

**Producción de biogás a partir de  
Microalgas y Cianobacterias:  
Efecto de los pretratamientos térmico y  
alcalino**

**MEMORIA**

**Autor:** Alejandro González Calzada

**Director:** Ivet Ferrer Martí / María Solé Bundó

**Convocatoria:** Octubre, 2016

**Master en Ingeniería de la Energía**



## Màster en Enginyeria de l'Energia

### **Sol·licitud d'acceptació de presentació del Treball Final de Màster i sol·licitud de defensa pública.**

Alumne: Alejandro González Calzada

DNI: 05328367 - A

Títol: "Producción de biogás a partir de microalgas y cianobacterias: efecto de los pretratamientos térmico y alcalino"

Directora: Ivet Ferrer Martí

---

#### **Acceptació de la presentació del Treball:**

Confirmo l'acceptació de la presentació del Treball Final de Màster.

Per a que consti,



Ferrer Martí, Ivet

---

#### **Sol·licito:**

La defensa pública del meu Treball Final de Màster.

Per a que consti,



González Calzada, Alejandro

Barcelona, 14 de Octubre de 2016



## **Agradecimientos**

En primer lugar, a mis tutoras Ivet Ferrer y María Solé.

Ivet, gracias por tu implicación y apoyo sin los que no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

María, gracias por tu inestimable apoyo, dedicación y ayuda cada día en el laboratorio y en la realización de este trabajo.

A mis padres, Rosario y Víctor, por su amor, paciencia y comprensión en todo momento. Sobran las palabras.

A María Illanes, gracias por su confianza y complicidad. Mari, eres una persona muy importante para mí.

A mis abuelos Marina y Vicente. Gracias porque, aunque ya no estén conmigo, les tengo muy presentes.

A mis hermanos María y Manuel, gracias por alegrarme el día a día.

Al resto de mi familia por su amor y afecto incondicional. A mis abuelos por su ejemplaridad, a mis tías por su cariño y a mis primas por su complicidad.

A mi compañera de piso Luisa por su apoyo, por sus consejos y su compañía cada día. Gracias por haber hecho de nuestra convivencia algo especial. Eres una gran amiga.

A mis amigos Sergio, Daniel, Javier, Bea y Susana por su compañía y su amistad incondicional.

A Lara de Miguel por todos los buenos momentos. Gracias Lara por haberme apoyado siempre y aconsejado en todo momento.

A mis demás compañeros de Universidad y amigos de la infancia.



# **Producción de biogás a partir de Microalgas y Cianobacterias: Efecto de los pretratamientos térmico y alcalino**

**Autor: Alejandro González Calzada**

**Tutores: Ivet Ferrer Martí y María Solé Bundó**

**Palabras clave:** biogás, aguas residuales, microalgas, cianobacterias, lagunas de alta carga, pretratamiento, digestión anaeróbica.

## **Resumen**

La implementación de las microalgas en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) en sistemas de tratamiento terciario es un recurso ampliamente estudiado en los últimos años. Mediante la actividad biológica de la biomasa algal se eliminan los nutrientes inorgánicos, como el nitrógeno o los fosfatos, para hacer frente a la posible eutrofización que puede generar el efluente de agua vertido en el medio. Por otra parte, la producción de biomasa algal puede ser utilizada para la generación de energía. Para mejorar la viabilidad económica y ambiental del proceso para el cultivo de microalgas, actualmente se está integrando la depuración de aguas en los sistemas con este fin, ya que favorece la producción de biomasa.

Se han estudiado diversas técnicas para convertir este tipo de biomasa en biocombustibles, especialmente la digestión anaeróbica es el proceso más aplicado gracias a su simplicidad. Su resultado es la generación de biogás, que puede ser utilizado en la propia estación depuradora para su funcionamiento. No obstante, las microalgas presentan un importante factor limitante en este proceso: la resistencia de su pared celular a ser degradada, lo cual reduce la producción final de biogás. Por este motivo, se están investigando varios pretratamientos y técnicas para mejorar su rentabilidad.

En esta línea de investigación se enmarca el presente trabajo, donde se plantea el empleo de pretratamientos y la digestión de microalgas y cianobacterias con fangos digeridos. Estos últimos tienen una característica inherente importante: la aportación de las bacterias necesarias para realizar el proceso de digestión anaeróbica. Así, se espera que las bacterias encargadas de este proceso, después de ser liberadas, ayuden a garantizar el aumento de la producción energética de las microalgas y las cianobacterias.

El estudio ha llevado a cabo el análisis de varios pretratamientos entre microalgas y cianobacterias con fangos digeridos aplicando 75 °C de temperatura y dos compuestos químicos: Cal y Sosa, en dos concentraciones diferentes (4% y 10%). Inicialmente se ha llevado a cabo el pretratamiento para favorecer la solubilización de la materia orgánica. Seguidamente, se ha ensayado en discontinuo la digestión anaeróbica para valorar la digestión de los dos sustratos: microalgas y cianobacterias, ambas con fangos digeridos.

Los resultados obtenidos indican que las microalgas se presentan como un buen sustrato para realizar el proceso de digestión anaeróbica y que la agresividad del pretratamiento aplicado sobre los sustratos influye notablemente en la producción de metano, siendo el pretratamiento con Sosa al 10 % el que mejores resultados obtiene en el presente estudio, ofreciendo una producción máxima de metano de 250 mL CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato, en este caso microalgas.

Por lo tanto, y a la vista de los resultados obtenidos, la aplicación de estos pretratamientos sobre el sustrato microalgal y el uso de fangos digeridos generados durante el proceso de purificación de aguas residuales se presentan como una buena opción para la producción de energía en las estaciones EDAR.

# **Biogas production from Microalgae and Cyanobacteria: Effect of thermic and thermochemical pretreatments**

**Author: Alejandro González Calzada**

**Tutors: Ivet Ferrer Martí y María Solé Bundó**

**Key words:** biogas, wastewater, microalgae, cyanobacteria, high rate ponds, pretreatments, anaerobic digestion.

## **Abstract**

The implementation of microalgae in wastewater treatment plants as tertiary treatment system is a technique widely studied during last years. By means of microalgae biological activity, inorganic nutrients, as nitrogen and phosphates, are eliminated in order to avoid the possible eutrophication caused by water effluent discharged on the environment.

On the other hand, algae biomass production can be used to generate energy. For the purpose of improving economic and sustainable viability of microalgae harvesting process, currently wastewater treatment is integrated in the system in charge of this objective, due to favour biomass production.

A wide range of techniques has been studied in order to convert this type of biomass into biofuel, especially anaerobic digestion is the process more applied for its simplicity. The results are biogas production, which can be used in wastewater treatment plants for its operation process. Nevertheless, microalgae have an important limiting factor: the resistance of its cell wall against being degraded, which reduces final biogas production. Thus, pretreatments and techniques are being investigated to improve its profitability.

The present study follows this investigation line, which suggests the use of pretreatment and a digestion of microalgae and cyanobacteria with digested wastewater sludge. This component has an important inherent property, the contribution of bacteria needed to perform the process of anaerobic digestion. This, it is expected that the bacteria responsible for this process, after being released, also help to ensure an increase in energy production of microalgae and cyanobacteria.

The study has been conducted the analysis of several pretreatments between microalgae and cyanobacteria and digested sludge applying them 75 °C of temperature and two chemicals: CaO and NaOH, both at two different concentrations (4% and 10%). Initially, pretreatment is carried out to promote the solubilisation of organic matter. Then, the Batch experiment was tested in order to assess the anaerobic digestion of the two substrates: microalgae and cyanobacteria, both mixed with digested sludge.

The obtained results show that microalgae are presented as a very good substrate for the anaerobic digestion process and that the aggressiveness of the pretreatment applied to the substrate strongly influences in methane production. In addition, pretreatment with 10% sodium hydroxide (NaOH) shows the best results obtained in the present study with a maximum methane production of 250 mL CH<sub>4</sub> / g VS of microalgae.

Therefore, and in the light of the results obtained, the application of these pretreatments on the microalgae substrate and using digested sludge generated during the wastewater purification process (WWPP), is presented as a good option for energy production in WWPP's.



## Índice General

<b>1.</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>2</b>
<b>3.</b>	<b>Estado del arte .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1.</b>	<b>Evolución histórica de la investigación sobre las microalgas .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2.</b>	<b>La biomasa algal .....</b>	<b>4</b>
3.2.1.	Composición y características.....	5
3.2.2.	El papel de la biomasa algal en el tratamiento de aguas residuales.....	6
3.2.3.	Producción de energía a partir de las microalgas.....	10
3.2.4.	Digestión anaeróbica y factores limitantes de las microalgas.....	11
3.2.5.	Aplicación de pretratamientos en la digestión anaeróbica .....	13
<b>4.</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1.</b>	<b>Planta experimental de fuente de microalgas y cianobacterias .....</b>	<b>16</b>
4.1.1.	Lagunas de alta carga (HRAP).....	16
4.1.2.	Fotobiorreactor.....	19
<b>4.2.</b>	<b>Ensayo en discontinuo de digestión anaerobia.....</b>	<b>20</b>
4.2.1.	Condiciones del ensayo .....	20
4.2.2.	Preparación de las muestras.....	23
4.2.3.	Preparación de los materiales .....	25
4.2.4.	Aplicación de los pretratamientos.....	25
4.2.5.	Montaje .....	26
<b>4.3.</b>	<b>Métodos analíticos.....</b>	<b>30</b>
4.3.1.	Parámetros de la caracterización de los sustratos .....	30
4.3.2.	Análisis proximal .....	34
4.3.3.	Cuantificación y análisis de la composición del biogás.....	40
4.3.4.	Aplicaciones.....	42
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.</b>	<b>Selección de la cantidad del reactivo químico para el tratamiento termoquímico .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.</b>	<b>Ensayo de aplicación de los pretratamientos térmicos y alcalino-térmico en los sustratos a utilizar en la digestión. ....</b>	<b>45</b>
5.2.1.	Características iniciales de los sustratos.....	45
5.2.2.	Pretratamiento térmico y alcalino-térmico: Caracterización de los estratos después del pretratamiento.....	46
<b>5.3.</b>	<b>Determinación del potencial de biogás a partir de la digestión de los sustratos fangos digeridos. ....</b>	<b>54</b>
5.3.1.	Efecto del pH en el ensayo discontinuo de digestión anaerobia.....	54
5.3.2.	Estudio de la producción de metano .....	55
5.3.3.	Estudio de la relación entre la solubilización de la materia orgánica de las microalgas frente a la producción de metano. ....	63
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y Líneas de futuro.....</b>	<b>65</b>
<b>6.1.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>65</b>
<b>6.2.</b>	<b>Líneas de futuro .....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>67</b>

## Índice de Figuras

### 3. Estado del arte

- Figura 3.1** Alzado de una laguna de alta carga (HRAP) con adición de dióxido de carbono (Park et al., 2011). ..... 7
- Figura 3.2.** Principio de oxigenación fotosintética en el proceso de la eliminación de materia (Rawat et al., 2011)..... 9

### 4. Materiales y métodos

- Figura 4.1.** Esquema del proceso de tratamiento de las lagunas de alta carga. .... 17
- Figura 4.2.** Esquema de una laguna de alta carga: alzado y planta (García et al., 2006). ..... 18
- Figura 4.3.** Fotografía aumentada de la biomasa microalgal desde microscopio..... 18
- Figura 4.4.** Esquema del proceso de tratamiento de agua en el fotobiorreactor y foto del mismo. .... 19
- Figura 4.5.** Fotografía aumentada de la biomasa cianobacteriana desde microscopio. .... 20
- Figura 4.6.** Conos de decantación para la sedimentación de la biomasa algal. .... 23
- Figura 4.7.** Botella-reactor Wheaton, una vez llenada y cerrada. .... 29
- Figura 4.8.** Arriba Crimp y abajo Decapper. .... 30
- Figura 4.9.** Incubadora donde se realiza la digestión anaerobia con las botellas en su interior. .... 30
- Figura 4.10.** Estufa para secar los crisoles a 105 °C. .... 31
- Figura 4.11.** Desecador con los crisoles en su interior. .... 31
- Figura 4.12.** Mufla. .... 32
- Figura 4.13.** Balanza de precisión. .... 32
- Figura 4.14.** Diluciones de las muestras realizadas para el análisis de la DQO. .... 33
- Figura 4.15.** Placa digestora con los tubos de DQO. .... 33
- Figura 4.16.** Espectrofotómetro. .... 33
- Figura 4.17.** Esquema del equipo de extracción Soxlet. "Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido" (A. Caldas)..... 35
- Figura 4.18.** Cartucho de celulosa y solvente impregnado con el sólido..... 35
- Figura 4.19.** Instalación del equipo Soxhlet. .... 35
- Figura 4.20.** Blanco y soluciones de glucosa para realizar la curva estándar preparada. .... 36
- Figura 4.21.** Espectrofotómetro modelo Genesys 8. .... 37
- Figura 4.22.** Muestras colocadas en los digestores..... 39
- Figura 4.23.** Digestión finalizada de las muestras. .... 39
- Figura 4.24.** Equipo de análisis del nitrógeno Kjeldahl. .... 39
- Figura 4.25.** Manómetro para la medida de la presión. .... 41
- Figura 4.26.** Cromatógrafo. .... 42
- Figura 4.27.** Jeringa con aguja cromatográfica..... 42

## 5. Resultados y discusión

<b>Figura 5.1.</b> Composición de las microalgas y las cianobacterias.....	46
<b>Figura 5.2.</b> Comparación de la relación de DQOs/DQO en los dos sustratos microalgas y cianobacterias.....	48
<b>Figura 5.3.</b> Comparación de la concentración de DQO Total en los dos sustratos: microalgas y cianobacterias.....	49
<b>Figura 5.4.</b> Comparación de la pérdida de la DQO en los sustratos microalgas y cianobacterias. ....	50
<b>Figura 5.5.</b> Comparación de la relación de SV/ST en los dos sustratos microalgas y cianobacterias. ....	51
<b>Figura 5.6.</b> Comparación de la concentración de CH en los dos sustratos: microalgas y cianobacterias. ....	52
<b>Figura 5.7.</b> Comparación de la concentración de nitrógeno en los dos sustratos; microalgas y cianobacterias.....	53
<b>Figura 5.8.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato alimentado de microalgas. ....	57
<b>Figura 5.9.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato pretratado de microalgas. ....	57
<b>Figura 5.10.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato de microalgas para el pretratamiento aplicado con Sosa al 10% y control.....	58
<b>Figura 5.11.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato alimentado de cianobacterias. ....	60
<b>Figura 5.12.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato pretratado de cianobacterias.....	61
<b>Figura 5.13.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato de cianobacterias para el pretratamiento aplicado con Sosa al 10% y control. ....	62
<b>Figura 5.14.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato alimentado en función de la materia orgánica degradada (% SV removido). ....	64
<b>Figura 5.15.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato pretratado en función de la materia orgánica degradada (% SV removido).....	64

## Índice de Tablas

### 4. Materiales y métodos

<b>Tabla 4.1.</b> Composición de cada una de las digestiones del ensayo Batch con microalgas. ....	22
<b>Tabla 4.2.</b> Composición de cada una de las digestiones del ensayo Batch con cianobacterias. ....	22
<b>Tabla 4.3.</b> Caracterización inicial de los sustratos de la digestión anaeróbica. ....	24
<b>Tabla 4.4.</b> Cantidades teóricas de cada reactivo a adicionar en cada situación de estudio. ....	28
<b>Tabla 4.5.</b> Cantidades de cada componente para la digestión anaeróbica en cada situación de estudio. ....	28

### 5. Resultados y discusión

<b>Tabla 5.1.</b> Cantidad de reactivo térmico y real adicionado en función de los ST de las microalgas. ....	44
<b>Tabla 5.2.</b> Medida de pH tras adicionar los componentes químicos a 50 °C y transcurridas 24 horas. ....	45
<b>Tabla 5.3.</b> Caracterización inicial de los sustratos y el inóculo. ....	45
<b>Tabla 5.4.</b> Composición de las microalgas utilizadas como sustrato en el ensayo. ....	46
<b>Tabla 5.5.</b> Composición de las cianobacterias utilizadas como sustrato en el ensayo. ....	46
<b>Tabla 5.6.</b> Caracterización de las microalgas tras el pretratamiento. ....	47
<b>Tabla 5.7.</b> Caracterización de las cianobacterias tras el pretratamiento. ....	47
<b>Tabla 5.8.</b> Valores de pH en las botellas Batch: efecto de la disolución tampón. ....	55
<b>Tabla 5.9.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato. ....	56
<b>Tabla 5.10.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> / g SV de sustrato. ...	59
<b>Tabla 5.11.</b> Resultados de la producción de metano en mg CH <sub>4</sub> /g SV de sustrato en función de la materia orgánica degradada (%SV). ....	63

## 1. Introducción

Actualmente las fuentes de energía convencionales comienzan a situarse en un escenario crítico para su futura utilización. Ante este problema planteado ya desde hace años, se han empezado a buscar nuevas maneras para hacer frente a la demanda energética. La biomasa ha resultado ser una de las fuentes de energía que pueden resolver la cuestión sobre cómo la humanidad obtendrá la energía para su vida cotidiana. Después de años de investigación, las microalgas han resultado ser un sustrato de gran interés para la consecución de energía a partir de la digestión anaeróbica, una técnica basada en un proceso biológico que obtiene biogás a partir de la degradación de la materia orgánica.

