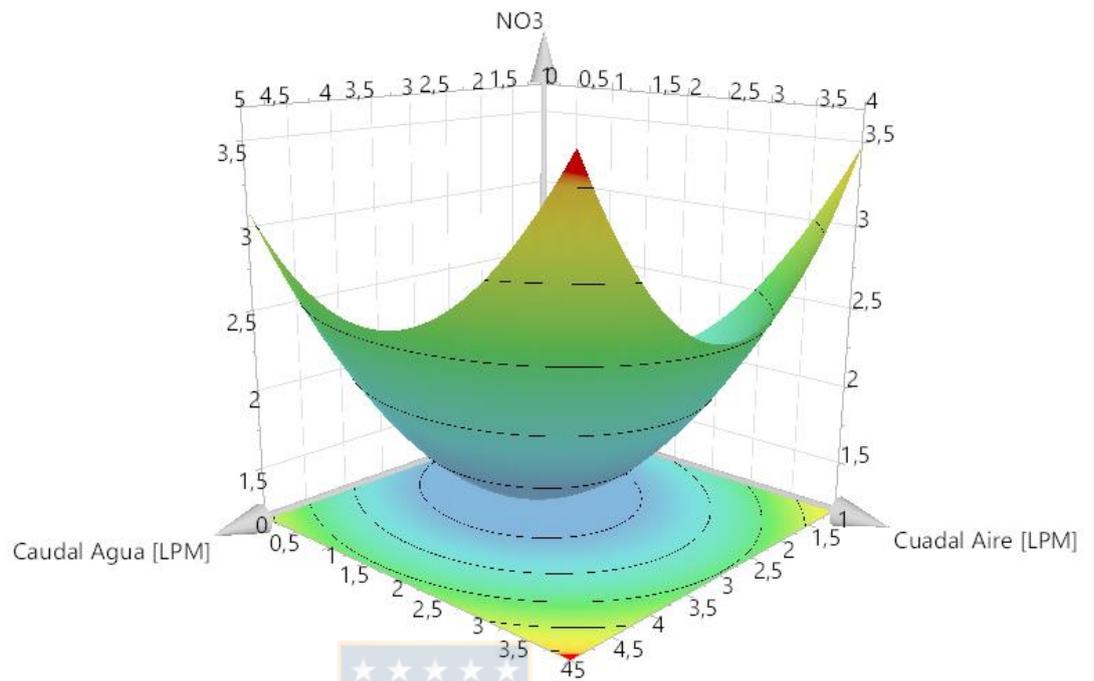


Figura 15. Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO3 a las 4 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).

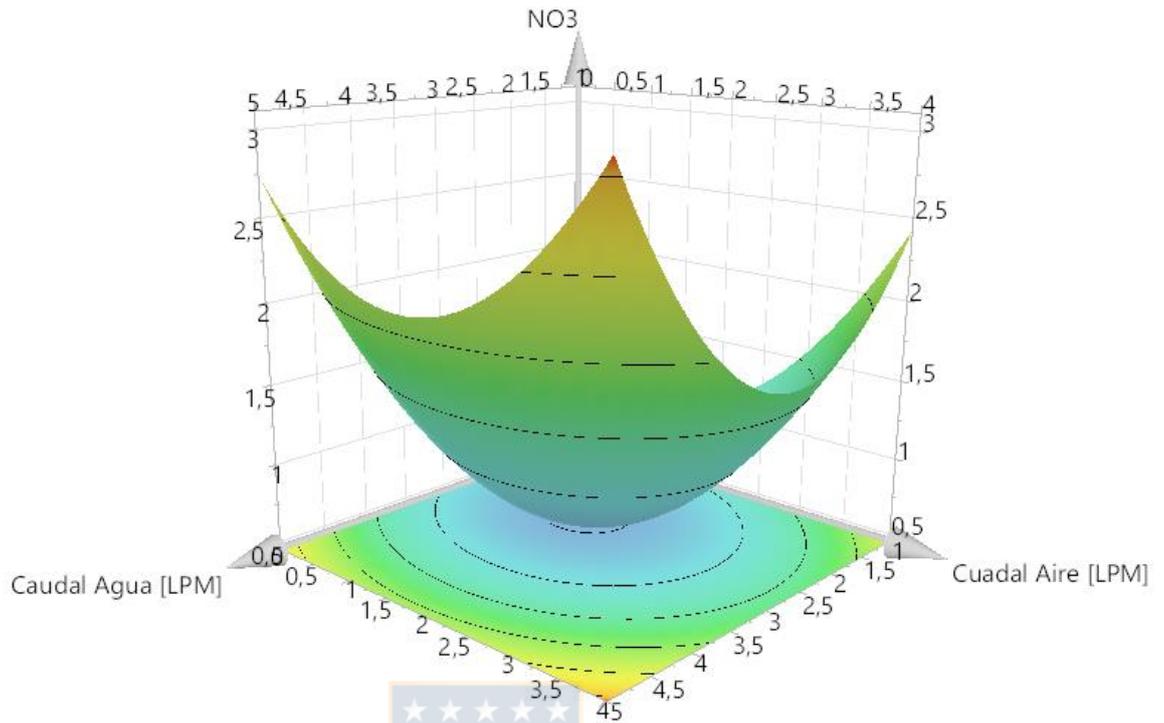


Figura 16 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO₃ a las 4 horas, a una irradiancia máxima (30000 LUX).

4.3.3 Hora 4 de experimentación, variable respuesta Fosfato

En el caso de la variable respuesta PO₄, se visualiza una superficie de respuesta (figura 17, 18 y 19) en la cual los valores máximos de las tasas de depuración son obtenidos a un caudal de aire entre 3,2 y 4 L/min, a un bajo nivel de irradiancia (500 LUX); para el caso del caudal de agua (rango total entre 0 y 5 L/min), el rango óptimo de trabajo se encontró entre 1,4 y 3,2 L/min. Si la irradiancia se evalúa a un nivel medio (15250 LUX), se observa que la máxima tasa de depuración se alcanzó con un rango de caudal de aire de entre 3,0 y 4,0 L/min, mientras que el caudal de agua mostró su máximo entre 2,0 y 4,0 L/min. Cuando la irradiancia estaba en su máximo valor (30000 LUX), las máximas tasas de depuración fueron alcanzadas cuando el caudal de aire (rango total entre 1 y 4 L/min) estaba en el rango de 3,7 y 4,0 L/min y el caudal de agua entre los 3,2 L/min y 4,2 L/min.

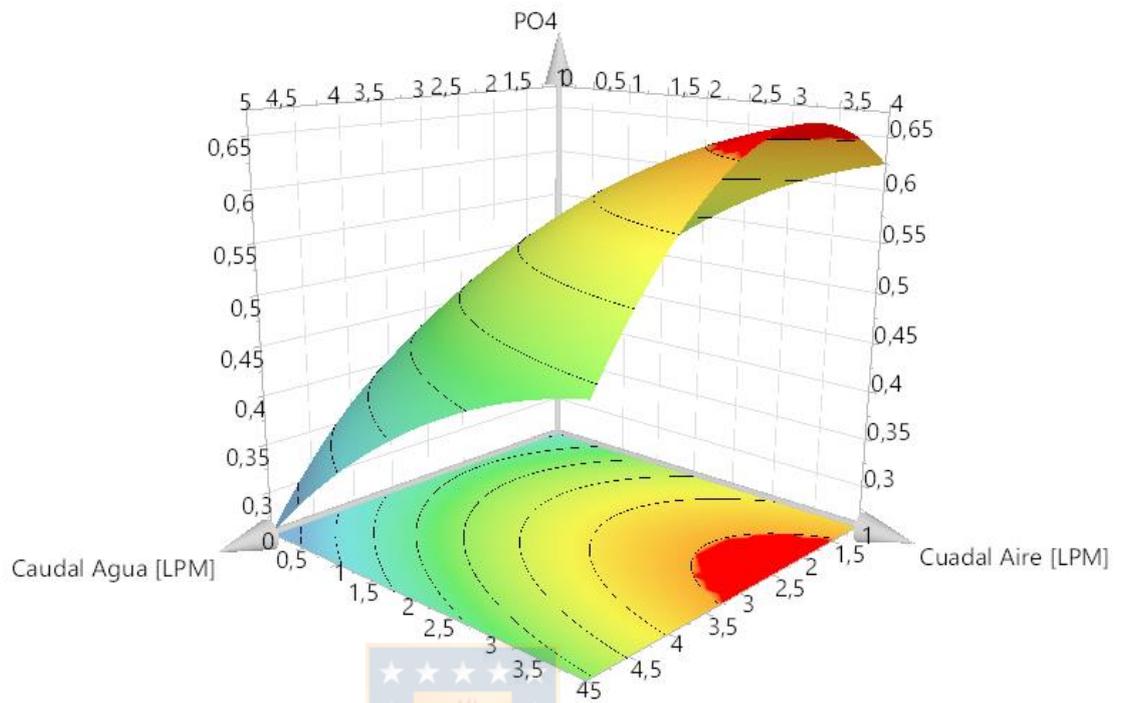


Figura 17 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO_4 a las 4 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).