No obstante, la biomasa algal también puede utilizarse en la resolución de otros problemas generados por el aumento de la población. La acumulación de residuos también se ha convertido en una de las preocupaciones de hoy en día. Principalmente, la disponibilidad de agua es un tema que puede conllevar problemas futuros. Por este motivo, el tratamiento de aguas residuales ha comenzado a ser importante en este sentido, sin tener que mencionar la relevancia que tiene desde un punto de vista ambiental. Precisamente en este campo, es donde la utilización de las microalgas se ha extendido más. Gracias a sus características, pueden limpiar las aguas mediante la fotosíntesis e incorporando la materia en su interior como energía. Este ha sido un punto determinante para la importancia de las microalgas, ya que de esta manera ha permitido integrar la generación de energía en el tratamiento de aguas residuales. Así pues, dos de los principales problemas planteados por la humanidad se pueden solucionar conjuntamente.

Aunque parezca que la biomasa algal tiene grandes ventajas, su composición conlleva un gran inconveniente para su utilización, requiriendo tratamientos previos a la digestión para conseguir buenos rendimientos de generación de biogás. Precisamente en este sentido se enmarca este estudio, para analizar el efecto del tratamiento previo sobre la biomasa microalgal.

Este estudio propone analizar cómo la aplicación de un tratamiento en el sustrato e inóculo puede acabar obteniendo una mejora en la producción de biogás. Los sustratos estudiados en el presente trabajo son microalgas y cianobacterias, provenientes del tratamiento de aguas residuales y empleando fangos digeridos como inóculo. Estos últimos presentan un beneficio para la degradación de la materia en la digestión: aportan las bacterias necesarias para realizar la digestión. De este modo, se espera que bajo unas condiciones específicas estos puedan actuar para mejorar la generación de energía de la biomasa algal. Sin embargo, el éxito de la investigación no está asegurada debido a la alta variabilidad de los factores que condicionan las sinergias entre los compuestos orgánicos. Por otro lado, los tratamientos aplicados son un tratamiento térmico y un tratamiento alcalino-térmico, utilizando dos compuestos químicos diferentes: Cal y Sosa.

## 2. Objetivos

El siguiente objetivo surge de la necesidad de analizar el efecto de los tratamientos previos a la digestión que mejoren la producción de biogás de las microalgas y las cianobacterias. La digestión anaeróbica de estos sustratos tiene un alto potencial para la generación de energía. Ambas son sustratos ampliamente utilizados como tratamiento terciario en el tratamiento de aguas residuales, eliminando de las aguas los nitrógenos y fosfatos causantes de la eutrofización. Por este motivo, la digestión también se utiliza para recuperar estos nutrientes. No obstante, la biomasa algal presenta un factor limitante importante: la rigidez de su pared celular. Esta impide un buen desarrollo del proceso de producción de metano y en este sentido se desea analizar el empleo de los pretratamientos que mejoran su resultado final.

Para la mejora de la producción de metano, se plantea estudiar los pretratamientos y la digestión de microalgas y cianobacterias por separado, ambas con fangos digeridos los cuales harán la función de inóculo. De esta manera, se lleva a cabo un tratamiento térmico y un tratamiento alcalino-térmico, consistente en una sinergia entre un tratamiento térmico y un tratamiento químico mediante la adición de dos compuestos químicos: Cal y Sosa. Esta digestión se puede ver como una opción para reducir costes de infraestructuras en la industria en la que se generan estos efluentes.

Así pues, la hipótesis principal sobre la que trabaja este estudio es la mejora de la solubilización y la producción de metano de las microalgas y las cianobacterias gracias al efecto de los tratamientos previos aplicados a las digestiones de los dos sustratos.

Para poder evaluar la hipótesis planteada, el estudio presenta una serie de objetivos para hacer el análisis correspondiente:

- ✓ Analizar el efecto de los pretratamientos en las microalgas y cianobacterias mezcladas con los fangos digeridos, aplicando tanto el tratamiento térmico como el tratamiento alcalino-térmico. Además, se valorarán las posibles diferencias entre los dos sustratos empleados en la digestión.
- ✓ Estudiar las diferencias de las producciones de metano entre los sustratos y su relación con la solubilización del sustrato debido al uso de cada pretratamiento aplicado previo a la digestión anaeróbica.
- ✓ Comparar las producciones de metano entre digestiones con sustratos pretratados y sin pretratar individualmente.

### 3. Estado del arte

#### 3.1. Evolución histórica de la investigación sobre las microalgas

Actualmente, la recuperación energética de los residuos domésticos está ganando conciencia y puede convertirse en una fuente de energía alternativa al petróleo. La biomasa, obtenida a partir del tratamiento de los residuos, se presenta como un combustible con un gran potencial para producir biocombustibles. En concreto, las microalgas están siendo estudiadas con especial interés al tener unas características atractivas para la producción de energía. Adicionalmente, este sustrato permite la recuperación de nutrientes, como por ejemplo los fosfatos, siendo importante debido a su alta demanda como componentes de fertilizantes contrapuesta a la baja disponibilidad de los mismos. Por otra parte, el gran aumento de la población también obliga a tener que gestionar los residuos y disminuir su cantidad para minimizar el impacto ambiental.

Así pues, para llevar a cabo la recuperación tanto energética como nutricional, la digestión anaeróbica es el proceso utilizado para este fin. Sin embargo, sus orígenes no se encuentran en la actual crisis energética. La digestión de la biomasa, especialmente de microalgas, ha sido el resultado de una evolución experimentada, sobre todo a lo largo del siglo pasado.

Se puede considerar que la segunda Guerra Mundial trajo el inicio de un interés importante sobre la digestión de algas y posteriormente de las microalgas. Ya en 1942 Harden y Van Witsch comenzaron a trabajar en estudios sobre el crecimiento de microalgas como fuente de lípidos para la alimentación o la producción de biofuel. Sobre todo después de la guerra, se inició la investigación en el campo de las microalgas, especialmente en Estados Unidos, Alemania, Reino Unido, Japón e Israel. Durante este periodo H.G. Aach estudió la *Chlorella Pyrenoidosa* someténdola a un proceso de ausencia de nitrógeno y logró acumular el 70% del peso seco de la microalga como lípido. Básicamente el interés por las algas durante este periodo estuvo focalizado en su aplicación en el mundo de la alimentación y muy pocos estudios se centraban en su aplicación en el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, en estos momentos, Golueke en 1950 publicó el primer estudio sobre la digestión anaeróbica de las microalgas y más tarde, en 1960, Oswald y Golueke propusieron la cultivación de algas en estanques de gran escala a partir de los nutrientes de las aguas residuales con la posterior digestión anaeróbica para su conversión en metano.

En los años 70, debido a la crisis del petróleo y la consiguiente subida de precios, se comenzó a prestar gran atención sobre cómo las algas podrían entrar en el ámbito de la producción de energía y posteriormente, como consecuencia, en el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, el interés disminuyó debido a la recuperación del petróleo y, por tanto, muchas líneas de investigación en la materia se abandonaron.

No obstante, debido a la concienciación que se había iniciado sobre la necesidad de crear energía sostenible, algunos países comenzaron a tomar acciones, como la imposición de tasas o la obtención de ayudas para aquellos con políticas a favor de la energía sostenible. Un claro ejemplo fue US DOE que en 1980 inició el Aquatic Species Program con el fin de encontrar un método óptimo entre coste y efectividad para crear biocombustibles a partir de algas. Sin embargo, al cabo de unos años se abandonó debido al citado desinterés y la consecuente falta de financiación.

Finalmente, con la entrada del nuevo milenio y la siguiente crisis del petróleo que produjo la consecuente subida de precios, causó una gran preocupación en relación a la disponibilidad de la energía y su precio. A partir de aquí, se tomó realmente conciencia sobre buscar una alternativa a los combustibles convencionales. Por tanto, la investigación sobre las algas y su recuperación energética se reactivó, marcando la principal línea de investigación en este campo.

Paralelamente al potencial de generación de energía identificado en las microalgas, hay otras razones por las que se han convertido en un sustrato interesante para la digestión anaeróbica. En los inicios de la digestión anaeróbica de biomasa, la fuente para la creación de biocombustibles eran plantas de cultivo, valiosos como fuente de alimentación. Consecuentemente, grandes extensiones de terreno aptas para el cultivo alimentario eran sustituidas por el cultivo de biomasa. Adicionalmente, esto suponía la utilización de fertilizantes, sujetos al aumento de precios del petróleo y de los que la disponibilidad de sus componentes era y es escasa.

Por estos motivos, a mediados de los años 70 se comenzó a buscar sustratos alternativos. De esta manera se pensó en el crecimiento de algas en ambientes eutróficos de las costas, en microalgas marinas o en macroalgas. Todas estas conformaban lo que se llamó la primera generación de algas para la creación de energía. Sin embargo, debido a los problemas derivados de alguna de ellas en la producción, como la inhibición debido al elevado contenido de sales, el foco se trasladó a las microalgas.

Las microalgas pueden crecer abundante y fácilmente en lugares con la suficiente cantidad de nutrientes para su crecimiento, condición no muy restrictiva. Adicionalmente, no se necesitan grandes extensiones de terreno y se pueden utilizar aquellos que no son aptos para el cultivo alimentario, todo ello solucionando el derroche de estos y sus terrenos. Además, las microalgas tienen un gran potencial para generar biogás.

En la actualidad, teniendo en cuenta las dos principales razones expuestas sobre las microalgas, el tratamiento de aguas residuales es uno de los procesos idóneos para su utilización. Las microalgas pueden formar parte tanto de un tratamiento secundario como un tratamiento terciario eficiente y eficaz en una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR). Principalmente permiten la eliminación de los nutrientes causantes de la eutrofización, convirtiéndose así en un sustrato importante para esta finalidad. Así, el tratamiento de aguas residuales reúne las condiciones idóneas para el crecimiento de microalgas y la recuperación de nutrientes y energía.

### **3.2. La biomasa algal**

En los inicios del interés por la generación de energía a partir de la digestión anaeróbica, la biomasa en general se veía como su principal fuente. Por este motivo, cultivos alimentarios se destinaban a este fin hasta llegar al extremo de dar más importancia a la generación de biomasa para la creación de energía y poner en un punto crítico la oferta de los productos alimenticios procedentes de la agricultura. Ante los problemas que se presentaban, las microalgas comenzaron a ser el centro de atención como fuente de biomasa para la obtención de energía, ya que solucionaban muchos de los inconvenientes asociados al cultivo de plantas terrestres para biomasa, como la utilización de grandes extensiones de terreno y su gran impacto ambiental.



Por otro lado, ante las características que presenta la biomasa algal, pronto se convirtió en un sustrato muy interesante para el tratamiento de aguas residuales. La producción de energía de este sustrato supone tener que concentrar grandes cantidades de proteínas y lípidos, obtenidos a partir del consumo de nutrientes, básicamente nitrógeno y fosfatos. Por este motivo, la integración del tratamiento de aguas residuales con la generación de energía a partir de las microalgas resultó ser una opción muy interesante, ya que por un lado se eliminaban los nutrientes de las aguas residuales y por otro lado se lograba la fuente necesaria de nutrientes para producir energía sin necesidad de aportarlos externamente.

### 3.2.1. Composición y características

Las microalgas se pueden definir como aquellas algas que no se pueden ver a simple vista, es decir, algas unicelulares procariotas, cianobacterias o eucariotas, con un tamaño entre 1  $\mu\text{m}$  y 100 micras, pudiéndose encontrar individualmente o en cadena. Pueden crecer en cualquier tipo de ambiente, tanto en agua dulce como en salina, ya sea en estanques naturales o artificiales, lagos, océanos...

La composición de las microalgas se basa principalmente en carbono, nitrógeno y fósforo, aunque también contienen hierro, cobalto o zinc. Estos son la base de los componentes más complejos que las forman, como las proteínas (6-52 %), los lípidos (7-23 %) y los carbohidratos (5-23 %) (*Brown et al., 1997*). Debido a la elevada concentración de proteínas, tienen una baja relación de carbono y nitrógeno. Por otro lado, las algas se caracterizan por tener una pared celular bastante resistente, que hace de protección de los llamados componentes. De esta manera, la biomasa algal se puede considerar como un pequeño almacén de materia potencialmente beneficiosa para la producción de biogás. Debido a su composición necesitan adquirir grandes cantidades de nitrógeno y fósforo para poderlos sintetizar e incorporarlos en su interior, ya sea en forma de lípido o almidón. Esta necesidad de las microalgas conlleva tener que alimentarlas con un sustrato rico en estos nutrientes. Por este motivo las aguas residuales son una gran fuente de nutrientes para las microalgas. No obstante, estas aguas tienen que pasar por una digestión anaeróbica previa para evitar la contaminación de las propias microalgas y poder convertirse en su nutriente.

Sin embargo, la pared celular es el principal factor limitante para poder extraer la energía o los nutrientes que contienen las microalgas en su interior. Su rigidez, afectada por las condiciones ambientales es quien determina su biodegradabilidad y la viabilidad de la digestión anaeróbica para obtener energía.

La composición de la pared celular es una matriz de polisacáridos (lo más relevante es la celulosa) y glicoproteína, que ofrecen una gran protección a la célula al ser una estructura químicamente compleja y robusta. Esta estructura está compuesta por diferentes capas que conforman su resistencia característica. La capa exterior está formada por un polímero alifático y no hidrolizado llamado *Algaenan*. Este conforma una capa muy fina de 10-20  $\eta\text{m}$  con una estructura trilaminar. Esta composición le ofrece una resistente estructura recalcitrante, como es la celulosa. Continuando hacia el interior, se encuentra una segunda capa de densidad de dos electrones, seguida por otra capa de electrones menos densa (*Gerken et al., 2013*). Estas dos últimas son las responsables de que las microalgas permanezcan casi inalteradas después de un fuerte pretratamiento térmico o enzimático. Además, se debe tener en cuenta que a medida que las algas maduran incrementan su resistencia.

### 3.2.2. El papel de la biomasa algal en el tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales es un proceso necesario y prioritario, sobre todo desde un punto de vista medioambiental. En estos momentos, se utiliza una gran cantidad de agua que queda contaminada posteriormente por materia orgánica y nutrientes inorgánicos como los nitrógenos y los fosfatos. Sin embargo, el agua forzosamente ha de ser devuelta al medio con la mejor calidad posible.

La eliminación de materia orgánica siempre ha sido el principal proceso para hacer frente a la contaminación de las aguas. Sin embargo, los nutrientes restantes pueden dar lugar a la eutrofización, es decir, la aceleración del crecimiento de algas que genera una perturbación en el equilibrio del ecosistema donde se hace el vertido y produce el deterioro de la calidad del agua. En este sentido, se impusieron concentraciones máximas en las aguas vertidas en zonas sensibles a la eutrofización: 10 mg/L para el caso del nitrógeno y 1mg/L para los fosfatos (*Arbib et al., 2013*). La biomasa algal es un sustrato que permite la eliminación efectiva de estos nutrientes y ya se utiliza para el tratamiento de aguas residuales.

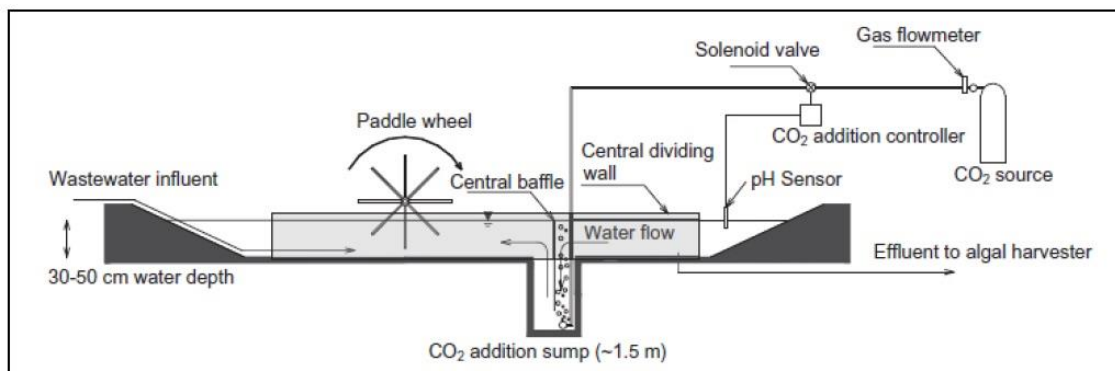
Las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) es donde tiene lugar el tratamiento de aguas residuales. Su objetivo es eliminar a materia orgánica y otros componentes inorgánicos, mediante el tratamiento secundario y terciario de las aguas. Las microalgas principalmente se centran en el terciario, es decir, la eliminación de nutrientes, proceso que llevan a cabo a través de la fotosíntesis. Para el tratamiento secundario, eliminación de materia orgánica, normalmente se utilizan las bacterias. Una vez tratada el agua, se obtiene un incremento de la biomasa algal debido a la integración de los nutrientes en su interior. La digestión anaeróbica es considerada uno de los mejores métodos para la recuperación de estos nutrientes (*Wang et al., 2012*).

Por otra parte, actualmente se está planteando la configuración de sistemas con un rol dual, en otras palabras, la depuración de las aguas conjuntamente con la producción de biomasa, principalmente para la obtención de energía, ya que ambos procesos se pueden complementar. Con este objetivo, se está estudiando la integración del tratamiento de aguas residuales en lagunas de alta carga o en fotobiorreactores, infraestructuras utilizadas inicialmente para la producción exclusiva de biomasa.

En estos momentos, las lagunas de alta carga (HRAP) son los sistemas más utilizados para la producción de biomasa por ser la forma más sostenible de obtener este producto (*Park et al., 2010; Rawal et al., 2010; Sutherland et al., 2014*). Utilizan la energía solar para cubrir los requisitos energéticos y los nutrientes de las aguas residuales, caracterizadas por una concentración de nitrógeno y fosfatos entre 10-100 mg/L en aguas residuales municipales (*Pittman et al., 2010*), como fuente de alimentación. En comparación con la producción comercial de algas, las HRAP presentan una huella ecológica inferior (*Park et al., 2010*), ya que las primeras consumen agua potable y fertilizantes, compuestos por fosfatos, recurso con un suministro limitado a 30-50 años (*Mehrabadi et al., 2015*). Adicionalmente, tanto los costes de construcción como de operación son significativamente inferiores a los sistemas tradicionales de tratamiento de aguas residuales de lodos activados, representando, respectivamente, el 50% y el 20% de los costes de los lodos activados.

Las HRAP son tanques abiertos completamente oxigenados expuestos directamente a la luz solar. Se caracterizan por una profundidad baja, entre 0,2 y 1 metro y por un régimen turbulento que garantiza la exposición a la luz de la mayor cantidad de microalgas (Park et al., 2010). Unas palas rotatorias, con velocidad de giro entre 0,15 hasta 0,3 m/s, proporcionan esta turbulencia por medio de la generación de agitación (Sutherland et al., 2014).

Este parámetro es de alta importancia para asegurar la eficiencia de la HRAP porque determina la frecuencia con que las celdas de las microalgas entran en la zona eufótica, parte de la columna de exposición solo debe ser instantánea ya que la transformación de los fotones en energía química para la asimilación de nutrientes es inmediata (Sutherland et al., 2014). Al mismo tiempo, la agitación previene la sedimentación de las microalgas para garantizar un buen tratamiento de las aguas. Pero este proceso afecta negativamente a la producción de biomasa ya que evita la formación de copos o colonias de microalgas para su posterior recolección (Sutherland et al., 2014). Así pues, se debe buscar un equilibrio entre ambos procesos para que esos puedan desarrollarse correctamente.



**Figura 3.1** Alzado de una laguna de alta carga (HRAP) con adición de dióxido de carbono (Park et al., 2011).

Las HRAP tienen muchos parámetros que definen su diseño, los más destacados por su buen rendimiento se enumeran a continuación:

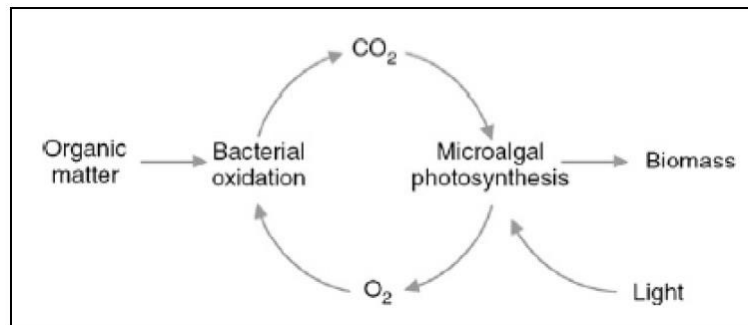
- **Luz:** principal factor que influye en la fotosíntesis. Se necesita una buena exposición solar para que las microalgas puedan desarrollar su función. Por otra parte, se debe evitar una sobresaturación, ya que se pueden dañar los receptores de luz (Sutherland et al., 2014; Park et al., 2010). La profundidad de la laguna y la concentración de biomasa determinan el grado de atenuación dentro de la HRAP mientras que la turbulencia determina la frecuencia de exposición.
- **Temperatura:** diferentes estudios han determinado que el rango térmico óptimo se sitúa entre 28-35 °C (Park et al., 2010). Este factor está influenciado por la concentración de biomasa y la luz incidente.
- **pH:** el valor óptimo de este parámetro es igual a 8. Por encima de 8,3 las bacterias anaeróbicas de las lagunas quedan inhibidas (Sutherland et al., 2014; Park et al., 2010). Debido a la fotosíntesis se consume  $\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$ , consecuentemente aumenta el pH y se favorece la precipitación de amoníaco libre. Así también se elimina el nitrógeno de las aguas, pero se impide la recuperación de los nutrientes.

- Solubilización de CO<sub>2</sub>: las HRAP requieren la adición del CO<sub>2</sub> para su buen funcionamiento. El ratio C:N de las aguas residuales es bajo (2,5-4:1) mientras que las microalgas necesitan un ratio 6:1 para su producción (*Mehrabadi et al., 2015*). Adicionalmente impide el aumento del pH y la precipitación del nitrógeno en forma de amoníaco. La adición controlada de CO<sub>2</sub> es una de las técnicas empleadas para asegurar el buen funcionamiento de las lagunas.
- Otros: la profundidad, como se ha dicho anteriormente, determina la frecuencia de exposición de las microalgas a la luz e incrementa la producción por valores elevados (*Sutherland et al., 2014*); el tiempo de retención hidráulica (HRT, Hydraulic Retention Time) influye sobre todo en la carga nutricional, especialmente en la calidad del efluente. Por un tiempo más elevado, más biomasa se producirá y por lo tanto más nutrientes se habrán eliminado. No obstante, se desalienta la penetración de luz. Aun así, las HRAP se caracterizan por un HRT corto, comprendido entre 4-10 días (*Sutherland et al., 2014; Rawat et al., 2010*).

La biomasa de las HRAP está compuesta por bacterias heterotróficas aeróbicas y microalgas (*Sutherland et al., 2014; Rawat et al.,*). Estas últimas, encargadas de la fotosíntesis, producen oxígeno utilizado por las bacterias aeróbicas, responsables de la degradación de los componentes orgánicos disueltos en el agua para transformarlos en componentes orgánicos en partículas. La particularización de la materia orgánica permite su extracción de las aguas, dando lugar al tratamiento secundario.

Como resultado del proceso desarrollado por las bacterias, se produce dióxido de carbono, necesario para la fotosíntesis de las microalgas para adquirir el nitrógeno y los fosfatos para su propia producción. En más detalle, este proceso utiliza la energía solar para romper las moléculas de CO<sub>2</sub>, usado como fuente de carbono para sintetizar los componentes inorgánicos presentes en las aguas residuales consiguiendo que las microalgas los asimilen como materia orgánica (*Putt et al., 2010*). El resultado es la consecución de un buen tratamiento terciario para evitar la eutrofización, ya que el efluente del tratamiento secundario contiene una alta concentración de componentes inorgánicos (*de-Bashan y Bashan, 2009*). El efluente del terciario es un agua oxigenada y una biomasa valiosa para la producción de energía gracias al incremento de la concentración de proteínas y lípidos en su interior (*Aslan et al., 2006; Arbib et al., 2013*), permitiendo un reciclaje eficiente de los nutrientes (*González et al., 1997*). Al mismo tiempo, contribuyen a la fijación del dióxido de carbono y ayudan a reducir la acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera. Especialmente la conversión del CO<sub>2</sub> en materia orgánica por parte de las microalgas puede llegar a ser entre 10 y 50 veces superior respecto de las plantas terrestres, gracias a su tasa de crecimiento elevada (*Arbib et al., 2014*). Posteriormente estos nutrientes se recuperarán a través de la recolección de la biomasa o la transformación en energía.

El resultado de la actividad biológica en las lagunas es una simbiosis entre bacterias y microalgas para conseguir tanto la limpieza de las aguas como la producción de biomasa. La simbiosis tendrá lugar bajo el ratio correcto entre bacterias y microalgas, ya que ambas poblaciones entrarán en competencia por los nutrientes, impidiendo que una de ellas desarrolle su función si se le limita el acceso a su fuente de alimentación (*Kumar et al., 2015*).



**Figura 3.2.** Principio de oxigenación fotosintética en el proceso de la eliminación de materia (Rawat et al., 2011).

Los sistemas de cooperación entre HRAP y tratamiento de aguas residuales obtienen buenos resultados en efluentes de alta calidad. Sin embargo, la eliminación de nitrógeno y fosfatos depende de la concentración de nutrientes, la intensidad de la luz, el ratio N:P y los tipos de microalgas (Sutherland et al., 2014). Pittman et al., (2010) determinaron que tanto la *Chlorella* como *Scenedesmus* eliminaban más del 80% de amoníaco y nitrógeno y la total reducción de los fosfatos de aguas provenientes de un tratamiento secundario, mientras que obtenían el 80% y el 90% de eliminación respectivamente en aguas resultantes de un tratamiento primario.

En concreto, la eficiencia de la biomasa algal en la eliminación de los nutrientes se ha estudiado en varios trabajos. Generalmente se ha observado cómo la eliminación del nitrógeno siempre se sitúa por encima del 90% y normalmente su concentración final en el efluente vertido en el medio es inferior a la máxima permitida (Goldman et al., 1973; Pouliot et al., 1989; Aslan et al., 2006; Arbib et al., 2013). No obstante, parte de los nutrientes en el agua está en forma de amonio y su oxidación produce componentes en estado gaseoso que se evaporan y no se incorporan a la biomasa (de-Bashan y Bashan, 2009). Por este motivo se produce un desequilibrio entre el nitrógeno eliminado del agua y la biomasa creada a partir de su consumo. Este hecho puede llevar a plantear la eficiencia de la recuperación de nutrientes, ya que se ha estimado que solo el 25-33 % del nitrógeno es reciclado como proteína (Núñez et al., 2000).

Por otra parte, la eliminación de los fosfatos no tiene un rendimiento tan elevado como el nitrógeno. González et al. (1997) determinaron solo un 55% de extracción de fosfatos del agua al cabo de 216 horas de aplicación del tratamiento; de-Bashan y Bashan (2009) solo obtuvieron una eficiencia del 33% y Pouliot et al. (1989) alcanzaron el 62%. Sin embargo, la concentración de nitrógeno en el agua es la que influye más en la aparición de la eutrofización, convirtiéndose en el nutriente con mayor interés para ser eliminado (Goldman et al., 1973). Además, la eliminación de los fosfatos está sujeta a la variabilidad de la fotosíntesis. Este fenómeno estudiado por Sukacová et al. (2014), comparando el proceso con iluminación artificial, es decir, aportando luz las 24 horas del día, y el proceso con luz natural (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Los resultados obtenidos mostraban una eficiencia del 97% de eliminación de los fosfatos en el primer caso mientras el proceso natural solo obtenía entre el 36-41 %.

Otras técnicas para eliminar los fosfatos usan la adición de organismos acumuladores de polyfosfatos (PAOs), capaces de almacenar intracelularmente polyfosfatos bajo unas condiciones específicas (Sukacová et al., 2014).

Dejando de lado el tratamiento de aguas residuales, las lagunas también buscan maximizar la producción de biomasa. Los resultados obtenidos son indicadores de las buenas características de las microalgas en este campo, como el alto ratio de crecimiento o el periodo corto de generación. En estos momentos, se ha logrado obtener de 12 a 40 g/m<sup>2</sup>-día, es decir, aproximadamente unos 2.500 m<sup>3</sup> de aguas residuales pueden producir 1 tonelada de biomasa algal con un 7% de contenido de nitrógeno (*Park et al., 2010; Mehrabad et al., 2015*). Uno de los factores que intensifica la producción es la existencia de una especie predominante de microalgas. Por este motivo, los fotobiorreactores, sistemas utilizados para la producción de biomasa, obtienen mejores resultados en este sentido: 150 Mt/ha·año en comparación con la producción de HRAP de 50 Mt/ha·año (*Kumar et al., 2015*), ya que pueden operar con un monocultivo de algas.

La profundidad de la laguna también es un parámetro a tener en cuenta. Teóricamente su disminución consigue aumentar la producción debido a una mejor penetración de la luz, pero se ha observado que el aumento sucede a la inversa. En otras palabras, con una profundidad más elevada, se incrementa la producción por área a pesar de la atenuación de la luz y reduce las posibilidades de limitar la producción por falta de carbono. Por otra parte, el tipo de microalgas utilizado también influencia la producción resultante de las lagunas. Hay que destacar que en estos sistemas, donde el cultivo de microalgas convive con el tratamiento de aguas, la biomasa algal unicelular en suspensión mejora la depuración de las aguas, mientras que dificulta la posterior recuperación debido a la disminución de la concentración de biomasa (*Rawat et al., 2014*).

Aparte de las lagunas también se utilizan los fotobiorreactores, como se ha hecho referencia anteriormente, presentando producciones más elevadas. Son tanques tubulares que mejoran la eficiencia con que la energía solar es transformada en biomasa, pero sus costes asociados, como el consumo de agua y energía, son elevados. Las HRAP, en cambio, tienen un diseño y una construcción más simple y un costo de operación y limpieza inferior. Por estos motivos las HRAP son más utilizadas (*Sutherland et al., 2014; Kumar et al., 2015*).

### **3.2.3. Producción de energía a partir de las microalgas**

El objetivo principal de la producción de biomasa es la generación energética. Los lípidos son los componentes de las microalgas con más capacidad para producir energía, por este motivo se han buscado diferentes técnicas para conseguir biocombustibles a partir de estos componentes. Algunos métodos empleados para este fin son reacciones termoquímicas para obtener bioaceite, extracción de lípidos para conseguir biodiesel o fermentación de carbohidratos para producir bioetanol. No obstante, se necesita una alta concentración de lípidos para que estas técnicas sean eficientes. Contrariamente, la producción de microalgas normalmente está asociada a una baja concentración, necesitando de diferentes procesos, como la sedimentación, la floculación o la adición de compuestos químicos, para lograr una buena concentración. Este inconveniente supone tener que incrementar los costes de producción de energía y pone en duda la viabilidad del proceso. La digestión anaeróbica, en cambio, no necesita una elevada concentración de la biomasa, permitiendo obtener energía sin grandes esfuerzos previos. *Sialve et al. (2009)* determinaron que era preferible someter la biomasa algal en digestión anaerobia cuando las microalgas no superaban el 40% de concentración de lípidos.

Esta fue una de las razones para iniciar el estudio de la digestión anaerobia como método para la generación de energía a partir de microalgas. La producción de biogás a partir de este proceso se sitúa en un rango de 0,2 a 0,4 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg de biomasa, permitiendo generar 1-1,25 kWh de electricidad (*Park et al., 2010; Mehrabad et al., 2015*). Pese a que los lípidos son los componentes con una producción teórica de metano más elevada, seguidos por las proteínas y los carbohidratos, el biogás se obtiene principalmente de estos últimos componentes. Su hidrólisis, fase inicial de la digestión, es más corta, de 0,43 días para las proteínas y 0,18 días por los carbohidratos, frente a los 3,2 días que necesitan los lípidos para ser hidrolizados (*Mehrabad et al., 2015*). Sin embargo, la digestión anaeróbica de las microalgas presenta ciertas desventajas, por ejemplo, la biomasa algal tiene un ratio C:N bajo, entre 5:1-10:1, mientras que el ratio óptimo para la digestión se sitúa entre 22:1-25:1. Pero el principal problema que afecta a la producción final de biogás es la resistencia de las microalgas a ser degradadas.

#### **3.2.4. Digestión anaeróbica y factores limitantes de las microalgas**

La digestión anaeróbica es un proceso biológico en ausencia de oxígeno donde intervienen diferentes poblaciones de microorganismos para degradar la materia orgánica. Consiste en una descomposición de los componentes orgánicos complejos en componentes más simples y químicamente estables gracias a la acción de los microorganismos. En el caso de las microalgas se produce una reacción de oxidación donde la materia orgánica se digiere para transformarse en metano, dióxido de carbono y amonio. Como producto se obtiene un residuo orgánico estabilizado y biogás, compuesto aproximadamente por 60-75 % de metano y 25-40 % de dióxido de carbono, según los resultados obtenidos en la mayoría de estudios en este campo.

Debido a la alta presencia de metano, el biogás producido tiene un alto poder calorífico, aproximadamente de 5.500 kcal/Nm<sup>3</sup> (IDAE, 2007), comparable al del gas natural, que puede ser transformado en energía térmica. La recuperación de nutrientes se asocia a la conversión de proteínas, carbohidratos y lípidos, obtenidos a partir del tratamiento de aguas residuales, en biogás.

En la digestión anaeróbica se identifican diferentes fases pero que tienen lugar de manera simultánea. Cada una de ellas está caracterizada por la actuación de una determinada población de bacterias y por lo tanto sus velocidades de reacción son diferentes. La digestión queda limitada por la fase más lenta, que puede variar en función de las características que presente el sustrato que se está digiriendo. Por otra parte, se requiere que haya un desarrollo estable del proceso global para evitar que compuestos intermedios de una fase puedan afectar o inhibir otra. Así pues, en el proceso se pueden distinguir cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

La hidrólisis es la fase donde los componentes más complejos se descomponen en unos más simples que puedan ser utilizados por las bacterias en las posteriores etapas, es decir, es la fase donde tiene lugar la solubilización gracias a enzimas extracelulares producidas por bacterias hidrolíticas. Se ha observado que se puede dar el caso en el cual las enzimas generadas de forma natural no solubilizan suficientemente la materia, ya sea porque no tienen la capacidad de descomponer el sustrato o por su baja cantidad. Normalmente, este hecho se presenta ante sustratos formados mayoritariamente por celulosa o lignina, haciendo que la hidrólisis se convierta en la fase limitante.