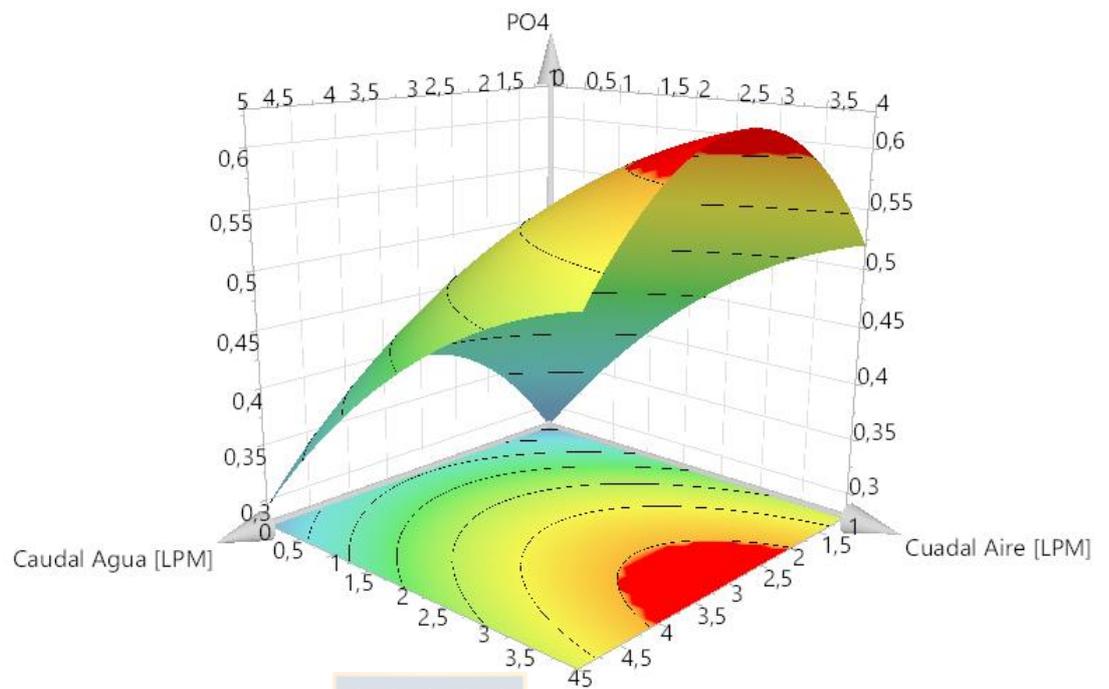


Figura 18 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO₄ a las 4 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).



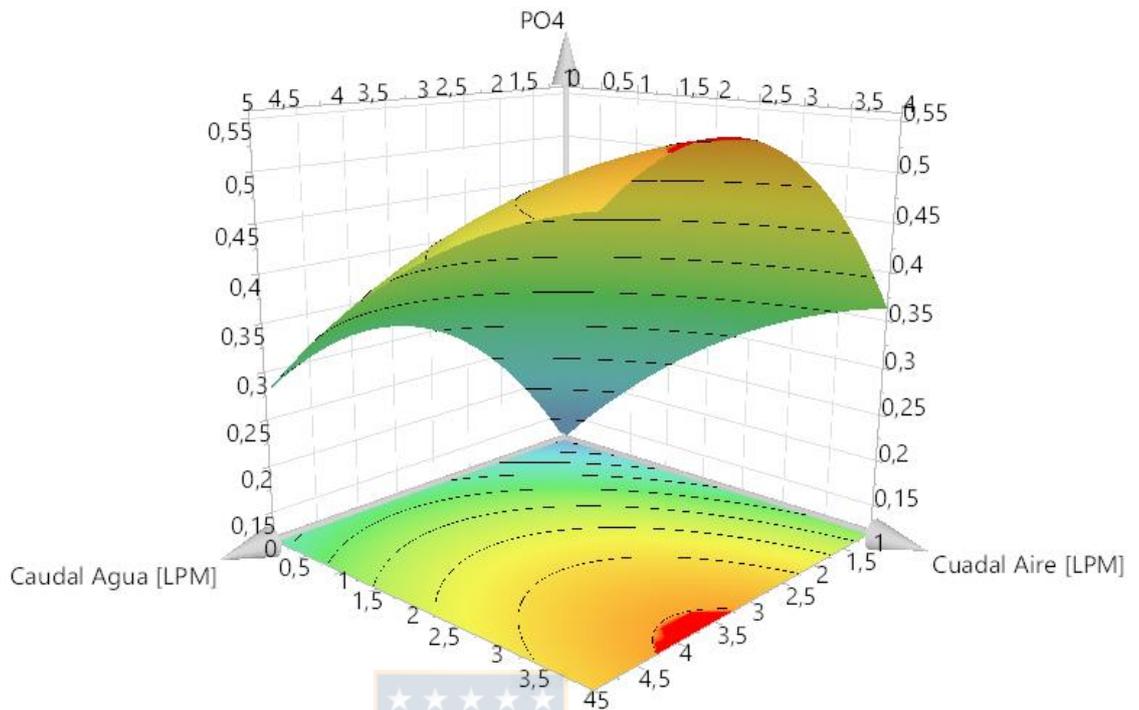


Figura 19 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO₄ a las 4 horas, a una irradiancia máxima (30000 LUX).

4.3.4 Hora 6 de experimentación, variable respuesta TAN (Nitrógeno amoniacal Total)

En el caso de la variable respuesta TAN (figura 20, 21 y 22), se visualiza una superficie de respuesta en la cual, a un bajo nivel de irradiancia (500 LUX), los valores máximos de las tasas de depuración fueron obtenidas a un caudal de aire de entre 1,7 L/min y 3,7 L/min, mientras que el caudal de agua se encontraba entre 2,0 L/min y 3,7 L/min. Cuando la irradiancia se evaluaba a un nivel medio (15250 LUX), se observó que la máxima tasa de depuración se alcanzó para el caudal de aire en un rango entre 2,0 L/min y 3,6 L/min y para el caudal de agua entre 4,1 L/min y 5,0 L/min. Cuando la irradiancia se encontraba a su máximo valor (30000 LUX), las máximas tasas de depuración fueron alcanzadas con un rango de caudal de aire entre 2,0 L/min y 4,0 L/min, mientras que el caudal de agua estaba en un rango entre 4,0 L/min y 5 L/min.

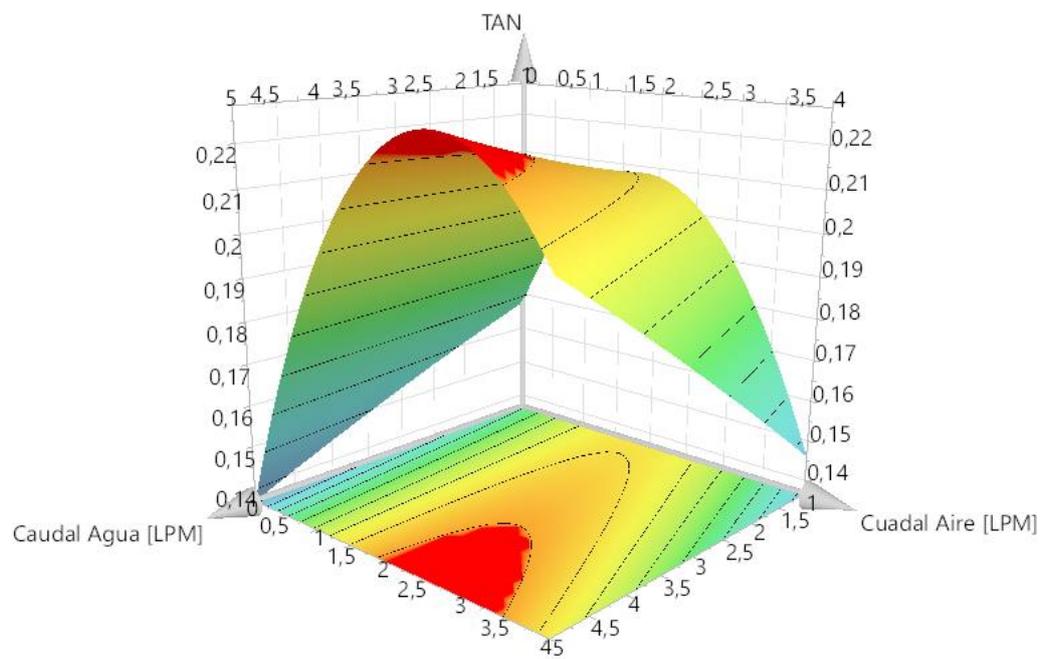


Figura 20 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 6 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).