En la acidogénesis, las bacterias acidificantes fermentan las sustancias químicas solubles, en diferentes compuestos más simples. Por un lado, se obtienen cadenas cortas de ácidos grasos, ácido propiónico, alcoholes... que serán oxidados posteriormente en la acetogénesis; y por la otra, se obtiene ácido acético, dióxido de carbono o hidrógeno que pueden ser utilizados directamente por los microorganismos metanogénicos. Normalmente esta fase se desarrolla con cierta rapidez y no presenta problemas que limiten la digestión.

En la tercera etapa, las bacterias acetogénicas convierten los compuestos ácidos resultantes de los procesos anteriores en acetatos e hidrógeno, para que puedan ser utilizados por las metanogénicas. Se debe destacar que el hidrógeno es un elemento tóxico para los microorganismos metanogénicos y por lo tanto se requiere una simbiosis con ciertas bacterias acetogénicas que consuman el hidrógeno generado en las diferentes fases para crear acetatos.

La etapa final de la digestión consiste en la producción de metano a partir de bacterias metanogénicas. Estas utilizan los compuestos sencillos producidos en las fases anteriores como, por ejemplo, el ácido acético, el hidrógeno, el dióxido de carbono o el fórmico para la producción de metano. Muchos factores deben tenerse en cuenta para que se obtenga un biogás de calidad, en otras palabras, rico en metano. Básicamente, el metano se obtiene a partir de la conversión del ácido acético. También el 30% del dióxido de carbono que llega a la etapa final es utilizado por bacterias metanogénicas, ayudando a disminuir la presencia de este en el biogás final. Se debe tener especial cuidado con el hidrógeno ya que, si no se usa previamente, se pueden desarrollar bacterias ácidas que formen ácidos orgánicos. Como consecuencia, se producirá más dióxido de carbono y el biogás final será rico en este gas, disminuyendo su calidad. Por otra parte, cabe destacar que la metanogénesis normalmente es la fase limitante de la digestión en los casos donde la hidrólisis se ha podido desarrollar sin muchos problemas.

Los microorganismos encargados de la última fase tienen unas tasas de crecimiento inferiores a las de las bacterias de las otras fases. Este crecimiento lento o su posible inhibición debido a sustancias pueden disminuir la velocidad de la creación de metano.

Ante las grandes ventajas que presenta la digestión de la biomasa algal, hay ciertos factores que pueden afectarla negativamente e incluso inhibirla, como la concentración de amonio, la toxicidad del sodio o la resistencia de las paredes celulares.

La inhibición por amonio se debe a una alta concentración de nitrógeno producida por la acumulación de algas. Durante la digestión, las proteínas son degradadas y consecuentemente se libera el amonio acumulado en la fase líquida del interior de las microalgas. De esta manera, aumenta el pH y la alcalinidad, produciendo la inhibición de la digestión debido a las moléculas libres de amonio (*Sialve et al., 2009; Ward et al., 2014*).

Por otra parte, la toxicidad del sodio puede limitar la digestión cuando se sobrepasa un límite en la cantidad de sodio presente. La microflora anaeróbica que interviene en la digestión necesita iones de sodio. Aun así, una alta concentración, sobrepasando el límite de 12:14 M, produce la inhibición del proceso. Este valor no es el mismo para todo tipo de algas, si no que las algas marinas necesitan más iones de sodio y de ahí que el límite de la inhibición para este caso se sitúe en 0,5 M.



Estos dos parámetros se deben tener en cuenta si se detectan posibles casos de inhibición del proceso. Sin embargo, la resistencia de la pared celular es normalmente el principal factor limitante de la digestión de las microalgas (*Sialve et al., 2009; Ward et al., 2014*).

En el caso de la biomasa algal, la hidrólisis es la etapa limitante de la digestión. La rigidez de la pared celular impide que las enzimas extracelulares, encargadas de solubilizar la materia durante la hidrólisis, puedan interaccionar con las microalgas. De esta manera, no pueden ser utilizadas por las poblaciones de bacterias de las siguientes etapas de la digestión y consecuentemente se disminuye la cantidad de biogás final. Este efecto fue identificado por Golueke, cuando detectó microalgas intactas tras una digestión, y también por Zhou, que en este caso detectó células intactas después de 45 días de digestión (*Ward et al., 2014*). Además, este hecho provoca que haya más presencia de oxígeno en el biogás, disminuyendo su calidad, debido a la fotosíntesis de las células recalcitrantes. Por otra parte, no poder hidrolizar las microalgas supone aumentar el tiempo de retención hidráulica de los digestores para intentar que las enzimas puedan alterar al máximo la pared celular.

Por este motivo hay que buscar diferentes métodos para debilitar la pared celular de las microalgas y mejorar su hidrólisis. La aplicación de pretratamientos ayuda a mejorar la producción de biogás, pero aún no se ha encontrado uno que optimice el proceso de manera generalizada, debido a la variabilidad en las características de las microalgas. También la digestión entre microalgas y diferentes sustancias es considerada como una posible opción para mejorar la digestión de las microalgas, no solo para facilitar su hidrólisis sino también para compensar características de las algas que no favorecen la digestión, como la baja relación entre carbono y nitrógeno o la inhibición por una alta alcalinidad.

### **3.2.5. Aplicación de pretratamientos en la digestión anaeróbica**

La resistencia de la pared celular de las microalgas ante la hidrólisis se ha considerado el principal problema para transformar el potencial de producción de biogás que tienen en producción real. Se ha podido comprobar que tratamientos aplicados a las microalgas, previos a su digestión, mejoran la producción de biogás. Por este motivo, muchos estudios han intentado encontrar pretratamientos óptimos para mejorar el rendimiento y la rentabilidad de la digestión de las algas y así poder garantizar la viabilidad económica del proceso para poder competir en el mercado con otras fuentes de energía.

Los pretratamientos actúan sobre las propiedades fisicoquímicas de las microalgas para hacer que los componentes de interés para las bacterias sean mucho más accesibles y fáciles de degradar. Hay una alta diversidad de pretratamientos posibles, que se pueden clasificar en los siguientes tipos:

#### ▪ **Pretratamientos térmicos.**

Los pretratamientos térmicos son los que más se utilizan debido a la buena relación entre sencillez de aplicación y resultados obtenidos, de forma que solubilizan la materia a partir de la aplicación de calor. Las temperaturas que se utilizan tienen un rango muy amplio, desde los 55 °C hasta los 170 °C. No obstante, temperaturas inferiores a 100 °C son las que se consideran para un tratamiento realmente térmico ya que por encima de los 100 °C se debe disminuir gradualmente la presión (*Pasos et al., 2013*).

En muchos estudios sobre este tratamiento se concluyó que el factor más importante de este tratamiento es la temperatura, cuyo valor óptimo dependía de las características del sustrato. Sin embargo, el tiempo también puede tener su influencia, observando un aumento de la producción de metano cuando en un tratamiento se incrementa su tiempo de aplicación (*Marsolek et al., 2013*).

#### ▪ **Pretratamientos mecánicos.**

Existen diferentes tipos de tratamientos mecánicos para favorecer la digestión anaeróbica, siendo el más común el pretratamiento ultrasónico. Este actúa mediante la ruptura mecánica de la estructura celular y de las agregaciones del sustrato según el tiempo, potencia y energía específica aplicada. En general, las mejoras en la producción de biogás con este tipo de pretratamiento se encuentran en rangos entre 20-140 % en sistemas discontinuos y entre 10-45 % en sistemas continuos o semicontinuos.

Otros tipos de pretratamientos mecánicos son los que provocan la rotura mediante la centrifugación, los cuales consiguen mejoras en la producción de biogás entre 15-26 %; la homogeneización a alta presión, en el que la presión del sustrato se incrementa más de 90 bar y el sustrato pasa a través de una válvula de homogeneización bajo una fuerte despresurización; o la pulverización del sustrato, en la que este es desintegrado mediante un molino de bolas sacudido.

#### ▪ **Pretratamientos químicos.**

La oxidación y los pretratamientos alcalinos son los principales pretratamientos químicos utilizados sobre el sustrato. El método más utilizado para conseguir la oxidación del sustrato consiste en la ozonización, en el que se consigue obtener una solubilización parcial del sustrato y un aumento del rendimiento del proceso. En cuanto a los pretratamientos alcalinos, se utiliza mayoritariamente el peróxido de hidrógeno, obteniendo resultados similares a la oxidación, y son empleados para solubilizar los polímeros que forman la biomasa y favorecer los ataques de las enzimas extracelulares durante la hidrólisis.

Los tratamientos alcalinos son relativamente efectivos en la solubilización del sustrato en el orden siguiente  $\text{NaOH} > \text{KOH} > \text{Mg}(\text{OH})_2 > \text{Ca}(\text{OH})_2$ . La solubilización del sustrato aumenta con este pretratamiento a medida que se aumenta la dosis alcalina y la temperatura hasta un estado límite.

Su literatura no es tan extensa como la de los anteriores debido a tener inconvenientes asociados a su aplicación, como la contaminación del sustrato tratado debido a la formación de productos tóxicos para las poblaciones de microorganismos que llevarán a cabo la digestión anaeróbica.

▪ **Pretratamiento con microondas.**

La irradiación por microondas es una radiación electromagnética con una frecuencia de oscilación entre 0,3 a 300 GHz. Los materiales capaces de absorber la energía de microondas son denominados “materiales con pérdidas dieléctricas”, los cuales son calentados simplemente mediante la irradiación por microondas. La alternancia del campo eléctrico por la irradiación de microondas causa una rápida alineación y realineación de los dipolos en el solvente polar. La continua repetición de este proceso de alineación genera fricción, lo que resulta en la generación de calor.

Se cree que la orientación de los dipolos en el solvente polar (atérico) y el consecuente efecto del calor (térico) rompe la red polimérica de la materia orgánica, liberando el material extracelular y posiblemente también intracelular (dependiendo de la intensidad de la irradiación de microondas), tales como polisacáridos, proteínas y pequeñas cantidades de ADN y ARN en la fase soluble.

No obstante, a pesar de la gran cantidad de literatura sobre los posibles pretratamientos para conseguir una mejora de la solubilización de la biomasa algal y su generación de metano, no se puede determinar un pretratamiento óptimo. Hay muchos factores que impiden una buena comparación entre ellos. En este sentido, *Pasos et al. (2014)* hicieron un estudio sobre tratamientos térmicos y de ultrasonidos aplicados a un mismo tipo de biomasa algal compuesta por *Monoraphidium sp.* y *Stigeoclonium sp.* En este sentido, también *González-Fernández et al. (2011)* compararon un tratamiento de ultrasonidos con un tratamiento térmico aplicado sobre *Scenedesmus*. La conclusión a la que llegaron ambos fue que el tratamiento térmico era mejor, ya que el balance energético era positivo, aunque la aplicación de ultrasonidos conseguía resultados en la mejora de la solubilización semejantes.

Siguiendo esta línea, en el presente trabajo se analiza el efecto de los pretratamientos térmico y termoquímico, este último realizado mediante la adición de dos compuestos químicos alcalinos y aplicando una temperatura elevada, esperando mejorar notablemente la producción y calidad del biogás producido en la digestión anaeróbica de las microalgas y las cianobacterias, ambas con fangos digeridos. Ambos pretratamientos se realizarán a 75 °C de temperatura durante 24 horas, temperatura y tiempo acordados para romper la pared celular de forma notable.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Planta experimental de fuente de microalgas y cianobacterias

A grandes rasgos, los diferentes sistemas de depuración de aguas residuales se pueden clasificar como convencionales o naturales. Los sistemas de depuración convencionales, que son indispensables para el tratamiento de las aguas en los núcleos urbanos grandes, requieren de poca superficie para el tratamiento. Por otra parte, sin embargo, consumen grandes cantidades de energía y requieren de muchos recursos para el mantenimiento de las plantas. Los sistemas naturales, en cambio, constituyen una alternativa de bajo coste a los sistemas convencionales. En estos sistemas la inversión energética es sustituida por la energía natural ambiental (fundamentalmente la radiación solar), pero requieren de una superficie de depuración más grande. Además, los procesos de depuración que tienen lugar en los sistemas naturales son llevados a cabo por componentes ambientales como bacterias, algas, vegetación y fauna a una velocidad correspondiente a sus tasas de crecimiento, y son por tanto tecnologías de depuración sostenibles (*García et al., 1998*).

#### 4.1.1. Lagunas de alta carga (HRAP)

Parte de la biomasa algal que se ha utilizado para la realización del experimento se ha extraído de las lagunas de alta carga que forman parte de la planta experimental de tratamiento de aguas residuales situada en la azotea del edificio D1 de la Escuela Técnica de Ingeniería de Caminos, Canales y Puertos de la Universidad Politécnica de Cataluña (Barcelona) y que pertenece al Grupo de Ingeniería y Microbiología del Medio Ambiente (GEMA) del Departamento de Ingeniería Hidráulica, Marítima y Ambiental (DEHMA) de la misma universidad.

La planta experimental trata agua residual que proviene del alcantarillado municipal y consta de un pretratamiento, de un tratamiento primario y, finalmente, de un secundario. El proceso es el siguiente:

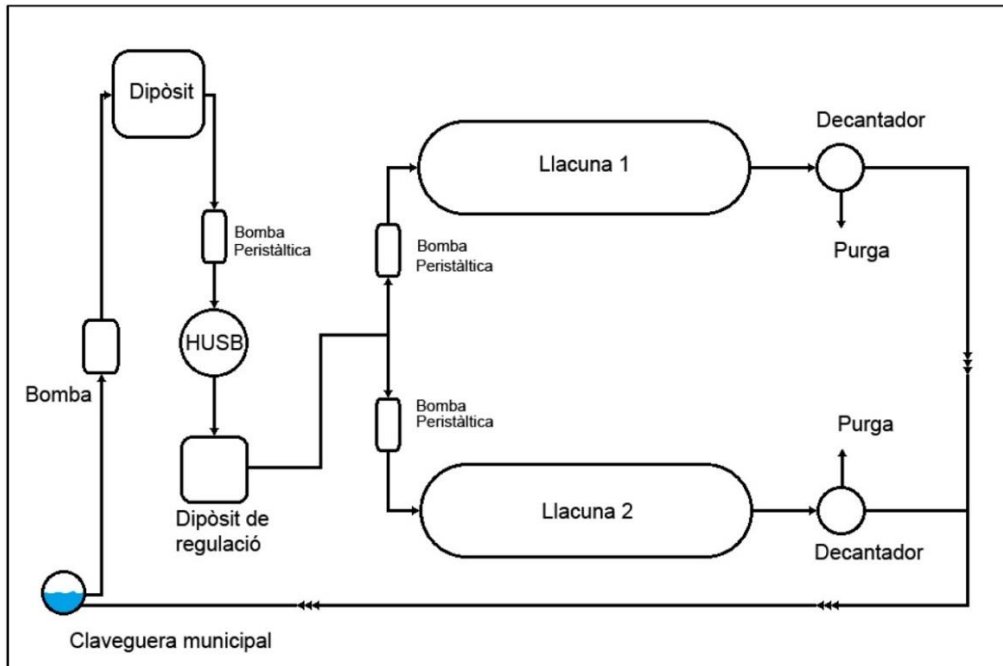
El agua residual urbana es bombeada desde el punto del alcantarillado más cercano (situado en la Avenida Gran Capitán) hasta el laboratorio de Ingeniería Ambiental y desde allí hacia un tanque de mezcla de 1.000 Litros situado en la azotea donde se encuentra la planta de tratamiento.

El tanque de mezcla o de agitación continua actúa como pretratamiento: el agua residual que entra tiene que atravesar unas mallas de más a menos diámetro, que hacen de tamiz, produciéndose la eliminación de los sólidos más groseros. Aunque dentro del tanque el agua se remueve y se airea mediante sistemas mecánicos para evitar fenómenos anaerobios, hay un pequeño proceso de decantación primaria, donde se eliminan la arena y los lodos que han quedado precipitados en el fondo del tanque. También se eliminan los aceites y las grasas que se encuentran en la superficie del líquido del tanque.

Seguidamente, el efluente del tanque se conduce a un reactor HUSB (Hydrolytic Upflow Sludge Bed Reactor) regulado por una bomba peristáltica donde se producirá el tratamiento primario. El HUSB es un reactor anaeróbico que opera en flujo ascendente y permite, además de la sedimentación de los sólidos en suspensión, una estabilización parcial del barro y un aumento de la biodegradabilidad respecto al afluente.

A continuación, el agua de la parte superior del HUSB se dirige hacia un depósito de alimentación de 50 Litros con boya, donde dos bombas peristálticas conectadas a este depósito impulsan el agua hasta las lagunas de alta carga. Las lagunas son las responsables del tratamiento secundario.

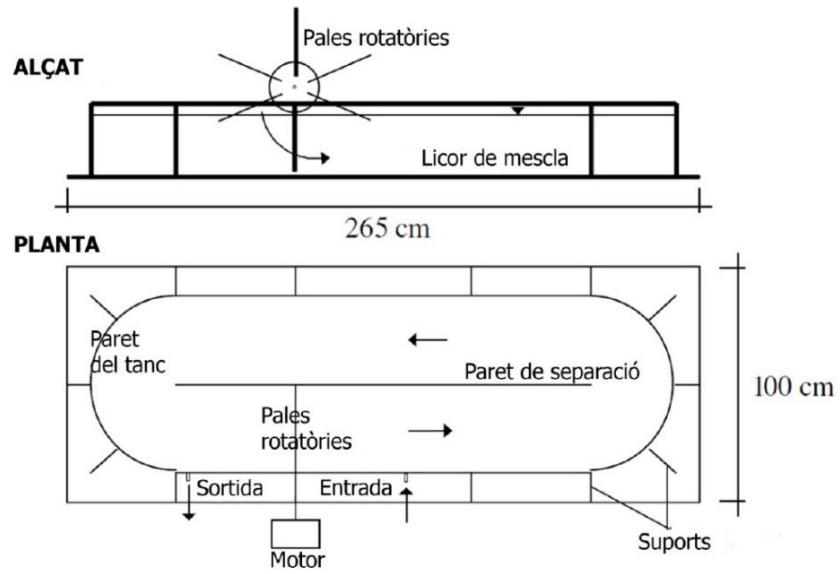
El agua efluente de la laguna es dirigida a un decantador donde se producirá la decantación secundaria. Finalmente, se separan los lodos o biomasa algal del agua clarificada. El líquido clarificado se vuelve de nuevo al alcantarillado, mientras que de la purga se obtiene la biomasa que se necesita para llevar a cabo el experimento.



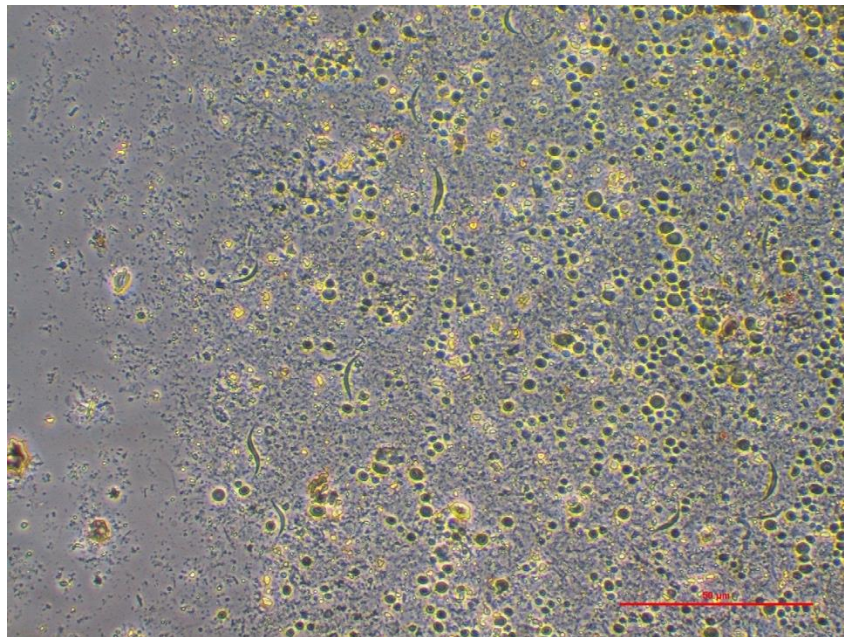
*Figura 4.1. Esquema del proceso de tratamiento de las lagunas de alta carga.*

Las lagunas están fabricadas de PVC y cada una de ellas tiene una superficie de  $1,54 \text{ m}^2$ , una profundidad de  $0,3 \text{ m}$  y un volumen de  $0,47 \text{ m}^3$ . Cada una de ellas tiene una rueda de molino formada por seis aspas separadas  $60^\circ$ . Por el centro de estas pasa un eje que está conectado a un pequeño motor eléctrico que las hace girar.

Los decantadores son también de PVC y tienen una superficie de  $0,025 \text{ m}^2$  cada uno (la relación entre la superficie del decantador secundario y la superficie de la laguna es de  $1/60$ ). El efluente clarificado sale del decantador mediante un rebosadero situado en la parte central. La parte inferior del decantador es cónica y está conectada a un grifo que permite la purga.



**Figura 4.2.** Esquema de una laguna de alta carga: alzado y planta (García et al., 2006).



**Figura 4.3.** Fotografía aumentada de la biomasa microalgal desde microscopio.

Las especies dominantes presentes en las lagunas de alta carga son las especies de *Scenedesmus*, *Diatomea*, *Chlorella* y *Monoraphidium*, observadas a través de microscopio de laboratorio.

#### 4.1.2. Fotobiorreactor

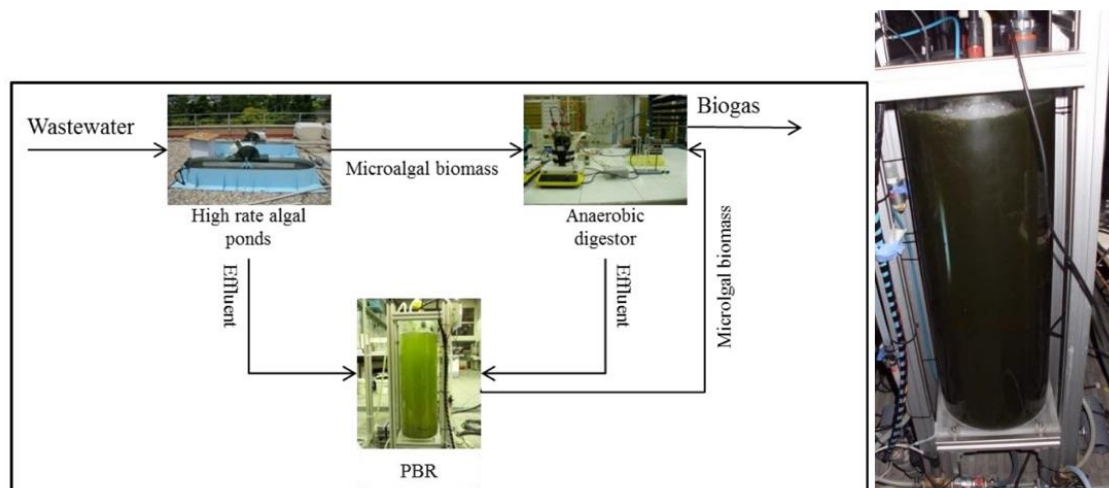
La parte de biomasa algal correspondiente a las cianobacterias que se utiliza en el presente estudio proviene de un fotobiorreactor experimental perteneciente al Grupo de Ingeniería y Microbiología del Medio Ambiente (GEMA) del departamento de Ingeniería Hidráulica, Marítima y Ambiental (DEHMA) de la UPC.

El fotobiorreactor (FBR) utilizado en este trabajo consiste en un sistema cerrado tipo columna. Debido a su alta capacidad para crear cultivos selectivos y su buen mantenimiento, es un sistema muy recomendado para investigaciones. Este reactor se compone de diversos componentes que tienen diversas funciones, desde proporcionar la luz necesaria para su posible fotosíntesis o favorecer el llenado y vaciado del mismo.

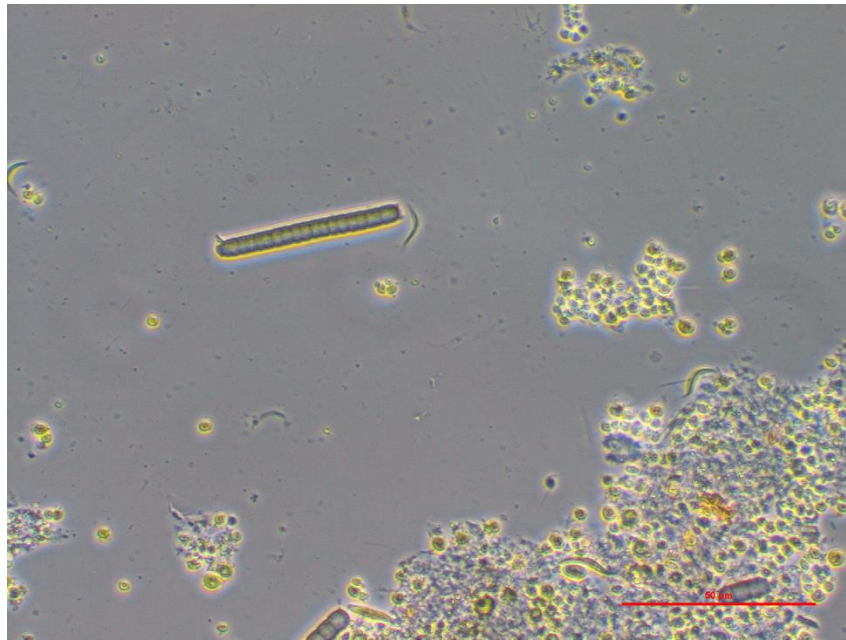
Las diferentes partes en las que se constituye este FBR son: un depósito de cosechado, el depósito de alimentación, un agitador mecánico, una campana direccional de luz, una bombilla, el fotobiorreactor de columna, el cuadro de mandos y un ordenador para monitorizar el proceso y los parámetros correspondientes.

Este fotobiorreactor inocula un cultivo mixto de cianobacterias, de las que las dominantes es la especie *Oscillatoria*. No obstante, se observa la presencia de otras especies de microalgas como *Chlorella* o *Monoraphidium* en menor medida, debido a la alta dificultad de aislar una única especie. El FBR es alimentado por la fase líquida del efluente proveniente de un digestor anaeróbico diluido con el efluente de biomasa algal proveniente de las lagunas experimentales de alta carga del GEMA. El fotobiorreactor tiene un volumen de 30 Litros donde la biomasa algal es cultivada bajo condiciones semicontinuas (la alimentación se realiza una vez al día), resultando con un tiempo de retención hidráulica (THR) de 8 días.

El fotobiorreactor formaba parte de un Loop, ya que al mismo tiempo su efluente sirve para alimentar un digestor anaeróbico al que no se ha hecho referencia. En nuestro caso, el efluente extraído (las cianobacterias) constituye uno de los dos sustratos que se emplearán en el presente ensayo en discontinuo de digestión anaeróbica, el ensayo Batch.



**Figura 4.4.** Esquema del proceso de tratamiento de agua en el fotobiorreactor y foto del mismo.



*Figura 4.5. Fotografía aumentada de la biomasa cianobacteriana desde microscopio.*

## **4.2. Ensayo en discontinuo de digestión anaerobia**

### **4.2.1. Condiciones del ensayo**

El ensayo en discontinuo de la digestión anaerobia, también conocido como ensayo Batch, es el primer paso para tener una aproximación de la producción de metano de un sustrato antes de trasladarlo a un modelo de reactores o en una escala mayor si la evolución de la producción de biogás presenta resultados positivos. En este sentido, es el primer tipo de ensayo que se lleva a cabo para estudiar la verificación de una hipótesis. En el presente trabajo se valoran diferentes digestiones diferenciadas por la composición del sustrato microalgal, por la temperatura y por la concentración de los componentes químicos involucrados en el pretratamiento alcalino, determinando la forma con la que han sido pretratados. A continuación, se detallan las consideraciones a tener en cuenta para llevar a cabo el estudio, las hipótesis y los diferentes puntos a analizar.

El ensayo consiste en montar unos pequeños reactores donde se produce la digestión anaeróbica ocasionada por bacterias que degradan la materia orgánica para generar biogás. Los reactores son unas botellas específicas que contienen el sustrato a digerir. En el presente estudio, el contenido de las botellas está formado por inóculo y microalgas.

El inóculo es el sustrato que contiene las bacterias encargadas de realizar la digestión. Este se obtiene de la EDAR de Sant Feliu de Llobregat. Hay que tener en cuenta que las condiciones de digestión del ensayo no son las mismas que las condiciones de la EDAR y por esta razón el inóculo no está aclimatado. Este inconveniente se puede traducir en la reducción de producción de biogás ya que al inicio



no se desarrollará tan rápido en comparación con un sustrato aclimatado. El proceso de aclimatación del inóculo es demasiado largo y considerando el estado experimental de la hipótesis a estudiar y el tiempo disponible para el ensayo, este proceso de aclimatación se ha desestimado.

Además del inóculo, se introduce el sustrato de estudio. La proporción de sustrato respecto al inóculo debe garantizar una cantidad suficiente de microorganismos para degradar la materia orgánica y evitar que la falta de biomasa limite la digestión. Por otra parte, también se debe asegurar que el contenido de sustrato sea suficientemente elevado para determinar con precisión las características del biogás. Siguiendo estas consideraciones, se ha determinado que la proporción óptima es 0,5 gramos de DQO (Demanda Química de Oxígeno) de sustrato por cada gramo de DQO de inóculo. (Passos *et al.*, 2013) y 5 gramos de DQO de sustrato por cada litro de muestra, determinadas a partir de las referencias dadas por otro estudio sobre la digestión de microalgas (Passos *et al.*, 2013) y ajustadas en función de las características iniciales del inóculo. Estas condiciones se aplican en general sobre todos los pequeños reactores que se han de montar. Pero cada uno de ellos representa condiciones de estudio diferentes. Así pues, a continuación, se presentan las hipótesis que se quieren valorar y los tipos de digestiones necesarias para llevarlo a cabo.

En primer lugar, se quiere estudiar la digestión de microalgas, así como la digestión de cianobacterias. Por otra parte, también se quiere ver si hay alguna diferencia en la digestión entre aplicar un pretratamiento térmico o un pretratamiento termoquímico sobre los sustratos. Teniendo en cuenta estos condicionantes del estudio, el ensayo se ha diseñado de la siguiente manera:

- Dos digestiones anaeróbicas llevadas a cabo bajo las mismas condiciones:
  - Digestión de microalgas de las lagunas de alta carga y fangos digeridos de la estación EDAR.
  - Digestión de cianobacterias procedentes del fotobiorreactor del laboratorio y fangos digeridos de la estación EDAR.
- Tres pretratamientos aplicados en cada una de las digestiones:
  - Pretratamiento térmico a 75 °C durante 24 horas.
  - Pretratamiento termoquímico con Cal (CaO) a 75 °C durante 24 horas. Para ello se emplearán dos concentraciones de Cal, las cuales son 4 % y 10% en peso de sólidos totales (ST).
  - Pretratamiento termoquímico con Sosa (NaOH) a 75 °C durante 24 horas. En este caso, las concentraciones de Sosa que se van a emplear son las mismas que en caso anterior: 4% y 10% en peso de ST.

Las concentraciones adicionadas de ambos reactivos químicos se calculan en un ensayo preliminar a la digestión anaeróbica (ver apartado 5.1) en el que el factor determinante para la selección de las mismas ha sido el pH de las muestras.

Además de las muestras que representan las condiciones de estudio, el ensayo debe incluir dos tipos más de botellas: los “Blancos” y los controles. Las primeras sirven para determinar la cantidad de gas producido por el inóculo, el cual debe permanecer en las producciones de las otras botellas para determinar la verdadera generación de biogás del sustrato a estudiar. Por este motivo, solo contienen inóculo y agua destilada, utilizada con el objetivo de que la botella contenga el mismo volumen que las demás.

En segundo lugar, se necesitan los controles sin tratar de las microalgas y cianobacterias con los fangos digeridos, ya que permiten determinar la mejora de producción de biogás cuando se aplica un pretratamiento y el posible efecto enzimático de realizar esta digestión.

Finalmente se ha considerado oportuno y viable hacer triplicados de todas las condiciones de estudio, para así poder detectar posibles errores y valorar mejor la consistencia de los resultados.

A continuación, se representan las tablas resumen (Tabla 4.1. y Tabla 4.2.) de las botellas-reactores a montar para realizar los ensayos tanto para el caso de las microalgas como de las cianobacterias:

*Tabla 4.1. Composición de cada una de las digestiones del ensayo Batch con microalgas.*

Muestra	Inóculo (g)	Algas (g)	Cianobacterias (g)	Cal (g)	Sosa (g)
Blanco	X	-	-	-	-
Control Algas	X	X	-	-	-
Algas Pret. Térmico	X	X	-	-	-
Algas Pret. Cal-4%	X	X	-	X	-
Algas Pret. Cal-10%	X	X	-	X	-
Algas Pret. Sosa-4%	X	X	-	-	X
Algas Pret. Sosa-10%	X	X	-	-	X

*Tabla 4.2. Composición de cada una de las digestiones del ensayo Batch con cianobacterias.*

Muestra	Inóculo (g)	Algas (g)	Cianobacterias (g)	Cal (g)	Sosa (g)
Blanco	X	-	-	-	-
Control Cianos	X	-	X	-	-
Cianos Pret. Térmico	X	-	X	-	-
Cianos Pret. Cal-4%	X	-	X	X	-
Cianos Pret. Cal-10%	X	-	X	X	-
Cianos Pret. Sosa-4%	X	-	X	-	X
Cianos Pret. Sosa-10%	X	-	X	-	X

#### 4.2.2. Preparación de las muestras

En primer lugar, se deben preparar los sustratos a usar para que tengan unas buenas condiciones para poder utilizarlos, es decir, que tengan una concentración de sólidos suficiente para que la digestión pueda tener lugar. La biomasa microalgal que se utiliza a lo largo de todo el ensayo son microalgas provenientes de las lagunas de alta carga y cianobacterias provenientes del fotobiorreactor del laboratorio. En ambos casos, la concentración de estas es muy baja, es decir, hay un bajo volumen de materia sólida respecto al volumen total del sustrato. Por este motivo, es necesario realizar un proceso de sedimentación mediante conos de decantación para conseguir la suficiente concentración.

El procedimiento a seguir para preparar las microalgas y las cianobacterias es purgar las lagunas y el FBR, respectivamente, para obtenerlas y a continuación verterlas en conos de decantación situados dentro de una nevera a 5 °C para no alterar la muestra. Al cabo de un día aproximadamente, se puede proceder a sacar el sobrenadante que hay en el cono y almacenar las microalgas y cianobacterias, concentradas en la parte inferior del cono, en una botella ubicada también dentro de la nevera a 5 °C.