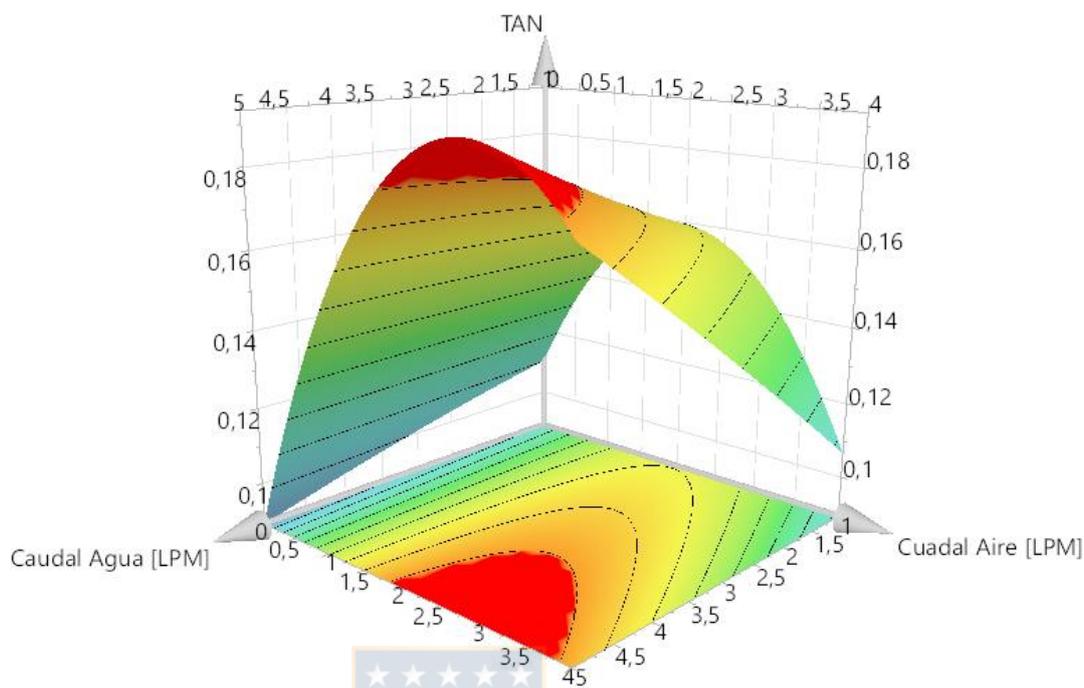


Figura 21 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 6 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).

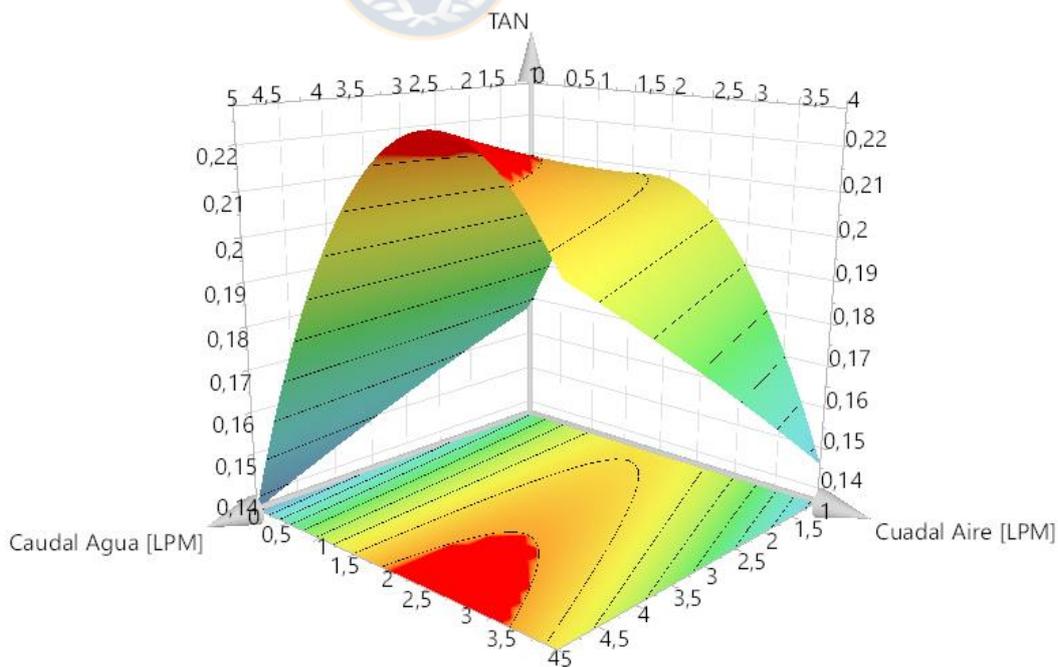


Figura 22 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta TAN a las 6 horas a una irradiancia máxima (30000 LUX).

4.3.5 Hora 6 de experimentación, variable respuesta Nitrato

En el caso de la variable respuesta NO_3 , es posible visualizar una superficie de respuesta cuya forma se asocia a un paraboloides hiperbólico (figura 23,24 y 25), esto quiere decir que existen dos puntos (1 y 2, respectivamente) donde se pueden encontrar máximas tasas de depuración y estos polos corresponden a máximo y mínimo caudal de aire. Si la irradiancia se evalúa a un bajo nivel (500 LUX), se visualiza que existen dos puntos de maximización de tasas que corresponden a un caudal de agua similar, pero uno al máximo caudal de aire y el otro al mínimo caudal de aire. Los valores máximos de las tasas de depuración en el punto 1 son obtenidas a un caudal de aire ubicado en un rango entre 3,7 L/min y 4 L/min, mientras que, para el caudal de agua, el rango óptimo de trabajo se encuentra entre 2 L/min y 4,0 L/min; el punto 2 posee su máxima tasa de depuración sin caudal de aire, pero el caudal de agua se encontraba en un rango entre 2,3 L/min y 3,1 L/min. Cuando la irradiancia se evaluó a un nivel medio (15250 LUX), los valores máximos de las tasas de depuración del punto 1 son obtenidas a un caudal de aire entre 3,8 L/min y 4,0 L/min, mientras que, para el caudal de agua, el rango óptimo de trabajo se encontró entre 2,2 L/min y 3,7 L/min; el punto 2 posee su máxima tasa de depuración para un caudal de aire con valores entre 0 L/min y 0,25 L/min y con valores de entre 2,0 L/min y 3,7 L/min para el caudal de agua. Cuando la irradiancia se utilizó en su máximo valor (30000 LUX), las máximas tasas de depuración alcanzaron niveles inferiores respecto a valores de irradiancia media y mínima, y fueron alcanzadas cuando el caudal de aire se encontraba en el mínimo valor (0 L/min) y el caudal de agua en valores entre 2,0 L/min y 4,0 L/min.

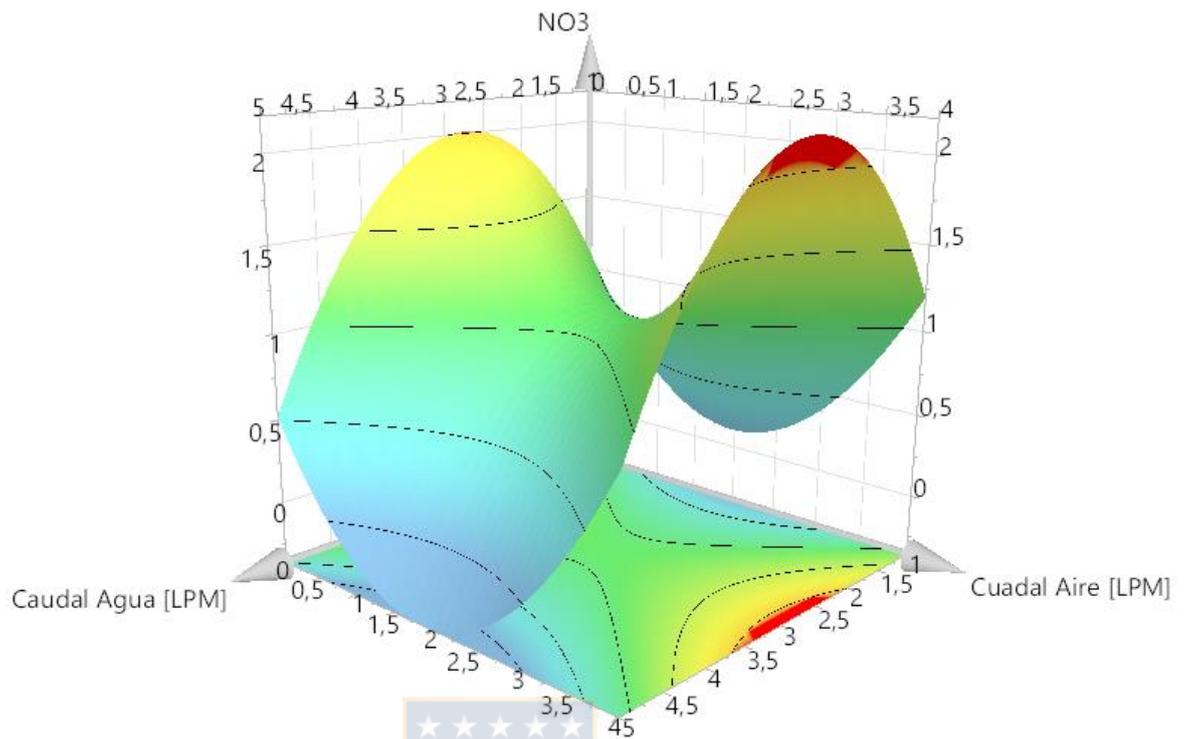


Figura 23 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO₃ a las 6 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).