Dependiendo de la producción de las lagunas y el FBR, después de una primera sedimentación en los conos de decantación, se puede volver a aplicar una segunda sedimentación durante unas horas para conseguir una concentración más elevada. En el presente estudio, este proceso se repetirá diariamente hasta que se consiga un volumen y concentración de sustrato considerables para realizar el ensayo y las diversas analíticas.

En caso de que la concentración sea muy baja y se requiera incrementar la concentración en ambos casos (microalgas y cianobacterias), se procede a centrifugar una parte de la muestra, se retira el sobrenadante resultante y la parte restante centrifugada se mezcla con el resto de la muestra sin centrifugar. De esta manera se consigue una concentración de sólidos suficiente para realizar el ensayo.



Figura 4.6. Conos de decantación para la sedimentación de la biomasa algal.

Los fangos digeridos empleados como inóculo, provenientes de la EDAR de Sant Feliu de Llobregat, son analizados previamente para determinar si es necesario concentrarlos más. Tras analizarlos se concluye que no requieren ningún tratamiento previo para su utilización en el ensayo, ya que tienen la suficiente concentración para ser utilizados directamente. Solo se deben guardar en la nevera a 5 °C hasta su utilización para evitar su degradación. Es muy importante mezclar bien la muestra procedente de la EDAR ya que puede decantar y provocar errores a la hora de realizar las analíticas. La muestra debe ser muy homogénea.

Una vez que las muestras de los sustratos y el inóculo están preparadas, se puede proceder a realizar las analíticas iniciales, previas a cualquier tipo de tratamiento. Los resultados sirven para determinar las cantidades necesarias de los componentes de cada una de las situaciones de estudio. Sin embargo, se utilizan para analizar la evolución de la presencia de materia orgánica en los puntos de referencia de este estudio: inicio del mismo, tras aplicar el pretratamiento y una vez terminado el ensayo; y para determinar la solubilización del sustrato a partir de los resultados obtenidos.

Teóricamente, el contenido total de materia orgánica no debería variar, pero por diferentes factores podría hacerlo. Las analíticas iniciales a llevar a cabo son: pH, sólidos totales y volátiles (ST, SV), DQO total (DQO, t) y DQO soluble (DQO, s) tanto del inóculo (BL) como de microalgas (A) y cianobacterias (C).

En el caso del inóculo, las analíticas se realizarán dos veces. Esto es así debido a que se realizan dos ensayos de digestión anaerobia con dos sustratos: microalgas y cianobacterias, y es necesario analizar el inóculo que se adiciona en cada uno de ellos.

**Tabla 4.3.** Caracterización inicial de los sustratos de la digestión anaeróbica.

Crisol	Muestra	ST(g/L) media	SV(g/L) media	SV/ST(%)	DQO(g/L) media
A	Algas	29,16	21,77	74,654%	20,43
Inoc.	Inóculo	21,44	13,08	61,000%	42,20
C	Cianos	33,38	22,28	66,747%	21,63
Inoc.	Inóculo	20,33	12,94	63,656%	35,13

Tal y como se observa en la tabla anterior, la cantidad de sólidos por unidad de volumen presentes en las cianobacterias es ligeramente superior que en las microalgas. Estos sólidos representan la cantidad de materia orgánica presente en cada sustrato y se han calculado mediante procedimientos de laboratorio definidos más abajo en el apartado "4.4. Métodos analíticos".

En ambos casos, se observa que el inóculo presenta valores muy similares en cuando a ST y SV; y que las diferencias que existen se pueden deber a diferencias en la homogeneidad de las muestras a la hora de tomar las mismas, sólidos en suspensión, etc. La DQO, t también es un parámetro a tener en cuenta en la caracterización del sustrato. Representa cómo de degradable es la sustancia en cuestión. Se observa que los valores de las microalgas y las cianobacterias son muy similares por lo que la biodegradabilidad de ambos sustratos es muy similar. Al igual que con los sólidos, se este parámetro se ha calculado por métodos analíticos definidos en el apartado correspondiente.

### 4.2.3. Preparación de los materiales

Para la realización del ensayo se necesitan diferentes materiales. Las botellas Pirex se utilizan para depositar el sustrato mientras se le aplica los pretratamientos térmico y termoquímico. Estas son resistentes a cambios térmicos de temperatura y por tanto aptas para ponerlas dentro de una estufa.

Por otra parte, se necesitan moscas, una para cada botella Pirex, para mantener los sustratos en agitación y asegurar que la mezcla esté en condiciones homogéneas. Por este motivo, dentro de la estufa se sitúa un agitador, el cual genera un campo magnético para mover la mosca del interior de la botella y, así, agitar su contenido.

También son necesarios tubos de ensayo para almacenar las cantidades extraídas para realizar las analíticas. Se utilizan estos tubos ya que en algunas analíticas se procede a la centrifugación de las muestras.

Todo este material debe estar debidamente identificado con la nomenclatura correspondiente a la muestra a la que hace referencia, con el punto de muestro al que pertenece y la fase de la misma (fase total o fase soluble), con el fin de evitar la confusión de las muestras.

Los tratamientos sobre las muestras se aplican mediante una estufa. La estufa debe llegar a la temperatura requerida antes de comenzar el ensayo y por lo tanto es necesario encenderla aproximadamente 1 hora antes y calibrarla con un termómetro, que se mantiene durante las primeras horas de ensayo dentro de la estufa para asegurar que no hay variaciones en las condiciones térmicas. Las condiciones térmicas a las que se aplican los pretratamientos son 75 °C durante 24 horas.

### 4.2.4. Aplicación de los pretratamientos

Una vez se han establecido las condiciones del ensayo se procede a prepararlo. En primer lugar, es necesario conocer el volumen de microalgas y el de las cianobacterias. Una botella Pirex tiene una capacidad de 200 mL y rellenarla con una cantidad de sustrato suficientemente elevada garantiza que cada una tenga, siempre, un volumen de contenido importante para reducir errores debido a posibles alteraciones posteriores durante el ensayo.

Finalmente, el volumen total necesario de microalgas y cianobacterias es igual a 840 mL en cada caso (140 mL x 6 botellas), correspondientes a las botellas de control más los volúmenes necesarios para realizar los pretratamientos a estudiar (Térmico, Cal 4%, Cal 10%, Sosa 4% y Sosa 10%). Análogamente se calcula el volumen necesario de fangos para la realización del ensayo.

- ***Preparación del pretratamiento térmico***

Una de las condiciones del ensayo es el pretratamiento térmico que se ha de aplicar, ya que es uno de los factores que mejora la producción de biogás como consecuencia del aumento del grado de solubilización.

El pretratamiento térmico que se ha escogido a aplicar es de 75 °C de temperatura durante 24 horas, tal como se explica en apartados anteriores. Estas condiciones del pretratamiento son las que mejor se adaptan a las circunstancias del presente estudio.

Para realizar el pretratamiento térmico se utilizan botellas Pirex de 200 mL de capacidad. Para cada pretratamiento solo se utiliza una botella: en el caso de microalgas y cianobacterias se llena una botella de cada sustrato, con una cantidad suficiente del sustrato para el ensayo. Cada una de las botellas se llena directamente con 140 mL del sustrato que debe contener.

Para poder introducir los volúmenes necesarios en las botellas Pirex se utiliza una probeta aforada. También dentro de las botellas se pone una mosca para poderlas mantener en agitación durante el pretratamiento. Una vez están montadas se cierran con el correspondiente tapón y se etiquetan adecuadamente para poderlas identificar. A continuación, se puede proceder a aplicar el pretratamiento térmico utilizando una estufa. La estufa se enciende previamente (1 hora) hasta llegar a 75 °C y se calibra mediante un termómetro. A continuación, se introducen las botellas para comenzar el tratamiento, colocándolas en el agitador magnético que se encuentra dentro de la estufa y así mantener el sustrato en condiciones homogéneas.

Pasadas 24 horas, se retiran las botellas y se puede proceder a realizar las analíticas correspondientes de los sustratos ya pretratados: pH, ST, SV, DQO t y DQO s.

- ***Preparación del pretratamiento termoquímico***

Análogo al pretratamiento térmico, en este caso se adiciona la cantidad de los componentes químicos (Cal y Sosa) en las concentraciones correspondientes: 4% y 10% en peso de ST en ambos casos. Estas concentraciones se han escogido así de acuerdo a un ensayo preliminar realizado (ver apartado 5.1) de forma que se pueda realizar una comparación entre una concentración reducida (4%) y una más elevada (10%) sin producir inhibición o daño celular.

La cantidad a añadir de cada componente químico se realiza en función de los sólidos totales correspondientes a cada sustrato: microalgas y cianobacterias. Es decir, se adiciona un 4% y un 10% en peso de los sólidos totales de cada uno de ellos. Esto se realiza así porque el reactivo químico adicionado afecta a toda la materia presente en la muestra.

Una vez vertida la cantidad correspondiente de cada compuesto químico en la botella Pirex que contiene los sustratos sin pretratar, se procede de la misma forma que en el caso del pretratamiento térmico.

#### **4.2.5. Montaje**

Después de aplicar los pretratamientos ya se tienen todos los sustratos necesarios para montar el ensayo Batch. Para determinar las cantidades que se deben introducir en cada botella-reactor se debe tener en cuenta las relaciones establecidas anteriormente entre el sustrato y el inóculo, las características iniciales del inóculo, de las microalgas y las cianobacterias y las proporciones de la biomasa algal con respecto al inóculo. Además, se debe tener en cuenta el volumen que debe ocupar todo el contenido a introducir dentro de la botella, ya que debe haber una parte del volumen de la botella destinado al biogás que se generará. Con este fin, se ha considerado que cada botella se puede llenar con un contenido total de 162,5 mL, dejando unos 60 mL para el biogás generado mediante la digestión de los dos sustratos.

Finalmente, para calcular las cantidades de los componentes a introducir se utilizan los siguientes factores de conversión y expresiones para cada situación, asumiendo que la relación óptima de sustrato/inóculo es de 0,5 g SV/g SV (*Passos et al., 2013*) y que las densidades de todos los componentes y muestras son iguales a 1 g/mL.

### Microalgas

En todas las botellas de este ensayo la cantidad de inóculo es la misma:

$$\text{Inóculo (g)} = 0,1045 l_{mezcla} \cdot \frac{5 \text{ gDQO}_{sustrato}}{1 l_{mezcla}} \cdot \frac{1 \text{ gSV}_{inóculo}}{0,5 \text{ gDQO}_{sustrato}} \cdot \frac{10^3 \text{ g}_{inóculo}}{13,08 \text{ gSV}_{inóculo}} \approx 77 \text{ g} \quad (1)$$

Para este ensayo de digestión correspondiente a las microalgas, el volumen de sustrato a introducir es el siguiente:

$$\text{Microalgas (g)} = 0,10405 l_{mezcla} \cdot \frac{5 \text{ gDQO}_{sustrato}}{1 l_{mezcla}} \cdot \frac{1 l_{sustrato}}{21,77 \text{ gDQO}_{sustrato}} \cdot \frac{10^3 \text{ g}_{sustrato}}{1 l_{sustrato}} \approx 24 \text{ g} \quad (2)$$

### Cianobacterias

Igual que ocurre en el caso de las microalgas, en todas las botellas de este ensayo la cantidad de inóculo es la misma:

$$\text{Inóculo (g)} = 0,1025 l_{mezcla} \cdot \frac{5 \text{ gDQO}_{sustrato}}{1 l_{mezcla}} \cdot \frac{1 \text{ gSV}_{inóculo}}{0,5 \text{ gDQO}_{sustrato}} \cdot \frac{10^3 \text{ g}_{inóculo}}{12,94 \text{ gSV}_{inóculo}} \approx 76 \text{ g} \quad (3)$$

Para las botellas correspondientes a las cianobacterias, el volumen de sustrato a introducir es el siguiente:

$$\text{Cianobacterias (g)} = 0,1025 l_{mezcla} \cdot \frac{5 \text{ gDQO}_{sustrato}}{1 l_{mezcla}} \cdot \frac{1 l_{sustrato}}{22,28 \text{ gDQO}_{sustrato}} \cdot \frac{10^3 \text{ g}_{sustrato}}{1 l_{sustrato}} \approx 23 \text{ g} \quad (4)$$

Las botellas se acabarán de llenar con agua destilada en caso de que sea necesario para, conociendo el espacio necesario para almacenar el biogás generado, alcanzar el volumen de 162,5 mL.

A su vez, tal y como se observa en la Tabla 4.5. se debe añadir el Bicarbonato Sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ), el cual actuará de tampón, regulando el pH y favoreciendo la alcalinidad de las botellas del ensayo y favoreciendo el proceso de digestión anaeróbica y por tanto la producción de biogás.

La concentración de reactivo que se adiciona en los casos en que se aplica un pretratamiento termoquímico, ya sea Cal o Sosa, deben calcularse como se ha

mencionado anteriormente (% ST) en relación a cada sustrato. Estas concentraciones se muestran a continuación.

**Tabla 4.4.** Cantidades teóricas de cada reactivo a adicionar en cada situación de estudio.

Muestra	Cal (g)	Sosa (g)	Muestra	Cal (g)	Sosa (g)
Algas Pret. Cal-4%	0,1701	-	Cianos Pret. Cal-4%	0,1947	-
Algas Pret. Cal-10%	0,4535	-	Cianos Pret. Cal-10%	0,5192	-
Algas Pret. Sosa-4%	-	0,1701	Cianos Pret. Sosa-4%	-	0,1947
Algas Pret. Sosa-10%	-	0,4535	Cianos Pret. Sosa-10%	-	0,5192

Los reactivos se pesan en una balanza de precisión mediante métodos analíticos explicados más adelante. La elevada precisión de la balanza permite colocar el casi el peso exacto del reactivo en cuestión dentro del recipiente habilitado para su pesaje.

No obstante, a pesar de esta precisión, la cantidad real que será adicionada en cada botella será diferente a la teórica y debemos tener en cuenta por tanto esta cantidad real pesada e introducida (Tabla 4.5.).

A continuación, se recogen las cantidades de cada uno de los componentes a tener en cuenta en el montaje del ensayo, los cuales son los introducidos en las botellas y son los que intervienen en el proceso de digestión anaeróbica:

**Tabla 4.5.** Cantidades de cada componente para la digestión anaeróbica en cada situación de estudio.

Muestra	Inóculo (g)	Algas (g)	Cianobacterias (g)	Cal (g)	Sosa (g)	Agua (g)	Tampón (mL)
Blanco	77	-	-	-	-	24	3,58
Control Algas	77	24	-	-	-	-	3,58
Algas Pret. Térmico	77	24	-	-	-	-	3,58
Algas Pret. Cal-4%	77	24	-	0,1703	-	-	3,58
Algas Pret. Cal-10%	77	24	-	0,4536	-	-	3,58
Algas Pret. Sosa-4%	77	24	-	-	0,1714	-	3,58
Algas Pret. Sosa-10%	77	24	-	-	0,4550	-	3,58

Muestra	Inóculo (g)	Algas (g)	Cianobacterias (g)	Cal (g)	Sosa (g)	Agua (g)	Tampón (mL)
Blanco	76	-	-	-	-	23	3,51
Control Cianos	76	-	23	-	-	-	3,51
Cianos Pret. Térmico	76	-	23	-	-	-	3,51
Cianos Pret. Cal-4%	76	-	23	0,1948	-	-	3,51
Cianos Pret. Cal-10%	76	-	23	0,5193	-	-	3,51
Cianos Pret. Sosa-4%	76	-	23	-	0,1953	-	3,51
Cianos Pret. Sosa-10%	76	-	23	-	0,5187	-	3,51

Después de determinar los componentes a introducir en cada botella se procede a montar las botellas-reactores. Estas botellas, específicas para realizar este ensayo, son de la marca Wheaton y son de un vidrio muy transparente, con una capacidad máxima de 162,5 mL y un diámetro de 55 mm. Hay que recordar que no se puede utilizar toda



la capacidad de la botella ya que debe haber espacio libre (60 mL aproximadamente) para permitir la acumulación del biogás generado.



*Figura 4.7. Botella-reactor Wheaton, una vez llenada y cerrada.*

Con la ayuda de una balanza de precisión de 0,1 g para pesar las cantidades necesarias, el proceso de montaje de las botellas se explica a continuación:

- I. Se tara la botella.
- II. Se introduce la cantidad de inóculo utilizando una jeringa.
- III. Se tara la botella de nuevo con el contenido de inóculo dentro.
- IV. Se introduce la cantidad necesaria de cada uno de los sustratos.
- V. Se tara la botella de nuevo para introducir el agua destilada.
- VI. Se introduce el agua destilada necesaria para enrasar a unos 102,5 mL mediante una bureta.
- VII. Finalmente, se añade la cantidad correspondiente de la disolución tampón.

Una vez se ha introducido toda la biomasa que interviene en el proceso de digestión se debe cerrar la botella.

La digestión es anaeróbica y por lo tanto se debe desalojar el oxígeno del interior del reactor. Para ello se desplaza el oxígeno del espacio libre mediante un gas inerte, el helio. El procedimiento consiste en introducir el helio con un conducto metálico durante 90 segundos, medidos con un cronómetro. Pasado este tiempo, se debe tapar rápidamente con un septum especial para cromatografía. La botella debe quedar cerrada herméticamente, de manera que con una herramienta específica, llamada "Crimp" se presiona el septum hasta que no se mueve.

A continuación, se agitan las botellas manualmente para homogeneizar el contenido, vigilando que no se manche el septum, ya que alteraría la cromatografía. La digestión debería realizarse en condiciones homogéneas y por tanto debería estar en agitación continuamente. Al ser un recipiente de volumen pequeño, agitando manualmente cada día es suficiente para mantener estas condiciones.

Finalmente, las botellas-reactores están listas y se pueden colocar en la incubadora a 37 °C. La digestión se ha decidido realizarla a temperaturas mesofílicas, ya que temperaturas más altas supondrían un coste energético elevado que no tiene sentido en el ámbito de este estudio.

A partir de aquí comienza el ensayo Batch. La producción de metano se irá determinando a lo largo del ensayo midiendo la evolución de la presión en el interior de los reactores y llevando a cabo un análisis de los componentes del gas a través de una cromatografía de gases. Las curvas de producción de metano se determinan a partir de los mililitros de metano por gramo de sólido soluble de sustrato, calculado tal como se expone en el apartado de “Métodos analíticos”.

Cuando el ensayo finaliza, se procede a abrir las botellas para poder hacer las analíticas finales. Para abrir las botellas también se utiliza una herramienta especial, llamada “Decapper”. Las analíticas finales sirven para ver cómo ha variado el contenido del interior del reactor después de la digestión anaerobia.



*Figura 4.8. Arriba Crimp y abajo Decapper.*



*Figura 4.9. Incubadora donde se realiza la digestión anaerobia con las botellas en su interior.*

### 4.3. Métodos analíticos

#### 4.3.1. Parámetros de la caracterización de los sustratos

La caracterización de los sustratos es muy importante para ver cómo evolucionan a lo largo de los ensayos. Además, permiten obtener resultados comparables a otras bibliografías. Por este motivo se analizan los sólidos volátiles totales y la demanda química de oxígeno total y soluble.

El procedimiento a seguir para llevar a cabo estos métodos analíticos está estandarizado según el “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995)”. Estas analíticas se han llevado a cabo en el laboratorio de análisis de la sección de Ingeniería Sanitaria y Ambiental del Departamento de Ingeniería Hidráulica, Marítima y Ambiental (DEHMA) de la UPC.

#### Sólidos volátiles totales (SV, t)

La determinación de los sólidos volátiles totales (SV, t) sirve para determinar la materia orgánica que hay en una muestra. La materia orgánica a 550 °C se volatiliza, por lo tanto, su cuantificación se puede relacionar con aquel peso que se pierde en un

proceso de incineración mientras que las cenizas restantes se asocian a la materia inorgánica.

El proceso para conocer los SV, requiere primero la determinación de los sólidos totales o materia seca (ST), es decir, aquella materia que no contiene agua y que está compuesta tanto por materia orgánica como inorgánica. Para ello, se introduce un volumen conocido de muestra en un crisol (cazoleta de cerámica) el cual ha sido previamente muflado a 550 °C durante 20 minutos y tarado (T). De esta manera se puede conocer la masa del volumen introducido (PS). Seguidamente, se introduce el crisol en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se retira y se deja enfriar en un desecador hasta que llegue a temperatura ambiente, momento en el que ya es estable para ser pesado. Con el último valor obtenido (PM) y la cantidad inicial de muestra se puede calcular la cantidad de ST, expresada como el porcentaje de esta respecto a la cantidad de muestra inicial.

$$ST[\%] = \frac{PS - T}{PM} \times 100 \quad (5)$$

A continuación, se procede a muflar el crisol a 550 °C durante 20 minutos para calcinar la muestra. Cuando transcurren esos minutos se retira para dejar enfriar en un desecador, donde se le hace el vacío para acelerar el proceso, hasta que se llega a temperatura ambiente y se puede pesar. Los SV se calculan a partir de la diferencia entre el peso de la materia seca (PS) y el peso de las cenizas restantes de la calcinación (PC), y es expresado como el tanto por ciento respecto a la masa de la muestra inicial (PM).

$$SV[\%] = \frac{PS - PC}{PM} \times 100 \quad (6)$$

Para hacer un buen análisis se realizarán triplicados de todas las muestras. De esta manera se puede hacer una media y determinar el error existente. Si este supera el 10% es mejor realizar un Crisol con más de la muestra en cuestión para poder obtener un resultado más preciso.



**Figura 4.10.** Estufa para secar los crisoles a 105 °C.



**Figura 4.11.** Desecador con los crisoles en su interior.



Figura 4.12. Mufla.



Figura 4.13. Balanza de precisión.

#### Demanda Química de Oxígeno total (DQO, t)

La DQO es una medida indirecta de la materia orgánica y determina los compuestos oxidables presentes en una determinada muestra. Se define como la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar químicamente la materia orgánica y los compuestos oxidables de la muestra de forma completa, y los resultados se expresan en ppm. Una forma más precisa de medida de la materia orgánica sería determinar la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) pero la DQO es más utilizada por su sencillez.

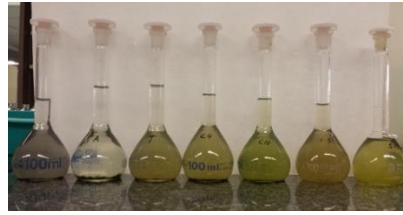
La obtención de la DQO consiste en la oxidación de la muestra sometiéndola con un oxidante en exceso que actúa como solución digestora, el dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ), y en condiciones extremas: en medio ácido ( $H_2SO_4$ ) y a una temperatura de  $150\text{ }^\circ\text{C}$  durante dos horas.

El método que se ha utilizado para su determinación es el de reflujo cerrado o método colorimétrico. Para su realización se han utilizado tubos de vidrio de 10 mL con tapón de rosca, en los que se han podido introducir en un digestor a  $150\text{ }^\circ\text{C}$  durante las dos primeras horas de ensayo.

Tal y como indica el método para determinar la concentración de DQO se mide la absorbancia de cada tubo con un espectrofotómetro (Lovibond MD 600 SN 15/6315), una vez haya finalizado su estancia en el digestor y sea estable a temperatura ambiente. Este aparato ya tiene introducida una recta patrón, calibrada con el valor de la absorbancia del tubo "blanco", para dar los resultados directamente en ppm. De este modo, la absorbancia del resto de tubos se determina por comparación con la del blanco. Por este motivo se deben preparar unos tubos que contengan agua destilada en lugar de la muestra, los cuales equivalen a la absorbancia cero. Por otra parte, el método solo sirve para el rango de valores que mide el aparato: de 7.468 mg/L hasta 1.004 mg/L. Así pues, las muestras con concentraciones más elevadas deben diluirse aplicando un factor de dilución, que debe tenerse en cuenta en la determinación final de la DQO y que es diferente según el sustrato a analizar.

El proceso a seguir para preparar los tubos y medir la absorbancia es el siguiente:

- I. Se realizan las diluciones necesarias para hacer entrar las muestras dentro del rango de lecturas posibles por el aparato.



*Figura 4.14. Diluciones de las muestras realizadas para el análisis de la DQO.*

- II. Se introducen 2,5 mL de la muestra diluida, si ha sido necesario, en los tubos de vidrio. A continuación, se añaden 1,5 mL de la solución digestora y 3,5 mL de la solución ácida respetando este orden. Los blancos se llenan con 2,5 mL de agua destilada en lugar de la muestra.
- III. Una vez que los tubos se han llenado, se tapan, se agitan para homogeneizar el contenido y se introducen en el digestor (Placa calefactora P-SELECTA) a 150 °C durante dos horas.
- IV. Transcurrido el tiempo de digestión, se retiran los tubos y se dejan enfriar a temperatura ambiente.
- V. Cuando los tubos están atemperados, se limpian por el exterior con alcohol y se procede a medir la absorbancia mediante el espectrofotómetro, realizando primero la calibración de los blancos.

En todos los casos que se analizan se hacen triplicados de las muestras para determinar el resultado de la DQO final como un valor medio y calcular la desviación para identificar posibles errores.



*Figura 4.15. Placa digestora con los tubos de DQO.*



*Figura 4.16. Espectrofotómetro.*

#### Demanda Química de Oxígeno soluble (DQO, s)

La demanda química de oxígeno soluble sigue el mismo procedimiento que la DQO total con la diferencia de que solo se analiza la parte soluble de la muestra. Para obtener esta fracción de la muestra se realiza la centrifugación y la filtración previa de la muestra.

La muestra se centrifuga a 4.200 rpm durante 8 minutos (centrifuga Orto-Alresa modelo UNICEN 20). Seguidamente, la muestra de sobrenadante se filtra mediante filtros de vidrio de 47 nm de poro y se obtiene la parte soluble de la muestra con la cual se determina la DQO, s.

Cabe destacar que las muestras solubles son más susceptibles de tener errores debido a su bajo contenido en sólidos. Por este motivo, pequeñas variaciones pueden afectar los resultados.

#### **4.3.2. Análisis proximal**

El análisis proximal consiste en un método el cual nos determina la cantidad de humedad, sólidos inorgánicos y/o cenizas, así como de lípidos, carbohidratos y proteínas, componentes mayoritarios y determinantes en la composición de cada sustrato empleado.

Para determinar la cantidad de lípidos, proteínas y carbohidratos se realizan diferentes ensayos, los cuales se explican a continuación.

#### Lípidos

La determinación de los lípidos presentes en cada sustrato se determina mediante los siguientes ensayos de laboratorio, realizados en el orden en que se explican a continuación:

##### - *Hidrólisis*

Se coloca la muestra seca y triturada en un recipiente y se introduce al baño María. En este medio se calentará y se realizará la hidrólisis de la muestra. Es muy importante que el recipiente donde se realiza el baño María no se quede sin agua ya que el proceso de hidrólisis se detendría.

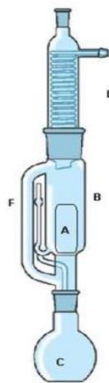
Transcurridos 60 minutos en el baño a 100 °C, se detiene el ensayo y se retira el contenido. La muestra se filtra con un papel de filtro Whatman "40 Ashless", previamente tarado, y se recoge en un Erlenmeyer ayudándonos con agua destilada para que se filtre toda la muestra de forma óptima. El Erlenmeyer con la muestra se rellena con agua destilada y se guarda para ensayos posteriores, como el de la caracterización de los carbohidratos.

El sólido retenido en el filtro se seca y se guarda para, posteriormente, realizar el ensayo Soxhlet. El filtro se vuelve a pesar tras este proceso para comprobar la cantidad de sólidos que han sido retenidos en el mismo.

- *Método Soxhlet*

La extracción Soxhlet consiste en el lavado sucesivo de una mezcla sólida con un determinado solvente, el cual es una dilución 2/1 de Cloroformo y Metanol en este caso. Este disolvente va lavando o extrayendo de la mezcla los componentes más solubles presentes en ella. Mediante el lavado sucesivo de esta mezcla sólida se pueden extraer de ella componentes cuya solubilidad en el solvente extractante es muy baja debido al efecto acumulado de las múltiples extracciones.

El equipo Soxhlet tiene como función recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente de disolvente que se encuentra en evaporación continua, arrastrando consigo los principios activos de la materia prima o muestra, contenida en los cartuchos de celulosa desechables.



**Figura 4.17.** Esquema del equipo de extracción Soxhlet. "Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido" (A. Caldas).



**Figura 4.18.** Cartucho de celulosa y solvente impregnado con el sólido.



**Figura 4.19.** Instalación del equipo Soxhlet.

De esta forma, el sólido obtenido en la hidrólisis y retenido en el filtro se introduce gracias a una navecilla en un cartucho de celulosa poroso (A) que permite al solvente (Cloroformo/Metanol) entrar y salir reteniendo el sólido. Este cartucho se coloca dentro del recipiente (B) al cual se le adosa un balón de fondo redondo (C) en su parte inferior que contendrá un volumen de solvente (250 mL) que se utilizará en la extracción.

Por el extremo superior del recipiente se coloca un condensador (D) conectado a la toma de agua, la cual será el refrigerante encargado de condensar los gases que se formen en el proceso para ser recirculados al recipiente.

El solvente se calienta mediante una resistencia térmica produciendo que los vapores asciendan por el tubo interior (E), condensen debido al refrigerante y caigan dentro del recipiente impregnando el sólido que se encuentra en el cartucho de celulosa.

El recipiente se va llenando lentamente de solvente en estado líquido hasta que alcanza el orificio del tubo (F) y, mediante el efecto de vasos comunicantes, se descarga dentro del balón. Este proceso se denomina "sifonada" y se repite sucesiva y automáticamente.

Una vez que el tiempo de cada sifonada se realiza de forma constante (cada 5 minutos aproximadamente), se puede conocer el tiempo que este proceso de extracción debe realizarse ya que, para una extracción óptima, se requieren al menos 50 sifonadas.

Una vez terminado el proceso, se retira el balón y se extrae la muestra contenida en el mismo, la cual será empleada en el análisis proximal (explicado más adelante).

Se debe destacar que el papel de filtro se vuelve a pesar tras el vaciado del mismo en el cartucho de celulosa, comprobando la cantidad de sólido que no ha podido ser aprovechada y por tanto, no ha sido introducida en el cartucho para el ensayo Soxhlet. Esta cantidad será mínima o se deberá intentar que lo sea.

### Carbohidratos

El contenido total de carbohidratos de medios líquidos o extractos puede ser determinado como azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados; dando un color naranja muy estable cuando reaccionan con fenol y en presencia de ácido sulfúrico concentrado.

La intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presente. Esta absorbancia puede ser medida a 492 nm y la concentración total de carbohidratos de las soluciones problema puede ser medida con respecto a una curva estándar preparada.

La curva estándar se realizará mediante soluciones de glucosa preparadas a distintas concentraciones: 0 (blanco), 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/L; a partir de una disolución patrón de glucosa de concentración 411 mg/L conservada en la nevera.



*Figura 4.20. Blanco y soluciones de glucosa para realizar la curva estándar preparada.*

Para la caracterización de la cantidad de carbohidratos presentes en la composición del sustrato del ensayo se toma la muestra líquida contenida en el Erlenmeyer obtenida en el proceso de hidrólisis.

El procedimiento tanto para la curva estándar como para las muestras a analizar es el siguiente:



- I. Tomar 1 mL de solución de analito, el blanco y solución estándar en tubos de ensayos listos.
- II. Adicionar 0,5 mL de solución de fenol concentrado al 5%.
- III. Adicionar de forma rápida 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- IV. Llevar al vortex para mezclar y capturar algunos restos del ácido por las paredes del tubo.
- V. Dejar reposar 10-15 minutos.
- VI. Colocar los tubos en un baño de agua a 35 °C durante 15 minutos.
- VII. Transferir a la celda de amonio para su lectura en el espectrofotómetro modelo Genesys 8.
- VIII. Leer la absorbancia a 492 nm.



*Figura 4.21. Espectrofotómetro modelo Genesys 8.*

La absorbancia obtenida corresponde con una determinada concentración de glucosa contenida en cada muestra. Esta correlación viene determinada por la siguiente ecuación (7), obtenida a partir de la curva estándar preparada y teniendo en cuenta el factor de dilución (FD) de cada muestra:

$$CH = (71,679 \cdot abs - 0,0789) \cdot FD \quad (7)$$

### Proteínas

El presente ensayo se realiza adicionando a la muestra sólida previamente pesada en un tubo de digestión a la cual se le añaden 15 mL de una disolución de ácido sulfúrico, la cual provocará una ruptura en la estructura del sustrato liberando los componentes de nitrógeno. Posteriormente se añade agua, con un volumen aproximado de 25 mL para arrastrar los sólidos que puedan quedar en las paredes del digestor.

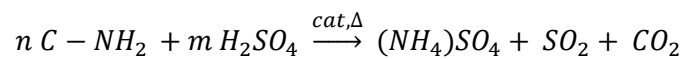
Los tubos de digestión se colocan en un soporte destinado para la realización de la digestión de la muestra contenida en el interior. Este soporte se tapa con una chapa metálica para evitar fugas que puedan dañar al equipo en sí u otros que se encuentren situados a su alrededor.

Tras la digestión, la muestra presenta un color azul turquesa. Esto nos indica que la misma ha terminado. Una vez finalizada, se procede a analizar cada muestra en dos equipos destinados a ello. Uno de ellos determinará la cantidad de nitrógeno Kjeldahl total (NKT) y el otro, un cromatógrafo, la cantidad de nitritos y nitratos de cada sustrato.

Para el cálculo del nitrógeno Kjeldahl se introduce la muestra en un equipo que, por adición de reactivos, lo cual provoca tres reacciones consecutivas, determina la cantidad de nitrógeno. Las reacciones son las siguientes:

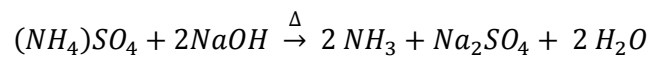
### **Digestión**

En esta etapa, cierta cantidad de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) es adicionada al componente proteínico, obteniendo Sulfato de Amonio, Dióxido de Azufre y Dióxido de Carbono. La reacción que determina este proceso es la siguiente:

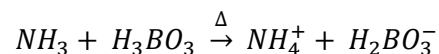


### **Destilación**

En esta etapa se añade Sosa en exceso al Sulfato de Amonio provocando una reacción química en la que se obtiene Amoníaco (vapor), Sulfato de Sodio y agua.