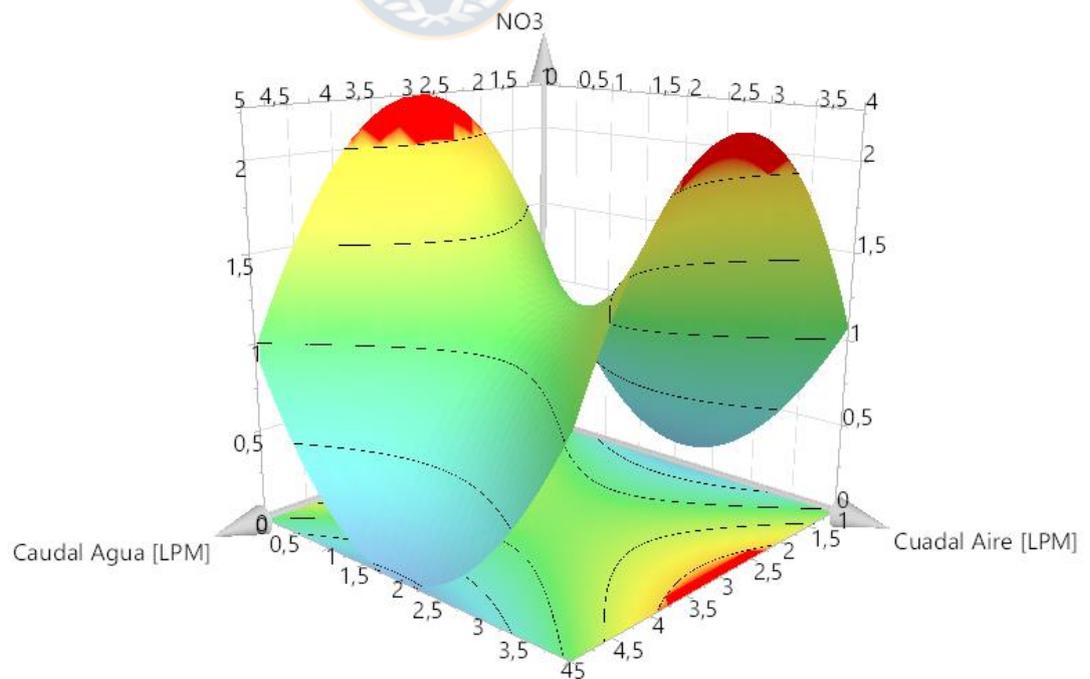


Figura 24 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO₃ a las 6 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).

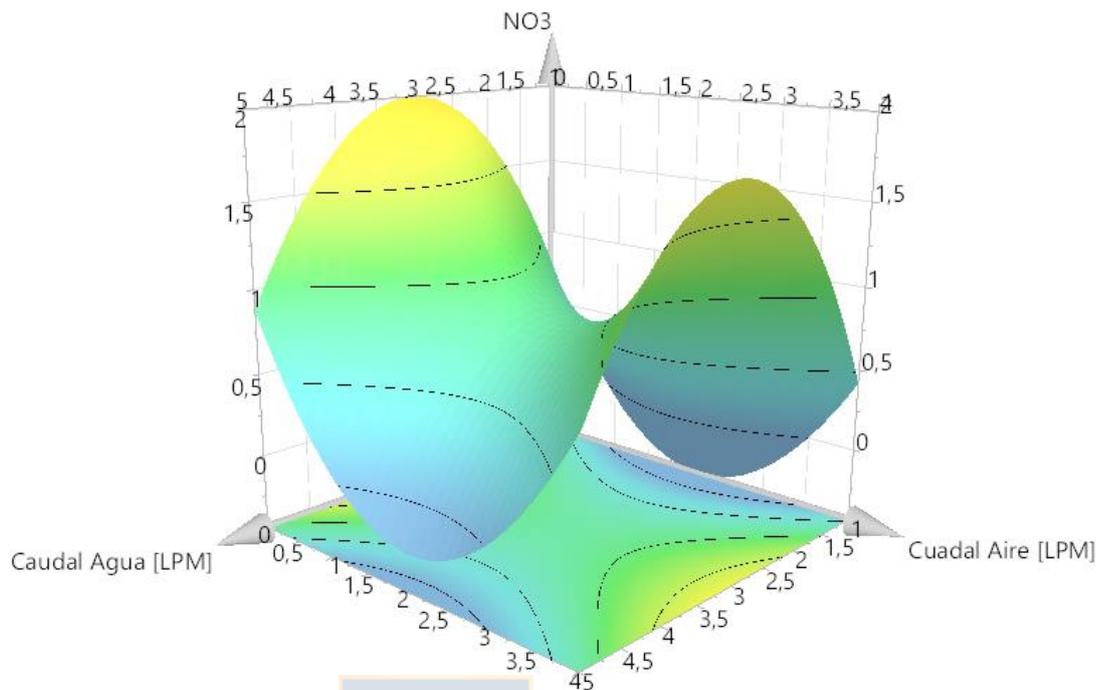


Figura 25 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta NO_3 a las 6 horas, a una irradiancia máxima (30000 LUX)

4.3.6 Hora 6 de experimentación, variable respuesta Fosfato

En el caso de la variable respuesta PO_4 (figura 26, 27 y 18) se visualiza una superficie de respuesta en la cual, a un bajo nivel de irradiancia (500 LUX), los valores máximos de las tasas de depuración fueron obtenidos a un caudal de aire entre 3,6 y 4,0 L/min, mientras que, para el caso del caudal de agua, el rango óptimo de trabajo se encontraba entre 1,0 L/min y 3,5 L/min. A un valor de irradiancia de 15250 LUX (nivel medio), se observó que la máxima tasa de depuración se alcanzó en un rango de caudal de aire entre 3,7 L/min y 4,0 L/min mientras que el caudal de agua se encontraba entre 2,1 L/min y 4,5 L/min. Cuando la irradiancia se utilizó a su máximo valor (30000 LUX), las máximas tasas de depuración se alcanzaron con un caudal de aire de entre 3,6 L/min y 4 L/min y un caudal de agua entre los 2,8 L/min hasta los 5,0 L/min.

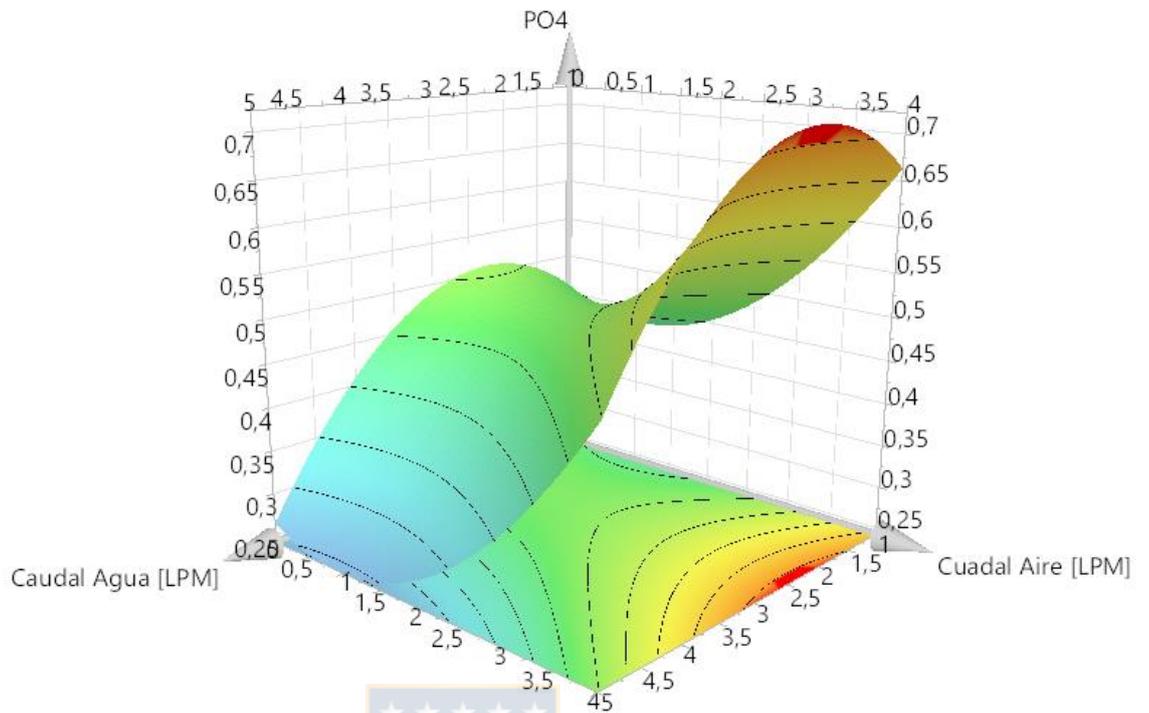


Figura 26 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO₄ a las 6 horas, a una irradiancia mínima (500 LUX).

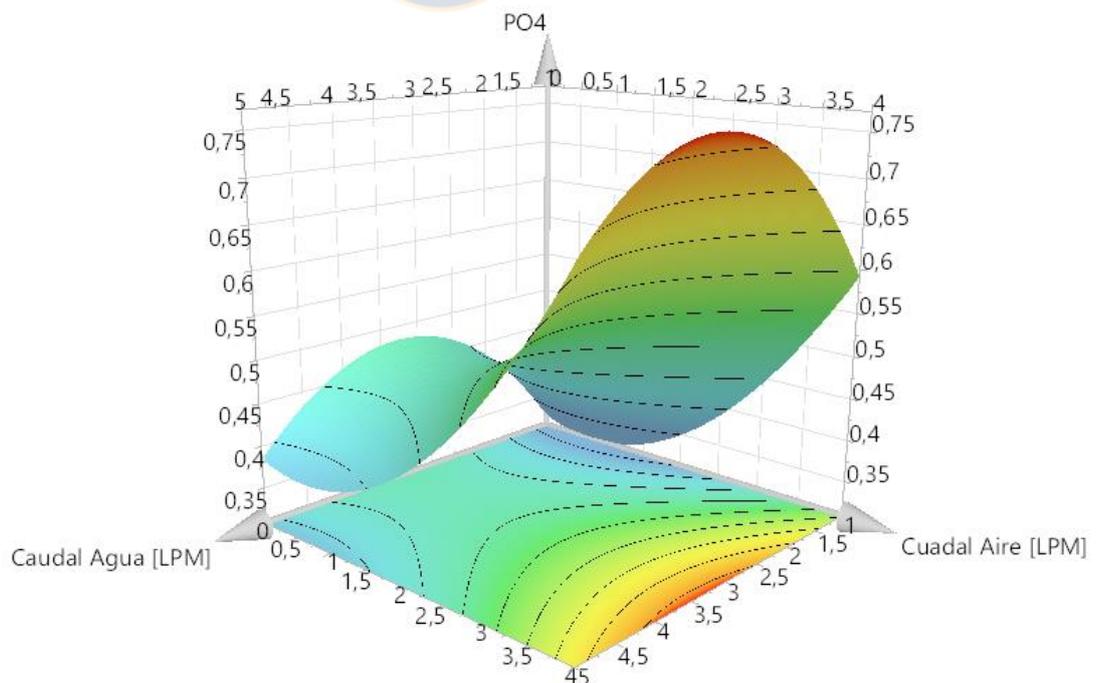


Figura 27 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO₄ a las 6 horas, a una irradiancia media (15250 LUX).

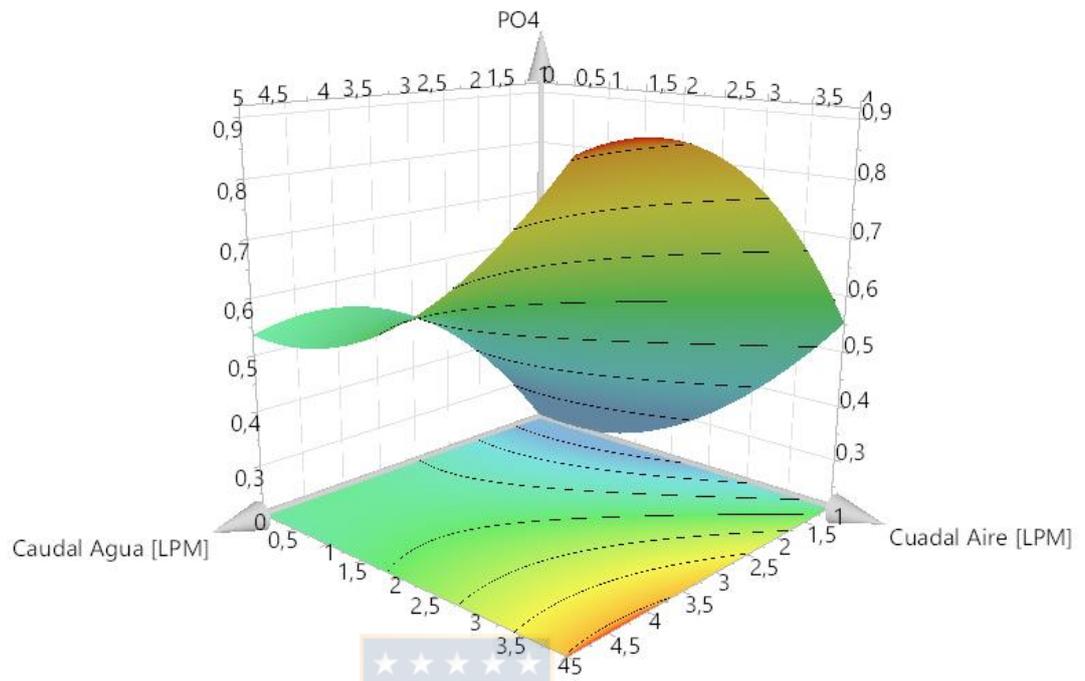


Figura 28 Superficie de respuesta correspondiente a la variable respuesta PO₄ a las 6 horas, a una irradiancia máxima (30000 LUX).

5.0 DISCUSIÓN

5.1 Diseño Experimental

Los experimentos propuestos por el programa Modde v12.0 fueron realizados con éxito; sin embargo, las variables respuestas -tasas de depuración- obtenidas en las réplicas -N15, N16 y N17- cuyas condiciones corresponden a una irradiancia de 15250 LUX, un caudal de aire de 2 L/min y un caudal de agua de 3 L/min, no resultaron ser las que se esperaba, con una amplia variación en los valores de las variables respuesta. Esta situación provocó que el programa Modde v12.0 no pudiera validar la reproducibilidad del modelo, por lo tanto, el análisis estadístico proporcionado por el programa no puede ser considerado válido. La dispersión de estos datos resultó en un valor P sustancialmente mayor a 0,05, considerando un nivel de confianza del 95%, lo que confirma que este modelo es estadísticamente inválido (Hossain et al., 2018). Sin embargo, el objetivo de la aplicación de este programa radicó en determinar los valores o rango de valores de las variables operacionales o factores donde se maximizarán las variables respuesta. Luego de investigar en profundidad, se observó que el diseño y modelo experimental utilizado en esta investigación no resultaron ser los más convenientes ya que se trabajó con organismos vivos, dependientes de condiciones ambientales, este diseño central de cara compuesta (CCF) no siempre responde bien cuando se trabaja con organismos vivos.

5.2 Experimentos de depuración

Desde las últimas décadas se ha investigado la capacidad de depuración que tienen las microalgas en aguas residuales; más recientemente, Wang et al. (2014) han investigado la capacidad de depuración de algunos cultivos mixotróficos en aguas residuales de acuicultura. En esta investigación, el análisis de la disminución de la concentración de amonio, nitrato y fosfato se realizó en función de las tasas de depuración en cada experimento. Si bien todos los experimentos fueron realizados en un tiempo máximo de 17 horas, los análisis más detallados se realizaron a las horas 4 y 6 debido a que se encontró que las tasas de depuración en estos tiempos fueron superiores a las que se encontraron al finalizar las experiencias.

5.2.3 Depuración de amonio

Los análisis realizados sobre las tasas de depuración de amonio en todos los experimentos sugieren que el experimento 8, evaluado a L30000-A4-C5-, es decir, máxima iluminación, máximo caudal de agua y máximo caudal de aire, fue el más efectivo. Para el caso de la hora 4, los experimentos más eficientes fueron el 12, 13 y 14, cuyas condiciones de cultivo corresponden a L15250-A4-C3, L500-A2-C3 y L30000-A2-C3, respectivamente, en este caso es posible apreciar que los tres experimentos trabajan a un caudal de agua de 3 L/min, mientras que para el caso de los experimentos 13 y 14 comparten el caudal de aire (2 L/min), en el caso de la irradiancia los tres experimentos poseen rangos distintos. Coincidentemente, el análisis de la hora 6 de experimentación también concluyó que los experimentos 12, 13 y 14 fueron los más eficientes, pero se sumó el número 8. Esto se refuerza mediante las figuras 11, 12 y 13 donde es posible visualizar las diferencias en la forma de la superficie de respuesta que indica el efecto de cada uno de los factores aplicados por sí solos. También es posible denotar que tres de los cuatro experimentos (12, 13 y 14) fueron evaluados a un caudal de agua de 3 L/min, mientras que en el experimento 8 el caudal de agua fue mayor, de 5 L/min, esto puede interpretarse como que el caudal de 5 L/min, actúa más bien como factor de agitación por agua, sumado a la agitación por aire, lo que significa mayor transferencia de masa. El caudal de aire para los experimentos 8 y 12 es de 4 L/min, mientras que los experimentos 13 y 14 es de 2 L/min. En el caso de la iluminación, es posible ver que el experimento 8 y 14 poseen valores de irradiancia de 30000 LUX, mientras que los experimentos 12 y 13 tienen valores de irradiancia de 15250 y 500 LUX, respectivamente. Analizando esta situación del punto de vista operacional, el fundamento de un sistema continuo es mantener una circulación constante del agua para generar agitación al medio contribuyendo a la homogeneización del sistema. Por lo tanto, tener un caudal alto (5 L/min) implicaría un mayor costo energético comparado con un caudal medio (3 L/min), debido al costo que implica mantener las bombas hidráulicas funcionando a caudales altos y por largos periodos de tiempo. Este mismo análisis aplica para el caso de la agitación mediante aireación y a la iluminación, donde un mayor caudal de aire -o irradiancia lumínica- significa un mayor costo energético para mantener caudales altos por largos periodos de tiempo.

Una vez mencionado lo anterior, y considerando que son cuatro los experimentos que resultaron ser más eficientes para maximizar el proceso de depuración, se seleccionó el experimento que posea una alta tasa de depuración con un supuesto bajo costo energético (porque no se realizó este análisis económico). Esta descripción corresponde, sin lugar a dudas, al experimento 13 cuyas condiciones de operación son L500-A2-C3, es decir, baja iluminación y caudal medio de aire y de agua. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que también es posible alcanzar máximas tasas de depuración utilizando un rango de caudal de aire entre 2-4 L/min, mientras que para el caudal de agua todos los tratamientos seleccionados funcionaron con un caudal de 3 L/min o en el rango entre 2,2-4,9 L/min según superficie de respuesta (figura 11). Para la iluminación, el valor respondió al nivel más bajo evaluado (500 LUX); sin embargo, también fue posible alcanzar altas tasas de depuración con niveles de iluminación medios (15250 LUX) y altos (30000 LUX), pero considerando el aumento del consumo energético que implicaría aumentar la irradiancia, se recomienda trabajar en rangos entre 500-15250 LUX.

5.2.4 Depuración de nitrato

El análisis realizado sobre las tasas de depuración de nitrato sugiere que los experimentos 8, 11, 12, 13 y 14 evaluados a la 17^{ta} hora de experimentación fueron los más eficientes; todos estos experimentos poseen tasas de depuración similares; sin embargo, el experimento 13 mostró la mayor tasa de depuración (1,480 mg L-1h-1*h), en condiciones de L500-A2-C3, es decir, baja irradiancia, y caudales de aire y agua en el punto medio. En el caso de la hora 4 de experimentación, los experimentos 8, 10 y 11 mostraron mejores resultados, siendo el experimento 11 (L15250-A0-C3) con la mejor tasa de depuración correspondiente a 3,780 mg L-1h-1*h, seguido por el experimento 8 (L30000-A4-C5) con una tasa de depuración de 3,340 mg L-1h-1*h, y por el experimento 10 (L15250-A2-C5) con la tasa de depuración más baja, de 3,260 mg L-1h-1*h. En el caso de la hora 6 de experimentación, el experimento que destaca por su tasa de depuración superior fue el experimento 11 (L15250-A0-C3) con tasa de depuración de 3,740 mg L-1h-1*h. Al analizar estos resultados se puede ver que el factor común en estos casos es el experimento 11, que posee tasas de depuración superiores a los otros experimentos. Desde el punto de vista operacional, mantener el

reactor funcionando durante 17 horas puede resultar en un alto costo debido a la energía consumida; por lo tanto, que se decidió evaluar a la hora 4 y 6 de experimentación. Al analizar -sin evaluar- el costo de operación del experimento 11 resultó ser la opción preferida para la depuración de nitrato, ya que posee irradiancia media, caudal de agua medio y no necesitó caudal de aire. Esto significa que podría utilizar una irradiancia media (15250), con un costo energético medio, comparado con el experimento 8 que utilizó una irradiancia en su valor máximo (30000 LUX). Además, el experimento 11 operó a un nivel medio de caudal de agua (3 L/min) comparado con el experimento 10 que lo hizo con un caudal de agua máximo (5 L/min) sugiriendo un mayor costo energético por el uso de las bombas hidráulicas, dado que, a mayor caudal, la bomba necesita más energía para impulsarlo en comparación a si se impulsa un caudal de 3 L/min. En el experimento 11 no se usó aire lo que propone un mayor ahorro de energía.

Una vez mencionado lo anterior, y considerando los experimentos 8, 10 y 11 que obtuvieron las máximas tasas de depuración, a las 17 hrs, se sugirió observar el experimento que poseía las mejores tasas de depuración y que además suponga ser costo efectivo. La descripción anterior corresponde sin lugar a dudas al experimento 11, cuyas condiciones corresponden a L15250-A0-C3. Evaluando los resultados, al modificar el caudal de agua es posible observar que se alcanzaron similares tasas de depuración a 1 y 5 L/min, según gráficas de superficie de respuesta del nitrato. Considerando el costo de operación del fotobiorreactor, se recomienda utilizar iluminación media (15250 LUX), caudal de aire nulo (0 L/min) y caudal de agua mínimo (1 L/min).

5.2.5 Depuración fosfato

El análisis de los resultados sobre la tasa de depuración de fosfato de todos los experimentos hasta finalizar las 17hs sugiere que a los experimentos 6, 7 y 8 fueron los más eficientes, obteniendo la mejor tasa de depuración el experimento 6 (L30000-A0-C5), con un valor de 0,445 mg L-1h-1*h. En el caso de la hora 4 de experimentación, los experimentos con mejores tasas de depuración fueron los experimentos 12 (L15250-A4-C3) y 13 (L500-A2-C3) cuyas tasas de depuración corresponden a 0,827 mg L-1h-1*h y 0,804 mg L-1h-1*h, respectivamente, siendo el

segundo de estos dos experimentos el que posee mejor tasa de depuración entre los dos por una diferencia leve. Para el caso de la hora 6 de experimentación, los experimentos candidatos con mejores tasas de depuración corresponden a los experimentos 8 (L30000-A4-C5), 11 (L15250-A0-C3), 12 (L15250-A4-C3) y 13 (L500-A2-C3), cuyas tasas de depuración fueron 0,832 mg L-1h-1*h, 0,884 mg L-1h-1*h, 0,830 mg L-1h-1*h y 0,824 mg L-1h-1*h, respectivamente. En este caso, se puede ver que las tasas de depuración de los experimentos seleccionados resultaron muy similares entre sí; por lo tanto, se requiere de un análisis desde un punto de vista operacional para sugerir la o las experiencias con las condiciones de operación óptimas para lograr las tasas de depuración más altas. Nuevamente, se evalúa los experimentos por su eficiencia a las 4 o 6 horas de operación. También aquí es posible denotar que los experimentos 12 y 13 son los más eficientes a las 4 horas de operación, pero a la hora 6 el experimento 11 con una tasa de 0,884 mg L-1h-1*h mostró mejores rendimientos. Considerando suponer los costos energéticos que implica mantener una irradiancia alta (30000 LUX), caudal de aire máximo (4 L/min) y un caudal de agua máximo (5 L/min), se decidió descartar el experimento 8 (L30000-A4-C5). Al analizar las condiciones de los experimentos 11 (L15250-A0-C3), 12 (L15250-A4-C3) y 13 (L500-A-2-C3), se pudo determinar condiciones o rangos de condiciones donde la tasa de depuración de fosfato fue mayor. Estas condiciones corresponden a un valor de iluminación en un rango entre 500-15250 LUX, un caudal de aire de entre 0-4 L/min y un caudal de agua operando a 3 L/min. Si se consideran los rangos obtenidos en las superficies de respuestas de fosfato, además de las posibles consideraciones de costos energéticos, se observa que la iluminación se encuentra entre 500 y 15250 LUX, el caudal de aire entre 2 y 4 L/min, y el caudal de agua operaría entre 1,5 y 3,5 L/min. Lo que indica que estos rangos son favorables y convenientes para su utilización.

5.3 Efecto de los factores

Si bien cada uno de los factores estudiados en esta investigación supone un efecto particular en este tipo de sistemas, en esta investigación se observó una interacción entre ellos, siendo difícil de determinar el que contribuyó más al proceso de depuración. Todos ellos se encuentran íntimamente interrelacionados entre sí, por el hecho de tratarse de un sistema biológico, además de las condiciones de experimentación. El efecto producido por la iluminación reside en que entrega la

energía lumínica necesaria para que los organismos fototróficos realicen eficientemente el proceso de fotosíntesis, sin llegar al punto de fotoinhibición a causa del exceso de luz (Huang, Jiang, Wang, & Yang, 2017). Sin embargo, la eficiencia de la transferencia de luz depende de la agitación en el medio.

El efecto que produce la agitación por aire se refiere a la capacidad de mantener la mezcla homogénea (biomedios-medio) para que los nutrientes presentes en el agua residual sean captados eficientemente por los microorganismos presentes en los biomedios. Es decir, la agitación reduce las barreras difusionales de los nutrientes para alcanzar los microorganismos. La agitación también contribuye a evitar la acumulación ya sea de CO₂ y O₂ -mejorando la transferencia de masa- que puede resultar en estrés oxidativo tanto para las microalgas como para las bacterias que también están presentes en el biomedio. La tercera característica se relaciona con la capacidad de proporcionar breves ciclos de luz/oscuridad (Gupta, Lee, & Choi, 2015). Lo que para las microalgas es favorable, ya que al ser organismos fotosintéticos que dependen de las variaciones de luz, y esto tiene un efecto a nivel del metabolismo celular.

El efecto producido por el caudal del agua se basa, principalmente, en el tiempo de retención en el bioreactor. La recirculación del líquido a depurar, busca generar el efecto de un sistema continuo; al manejar caudales de ingreso de agua a casi el 90% (5 L/min) del volumen total del sistema (6 L) en un periodo de tiempo acotado, lo que se obtiene es una contribución a la homogeneización dentro del sistema y a la suspensión de los biomedios en el caso que la agitación por aire no fuese suficiente o bien, que no existiera agitación por aire. Esto resulta favorable ya que, al haber mayor agitación, ya sea por ingreso de aire o ingreso de agua, existe una mayor mezcla del medio, por ende, una mayor transferencia de masa, lo que se traduce finalmente en que los biomedios y los microorganismos contenidos en su interior, tengan mayor contacto con los nutrientes del medio, por ende, mayor probabilidad de que sean absorbidos o transformados por los microorganismos.

6.0 CONCLUSIÓN

- El diseño de experimentos considerado para un modelo de cara central compuesta no respondió bien a sistemas que utilizan organismos biológicos debido a que no considera todos los factores que influyen en el correcto desarrollo de un fotobiorreactor que cultiva microalgas y bacterias.
- Ya que el diseño experimental de cara central compuesta (CCF) no tuvo similitud en sus puntos centrales, se recomienda utilizar el modelo Box-Behnken, que ya ha sido utilizado para la optimización en cultivos de microalgas.
- No se pudo obtener las condiciones de operación que permitiera obtener los máximos valores de depurar de los tres contaminantes (amonio, nitrato y fosfato) simultáneamente, sino que existen condiciones específicas para cada contaminante.
- Se recomienda trabajar con un valor de luminiscencia de 500 y 15250 LUX, agitación de entre 2 y 4 L/min y caudal de agua entre 2,2 y 5 L/min para depurar amonio.
- Las condiciones operacionales que se recomienda para depurar nitrato corresponden a una luminiscencia de 15250 LUX, sin agitación y caudal de agua entre 1 y 3 L/min.
- Para la depuración de fosfato se recomienda operar con una luminiscencia de entre 500 y 15250 LUX, una agitación entre 2 y 4 L/min y una tasa de retención hidráulica entre 1,5 y 3,5 L/min.
- Ya que las variables operacionales están altamente interrelacionadas, no se puede determinar cuál factor por sí solo influye en este tipo de sistemas biológicos, debido a que solo se presentan resultados favorables en conjunto.

REFERENCIAS

- AKVA-group. (2017). “Land Based Aquaculture-E”, AKVA-group magazine.
- Amavizca, E., Bashan, Y., Ryu, C.-M., A. Farag, M., Bebout, B. M., & De-Bashan, L. E. (2017). Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*. *Nature*.
- Bartoli, M., Nizzolli, D. Naldi, M. Vezzulli, L. Porello, S, Lenzi, M. Viaroli, P. (2005). Inorganic nitrogen control in wastewater treatment ponds from a fish farm (Orbetello, Italy): Denitrification versus *Ulva* uptake. *DSA. Marine Pollution Bulletin* 50. 1386–1397pp.
- Boonchai, R., Seo, G. T., Park, D. R., & Seong, C. Y. (2013). Microalgae Photobioreactor for Nitrogen and Phosphorus Removal from Wastewater of Sewage Treatment Plant. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(6), 407–410.
- Buschmann, A., & Fortt, A. (2005). Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Revista Ambiente y Desarrollo*, 21(3), 58–64.
- Crab, R. Avnimelech, Y. Defoirdt, T. Bossier, P. Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270. pp1–14.
- Davidson, J., Good, C., Welsh, C., & Summerfelt, S. T. (2011). Abnormal swimming behavior and increased deformities in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cultured in low exchange water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 45(3), 109–117.
- 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(12), 2941–2948.
- El Sheshtawy, A., Salah, A., Rahman Ibrahim, M. A., Mocuta, D. N., Turek Rahoveanu, A., & Hossu, A. M. (2017). The Nitrification Capacity of Different Types of Biological Filters An Overview. In *Risk in Contemporary Economy* (pp. 321–328).
- FAO. (2018). *Estado actual de la pesca y acuicultura 2018*. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224pp.
- Fink, J.R., Inda, A.V., Bavaresco, J. et al. *Biol Fertil Soils* (2016) 52: 203.
- Gao, F., Li, C., Yang, Z.-H., Zeng, G.-M., Feng, L.-J., Liu, J., Cai, H. (2016). Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane

- photobioreactor for biomass production and nutrient removal. *Ecological Engineering*, 92, 55–61.
- Grobler, J. M. B., & Wood, C. M. (2018). The effects of high environmental ammonia on the structure of rainbow trout hierarchies and the physiology of the individuals therein. *Aquatic Toxicology*, 195, 77–87.
 - Gupta, P. L., Lee, S. M., & Choi, H. J. (2015). A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 1409–1417.
 - Hepp, C. (2012). Resultados preliminares sobre uso de lodos de pisciculturas sobre suelos agropecuarios de origen volcánico de la Patagonia Occidental (Aysén). Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigación INIA Tamel Aike, Coyhaique, Aysén-Patagonia, Chile. Boletín técnico N° 223. 82 pp.
 - Hernandez, A., Labbé J., (2014). Microalgas, cultivo y beneficios, 49, 157–173.
 - Hossain, S. M. Z., Alnoaimi, A., Razzak, S. A., Ezuber, H., Al-Bastaki, N., Safdar, M., Hossain, M. M. (2018). Multiobjective optimization of microalgae (*Chlorella* sp.) growth in a photobioreactor using Box-Behnken design approach. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96(9), 1903–1910.
 - Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., & Yang, C. (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 3(3), 318–329.
 - Ji, X., Jiang, M., Zhang, J., Jiang, X., & Zheng, Z. (2017). The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. *Bioresource Technology*.
 - Jiménez, A. (2006). Estudios de Post-grado en el Diseño de Sistemas de Recirculación Acuícola. Universidad Nacional Agraria la Molina. México. 5pp.
 - Kandilian, R., Jesus, B., Legrand, J., Pilon, L., & Pruvost, J. (2017). Light transfer in agar immobilized microalgae cell cultures. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 198, 81–92.
 - Leyva, L., Diaz, L., & Gortares, P. (2016). Remoción de contaminantes en aguas residuales acuícolas. In *Congreso Nacional AMICA* (pp. 1–4).
 - López-Rosales, L., Sánchez-Mirón, A., Contreras-Gómez, A., García-Camacho, F., Battaglia, F., Zhao, L., & Molina-Grima, E. (2019). Characterization of bubble column photobioreactors for shear-sensitive microalgae culture. *Bioresource Technology*, 1–9.
 - Mook WT, Chakrabarti MH, Aroua MK, Khan GMA, Ali BS, Islam Ms, Hassan MA. (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

- Oladoja, N.A., R.O.A. Adelagun, A.L. Ahmad and I.A. Ololade.(2017). Green reactive material for phosphorus capture and remediation of aquaculture wastewater. *Process Safety and Environmental Protection* 98: 296-308.
- Pham, H.-M., Kwak, H.S., Hong, M.-E., Lee, J., Chang, W.S., Sim, S.J., (2017). Development of an X-shape airlift photobioreactor for increasing algal biomass and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 239, 211–218.
- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., & Martins, F. G. (2017). Photobioreactor design for microalgae production through computational fluid dynamics: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(September 2016), 248–254.
- Quiñones, J. (2018). Tratamiento de aguas de acuicultura y producción de biomasa microalgal mediante fotobiorreactores. Tesis de pregrado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Concepción, Chile.
- Ramli, N. M., Verdegem, M., Yusoff, F. M., Zulkifely, M. K., & Verreth, 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.
- Rodríguez, S. (2018). Fitodepuración mixotrófica. Tratamiento de RILES de acuicultura para producción sustentable de ácidos grasos. Tesis de pregrado, Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Chile.
- Sánchez Iván, O., Dolly Revelo, R., Álvaro Burbano, M., Roberto García, C., Camilo Guerrero, R., Diana Beltrán, T., & Luis Benavides, M. (2016). Performance of different biofilters in a recirculating system for rainbow trout farming. *Revista MVZ Córdoba*, 21(2), 5426–5440.
- Santos, AM, YG Arechavala, C Martín-Sastre. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales de mecánica y electricidad* 91 (1), 20-28
- Shen, L., Damascene Ndayambaje, J., Murwanashyaka, T., Cui, W., Manirafasha, E., Chen, C. Lu, Y. (2017). Assessment upon heterotrophic microalgae screened from wastewater microbiota for concurrent pollutants removal and biofuel production. *Bioresource Technology*, 245, 386–393.
- Vo, H. N. P., Ngo, H. H., Guo, W., Nguyen, T. M. H., Liu, Y., Liu, Y, Chang, S. W. (2019). A critical review on designs and applications of microalgae-based photobioreactors for pollutants treatment. *Science of the Total Environment*, 651, 1549–1568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.282>
- Wang, J., Yang, H. & Wang, F. (2014). *Appl Biochem Biotechnol* 172: 3307.

- Wang, S. K., Stiles, A. R., Guo, C., & Liu, C. Z. (2014). Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 550–559.
- Whitton, R., Santinelli, M., Pidou, M., Ometto, F., Henderson, R., Roddick, F, Jefferson, B. (2018). Tertiary nutrient removal from wastewater by immobilised microalgae: impact of wastewater nutrient characteristics and hydraulic retention time (HRT). *H2O pen Journal*, 1(1), 12–25.
- Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2013). Design of Photobioreactors for Algal Cultivation. *Biofuels from Algae* (Second Edition). Elsevier B.V.
- Zurita V. (2018). Radiografía del agua: Brecha y Riesgos Hídricos en Chile. *Escenarios Hidricos 2030*, 1, 142.



ANEXOS

Condiciones de Cultivo

Tabla 5: Esta tabla indica los valores de algunas de las variables que se controlaron durante la fase experimental.

Parámetro	Valor	Unidad
Luz	500-15250-30000	LUX
Flujo aire	1-3-5	L/min
Flujo agua	0-2-4	L/min
Temperatura	8-12	°C
Fotoperiodo	24/0	Horas
pH	6,5-7,5	

Tabla 6: Esta tabla indica las concentraciones promedio junto a su desviación estándar de los nutrientes amonio, nitrato y fosfato, en función de los días de experimentación

Días	Amonio		Nitrato		Fosfato	
	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.
0	1,6072	0,0101	48,1180	1,3368	6,6015	0,3459
2	1,8140	0,0312	47,1720	0,9388	7,3204	0,0000
4	1,6180	0,0101	54,9407	1,3368	6,6015	0,3459
6	1,6072	0,0101	48,4400	1,3368	6,5120	0,3459
8	1,8140	0,0312	47,1720	0,9388	6,9610	0,0000
10	1,6094	0,0267	48,3463	1,9034	6,8340	0,0674
12	1,6927	0,1245	46,3563	1,9034	6,3090	0,0674
14	1,7544	0,0267	48,3463	1,9034	6,1070	0,0674
16	1,6284	0,0137	49,7917	9,9805	6,8711	0,0778
18	1,7936	0,0137	52,3427	5,3898	6,8711	0,0778
20	1,6336	0,0137	49,2180	6,7260	6,8711	0,0778
22	1,6710	0,0528	48,6173	1,3640	7,0059	0,3949
24	1,6393	0,0528	48,6173	1,3640	7,3800	0,3949
26	1,7468	0,1416	48,6173	1,3640	6,8940	0,3949
28	1,8140	0,0312	47,1720	0,9388	7,3204	0,0000
30	1,8912	0,4131	50,1530	1,1813	6,6464	0,0000
32	1,7123	0,3131	50,1530	1,1813	6,9844	0,0238

ANOVA 4 Horas

Tabla 7: ANOVA 4 Horas

TAN	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	17	1,03599	0,0609406			
Constant	1	0,990609	0,990609			
Total corrected	16	0,0453806	0,00283629			0,0532568
Regression	9	0,0214891	0,00238768	0,69957	0,698	0,0488639
Residual	7	0,0238915	0,00341307			0,0584215
Lack of Fit (Model error)	5	0,0209828	0,00419656	2,88558	0,277	0,0647809
Pure error (Replicate error)	2	0,00290865	0,00145432			0,0381356
	N = 17	Q2 =	-2,338	Cond. no. =	4,438	
	DF = 7	R2 =	0,474	RSD =	0,05842	
		R2 adj. =	-0,203			
NO ₃	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	17	76,3848	4,49322			
Constant	1	54,7565	54,7565			
Total corrected	16	21,6283	1,35177			1,16266
Regression	9	11,8191	1,31323	0,937141	0,547	1,14596
Residual	7	9,8092	1,40131			1,18377
Lack of Fit (Model error)	5	9,30455	1,86091	7,37494	0,124	1,36415
Pure error	2	0,504657	0,252329			0,502323

(Replicate error)						
	N = 17	Q2 =	-2,772	Cond. no. =	4,438	
	DF = 7	R2 =	0,546	RSD =	1,184	
		R2 adj. =	-0,037			
PO₄	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	17	6,23619	0,366835			
Constant	1	5,16056	5,16056			
Total corrected	16	1,07564	0,0672272			0,259282
Regression	9	0,59863	0,0665144	0,976091	0,525	0,257904
Residual	7	0,477006	0,0681437			0,261043
Lack of Fit	5	0,469535	0,0939071	25,1416	0,039	0,306443
(Model error)						
Pure error	2	0,00747026	0,00373513			0,0611157
(Replicate error)						
	N = 17	Q2 =	-0,795	Cond. no. =	4,438	
	DF = 7	R2 =	0,557	RSD =	0,261	
		R2 adj. =	-0,014			

ANOVA 6 Horas

Tabla 8: ANOVA 6 Horas

TAN	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	17	0,685594	0,040329			
Constant	1	0,652641	0,652641			
Total corrected	16	0,0329529	0,00205956			0,0453823
Regression	9	0,0125844	0,00139827	0,480541	0,849	0,0373934
Residual	7	0,0203685	0,00290978			0,0539424
Lack of Fit (Model error)	5	0,0128042	0,00256084	0,677087	0,687	0,0506047
Pure error (Replicate error)	2	0,00756429	0,00378214			0,0614991
	N = 17	Q2 =	-2,162	Cond. no. =	4,438	
	DF = 7	R2 =	0,382	RSD =	0,05394	
		R2 adj. =	-0,413			
NO ₃	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	17	26,8519	1,57952			
Constant	1	16,3078	16,3078			
Total corrected	16	10,5441	0,659004			0,81179
Regression	9	5,93615	0,659572	1,00197	0,511	0,81214
Residual	7	4,60792	0,658274			0,811341
Lack of Fit (Model error)	5	4,59289	0,918578	122,257	0,008	0,958425

Pure error	2	0,015027	0,00751351			0,0866805
(Replicate error)						
	N = 17	Q2 =	-2,248	Cond. no. =	4,438	
	DF = 7	R2 =	0,563	RSD =	0,8113	
		R2 adj. =	0,001			
PO₄	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	17	6,81573	0,400925			
Constant	1	5,91699	5,91699			
Total corrected	16	0,898736	0,056171			0,237004
Regression	9	0,299899	0,0333221	0,389513	0,906	0,182543
Residual	7	0,598837	0,0855481			0,292486
Lack of Fit	5	0,566307	0,113261	6,9635	0,13	0,336543
(Model error)						
Pure error	2	0,03253	0,016265			0,127534
(Replicate error)						
	N = 17	Q2 =	-1,824	Cond. no. =	4,438	
	DF = 7	R2 =	0,334	RSD =	0,2925	
		R2 adj. =	-0,523			