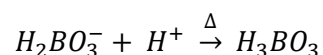


A continuación, se añade Ácido Bórico en exceso al Amoníaco obteniendo ion Amonio e ion Borato.

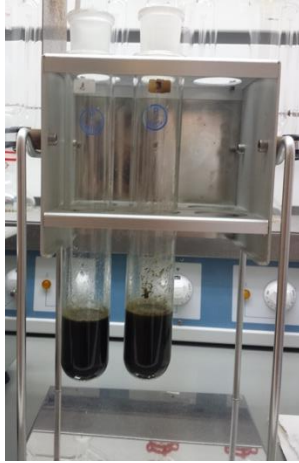


### **Titulación**

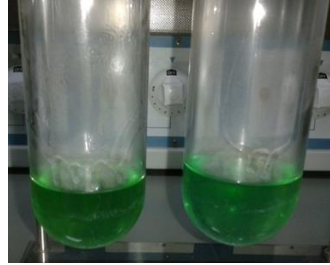
Esta etapa consiste en la recuperación del Ácido Bórico a partir del ion Borato para poder ser utilizado en reacciones de ensayos posteriores. Para ello se debe hacer reaccionar este último con un protón hidrógeno.



Por otro lado, los nitritos y nitratos serán obtenidos mediante cromatografía. Conociendo los valores de estos componentes y restando los nitritos y nitratos al nitrógeno Kjeldahl, se obtiene la cantidad de nitrógeno correspondiente a proteínas que contiene el sustrato en cuestión.



**Figura 4.22.** Muestras colocadas en los digestores.



**Figura 4.23.** Digestión finalizada de las muestras.



**Figura 4.24.** Equipo de análisis del nitrógeno Kjeldahl.

#### ❖ Cálculos posteriores a las analíticas

El análisis proximal se emplea para determinar la composición de los sustratos empleados en el presente estudio: microalgas y cianobacterias. Para ello se emplearán las siguientes ecuaciones a partir de los datos obtenidos de sólidos volátiles y sólidos totales.

$$\text{Contenido en humedad [W](\%)} = \frac{\text{Peso muestra (g)} - \text{Sólidos totales (g)}}{\text{Peso muestra (g)}} \quad (8)$$

$$\text{Contenido en materia orgánica [MO] (\%)} = \frac{\text{Sólidos volátiles (g)}}{\text{Sólidos totales (g)}} \quad (9)$$

$$\text{Lípidos (\% SV)} = \frac{\text{Lípidos (g)}}{\text{Hidrolizado (g)}} \cdot \frac{\text{Hidrolizado (no filtrado) (g)}}{\text{Muestra base seca (g)}} \cdot \frac{100 \text{ g Muestra base seca}}{\text{Materia orgánica (g)}} \quad (10)$$

$$\text{Proteínas (\% SV)} = \frac{\text{NKT (g)}}{\text{Muestra base seca (g)}} \cdot \frac{100 \text{ g Muestra base seca}}{\text{Materia orgánica (g)}} \cdot \text{Factor Proteínico}^* \quad (11)$$

\*El factor proteínico indica la cantidad de nitrógeno presente en 100 gramos de proteínas. Se asume que su valor es 5,95 (100 g proteínas / 16,807 g nitrógeno).

$$\text{Carbohidratos (\% SV)} = \frac{\text{Glucosa (g)}}{\text{Muestra base seca (g)}} \cdot \frac{100 \text{ Muestra base seca (g)}}{\text{Materia orgánica (g)}} \quad (12)$$

### 4.3.3. Cuantificación y análisis de la composición del biogás

La determinación de la producción de metano se determina mediante la evolución de la presión en el interior de la botella, ya que debido a la digestión se acumula gas y aumenta la presión.

La producción de gas no siempre sigue la misma evolución, siendo la primera semana la etapa en la que se concentra la mayor generación de biogás. Desde entonces, la producción de biogás sigue aumentando, pero cada vez más lentamente, hasta tender a una asíntota. Por este motivo, no se realizarán mediciones con la misma frecuencia a lo largo del ensayo.

La primera medida se realiza aproximadamente después de 24 horas de su inicio. Durante la primera semana, las medidas son diarias, ya que es el periodo en el que se necesita tener la máxima información posible debido al alto rendimiento de producción. Después, la frecuencia se reduce a tomar medidas cada 2-3 días. Finalmente, cuando la producción de gas ha disminuido considerablemente, normalmente a partir de la tercera semana, la medida de la presión se puede hacer dos veces por semana. El ensayo finaliza al cabo de 30-50 días, según otros estudios realizados, cuando la producción de biogás se estabiliza y tiende a una asíntota. En este momento se toma la última medida.

Por otra parte, también se necesita el porcentaje de metano en el biogás generado. Para su determinación se lleva a cabo una cromatografía de gases, que se repite a lo largo del ensayo para valorar si las características del gas varían.

#### Medida de la presión

Para realizar la medida de la presión se utiliza un manómetro digital GMH3151 de Greisinger electrónico. Antes de hacer la medida se debe agitar la botella para asegurar que no quede gas atrapado en el sustrato. Tras esto, se puede realizar la medida, atravesando con la aguja del manómetro el septum para penetrar el interior de la botella y anotando la presión pico que se observa. Con la ayuda de otra aguja, se vuelve a pinchar el septum para vaciar lentamente el contenido de biogás del interior de la botella, hasta dejarla a una presión cercana a la atmosférica.

De este modo, se evitan pérdidas de gas para presiones elevadas y se regula la presión del interior de cada botella después de cada medida. El valor final de la presión en el interior de la botella también se anota. Además, este vaciado de cada reactor cada vez que se mide es necesario para volver a dejar espacio para la acumulación de gas. Las diferencias entre presiones iniciales y finales son las que determinan las producciones de biogás.



*Figura 4.25. Manómetro para la medida de la presión.*

### Composición del biogás

La cromatografía de gases es el método utilizado para analizar el porcentaje de cada componente del biogás. De esta manera se determina cuál es la presencia del metano en el gas generado y por tanto su calidad. La técnica se basa en la separación de gases volátiles o semivolátiles.

La muestra a analizar se introduce en el puerto de inyección del cromatógrafo donde se volatiliza y los vapores o gases formados son arrastrados por un gas inerte a una columna cromatográfica. El diferente grado de interacción de los componentes de la mezcla con la fase estacionaria de la columna permite su separación.

Finalmente, los componentes separados pueden ser detectados, caracterizados y cuantificados empleando varios detectores.

El cromatógrafo utilizado es el modelo trace de la marca Thermo Finnigan y consta de un detector del tipo TCD (Termal Conductivity Detector), que mide la conductividad térmica del gas portador (helio) ocasionada por la presencia de las sustancias inyectadas. El detector envía un impulso eléctrico a un software y representa un cromatograma, gráfico donde se representa la respuesta del detector en función del tiempo.

En el cromatograma aparecen representados dos picos, correspondientes a los dos gases que componen el biogás. El metano ( $\text{CH}_4$ ) aparece primero por tener mayor conductividad térmica y a continuación se identifica el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). El área de cada pico es proporcional a la cantidad de moles de cada gas.

Para poder establecer una relación entre el área y los moles, se utilizan rectas calibradas correspondientes al cromatógrafo.

$$\text{Moles } (\text{CH}_4) = 1.9678 \cdot 10^{-12} \cdot \text{Área} + 1,54504 \cdot 10^{-8} \quad (13)$$

$$\text{Moles } (\text{CO}_2) = 1.7056 \cdot 10^{-12} \cdot \text{Área} + 1.734336 \cdot 10^{-7} \quad (14)$$

El porcentaje de metano presente en el gas se determina como los moles de metano respecto a los moles totales del gas, es decir, la suma de moles de metano y de dióxido de carbono. El tanto por ciento de dióxido de carbono no es necesario para el presente estudio, pero se calcula de manera análoga para poder ver la proporción de cada gas.

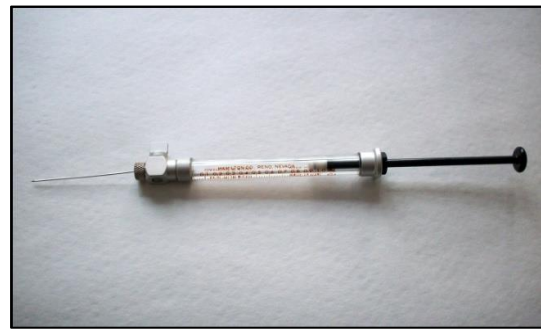
Para realizar la cromatografía, se inyecta una muestra de gas de 1 mL extraído de la cabecera de la botella al cromatógrafo, mediante una jeringa con aguja cromatográfica a través de una válvula de cierre, empleada para mantener las sobrepresiones y evitar que se escape el gas. Del cromatógrafo se obtienen los datos sobre las áreas pico del  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , que tal y como el procedimiento explica, se transforman en moles correspondientes de cada uno de los componentes.

La determinación del porcentaje de metano de un sustrato en cuestión se determina como un promedio a partir de las tres botellas que contienen el mismo tipo de sustratos. Además, se permite calcular la variación entre las botellas para verificar que no haya alteraciones en los resultados.

Por otra parte, la cromatografía se realiza cuatro veces, con periodos repartidos equidistantes temporalmente, para ver si hay alguna evolución en la calidad del metano.



*Figura 4.26. Cromatógrafo.*



*Figura 4.27. Jeringa con aguja cromatográfica.*

#### **4.3.4. Aplicaciones**

##### Determinación de las curvas de producción acumulada de metano

Con los datos obtenidos a partir de los métodos analíticos expuestos se puede proceder al cálculo de la producción de metano para la posterior elaboración de sus curvas de producción. Los incrementos de presiones equivalen al gas producido y si estos se multiplican por el porcentaje de metano presente en el gas, se obtiene la cantidad de metano generado. Pero hay una serie de cálculos para expresar los resultados de manera que permita su comprensión y comparación con otros estudios.

En primer lugar, los incrementos de presiones se calculan como la diferencia de presión inicial medida en un punto del muestreo menos la presión final de la medida anterior, por ser el valor de referencia sobre el que se acumula el gas. Estos incrementos se suman consecutivamente para obtener la producción acumulada de biogás.

Los resultados obtenidos no permiten su comparación con otros estudios ya que están ligados a las condiciones del ensayo como son la temperatura (37 °C) o el volumen donde se almacena el gas (60 mL). Por este motivo se expresarán en mL en condiciones normales (0 °C y 1 atm) por ser la forma más generalizada de presentarlos. Mediante la ley de los gases ideales se realizan las conversiones necesarias.

En segundo lugar, se debe restar el gas generado por el inóculo para obtener la producción propia del sustrato que se estudia. Aquí es donde adquieren sentido los Blancos, ya que indican la producción de biogás del inóculo. Con este proceso la producción de biogás acumulada ( $V_{acum_i}$ ) en un punto del muestreo "i" se calcula:

$$V_{acum_i} = \sum_{j=0}^i V_j - V_{Bl_j} \quad (19)$$

Donde  $V_j$  es el volumen en condiciones normales de gas producido por la biomasa total de la digestión y  $V_{Bl_j}$  es el biogás producido por el Blanco en un punto "i" del muestreo.

Adicionalmente, es mejor representar los resultados como una tasa de producción de metano. Esta es el volumen de biogás producido por un gramo de la concentración de sólidos volátiles iniciales del sustrato. De esta manera, los resultados se expresan de forma relativa y facilitan las comparaciones con otros estudios.

$$Tasa\ de\ producción\ de\ biogás_i = \frac{V_{acum_i}}{SV_{sustrato}} \quad (20)$$

Finalmente, la tasa de producción de biogás se multiplica por el porcentaje de metano presente en el sustrato en cuestión para obtener la producción respecto a este componente.

Con los resultados obtenidos se pueden trazar las curvas de producción acumulada de metano expresadas como tasa de producción. Las curvas son gráficas donde el eje de abscisas representa el tiempo, normalmente en días, y el eje de ordenadas la producción acumulada de metano, en este caso en mL de CH<sub>4</sub> / g SV de sustrato. Por cada punto de muestreo se obtiene un punto en la gráfica y extrapolando este queda dibujada la curva en cuestión.

## 5. Resultados y discusión

Seguidamente se presentan los resultados obtenidos fruto del estudio realizado durante seis meses. Este consta de unos primeros ensayos de solubilización para seleccionar las características del pretratamiento a aplicar en el posterior ensayo batch, para la determinación del potencial de biogás de la digestión de microalgas y fangos digeridos.

Este capítulo Resultados trata en el primer apartado 5.1 la selección de la cantidad de reactivos químicos a adicionar, tanto de Cal como de Sosa, en ambos pretratamientos para los dos sustratos. A continuación, se explican los ensayos referentes a la aplicación de los pretratamientos a cada sustrato. Seguidamente se deja paso al estudio del ensayo batch en el apartado 5.3 donde se analizan todos aquellos factores necesarios para evaluar los objetivos planteados al inicio de la tesina.

### 5.1. Selección de la cantidad del reactivo químico para el tratamiento termoquímico

Tal y como se ha explicado en apartados anteriores la cantidad de los compuestos químicos Cal y Sosa que se van a aplicar durante el ensayo sobre los sustratos y que conforman el tratamiento alcalino-térmico es del 4% y 10% en peso con respecto a los sólidos totales

Primero de todo, se realizó un análisis de pH para observar cómo variaba este en función de la proporción de cada componente químico en el sustrato. La cantidad vertida se calculó en función de los sólidos totales de las microalgas recogidas para el ensayo:

$$\text{Cantidad de } \frac{\text{reactivo}}{\text{botella}} = \frac{\text{mg ST} \cdot \% \text{reactivo}}{1 - \% \text{reactivo}} = \text{mg React.}$$

Siendo

$$\text{Cantidad de ST} = \frac{\text{g ST/kg} \cdot \text{Volumen muestra (mL)}}{1.000} = \text{mg ST}$$

**Tabla 5.1.** Cantidad de reactivo térmico y real adicionado en función de los ST de las microalgas.

mgTS	% (w/w; ST)	g Reactivo/bottle	ng Reactivo/bottle	g CaO/bottle pesados	g NaOH/bottle pesados
0,5831	4	0,0243	24,297	0,0269	0,0261
	6	0,0372	37,221	0,0399	0,0400
	8	0,0507	50,707	0,0543	0,0542
	10	0,0648	64,792	0,0701	0,0699

Tal y como se observa en la Tabla 5.2 el pH en ambos casos, Cal y Sosa, aumenta considerablemente. Esto es lógico y es debido a la adición de los compuestos químicos alcalinos. Se observa también que, a mayor concentración de reactivo, mayor será el pH de la muestra.

Tras haber adicionado el reactivo químico y haber realizado la medida de pH, se almacenan las botellas a 50 °C durante 24 horas para comprobar el efecto de los componentes alcalinos en el pH.



**Tabla 5.2.** Medida de pH tras adicionar los componentes químicos a 50 °C y transcurridas 24 horas.

% (w/w; ST)	CaO (T = 50 °C; t = 24h)			NaOH (T = 50 °C; t = 24h)					
	CaO pH inicial	CaO pH final (inicial trat)	pH final trat	NaOH pH inicial	NaOH pH final (inicial trat)	pH final trat			
4	7,26 (0,072)	12,00	11,92	9,47	7,27 (0,082)	10,63	10,52	7,25	
6		12,25	12,31			10,90	11,72	11,69	9,21
8		12,48	12,50			11,97	12,11	12,15	10,42
10		12,68	12,58			12,25	12,57	12,50	12,06

En ambos casos el pH disminuye de forma inversamente proporcional al valor del mismo, es decir, cuanto mayor es el pH tras adicionar los reactivos químicos menor será la variación de este indicador transcurridas 24 horas con la muestra a 50 °C. Se observa que esta variación no es igual en el caso de la Cal que en el de la Sosa, produciéndose en el caso de la Sosa una variación más pronunciada a pH menores.

Tras este ensayo, se decide realizar los pretratamientos con ambos reactivos químicos a 4% y 10% de concentración en peso. Esto se realiza así para poder realizar una comparación más precisa ya que el comportamiento de la variación del pH en las muestras es bastante distinto en ambos casos.

## 5.2. Ensayo de aplicación de los pretratamientos térmicos y alcalino-térmico en los sustratos a utilizar en la digestión.

### 5.2.1. Características iniciales de los sustratos.

Para iniciar el ensayo es necesario caracterizar el sustrato para proceder al montaje del mismo, como se indica en el apartado Métodos analíticos, y poder ver cómo se ve afectado cada sustrato después de aplicar los distintos pretratamientos. Sin embargo, este ensayo previo se focaliza en la variación de la solubilización y las posibles diferencias de los pretratamientos. Las características de los sustratos se recogen en la siguiente tabla (Tabla 5.3.):

**Tabla 5.3.** Caracterización inicial de los sustratos y el inóculo.

Muestra	pH	ST (g/L) media	SV (g/L) media	SV/ST (%)	DQO (g/L) media
Algas	7,63	29,16	21,77	74,654%	20,43
Inóculo	7,66	21,44	13,08	61,000%	42,20
Cianos	8,18	33,38	22,28	66,747%	21,63
Inóculo	7,53	20,33	12,94	63,656%	35,13

A continuación, se exponen los resultados obtenidos por analíticas de laboratorio correspondientes a los dos sustratos, microalgas y cianobacterias, tras haberles aplicado el pretratamiento y en el momento inmediatamente previo al inicio del ensayo en discontinuo de la digestión anaerobia o ensayo Batch.

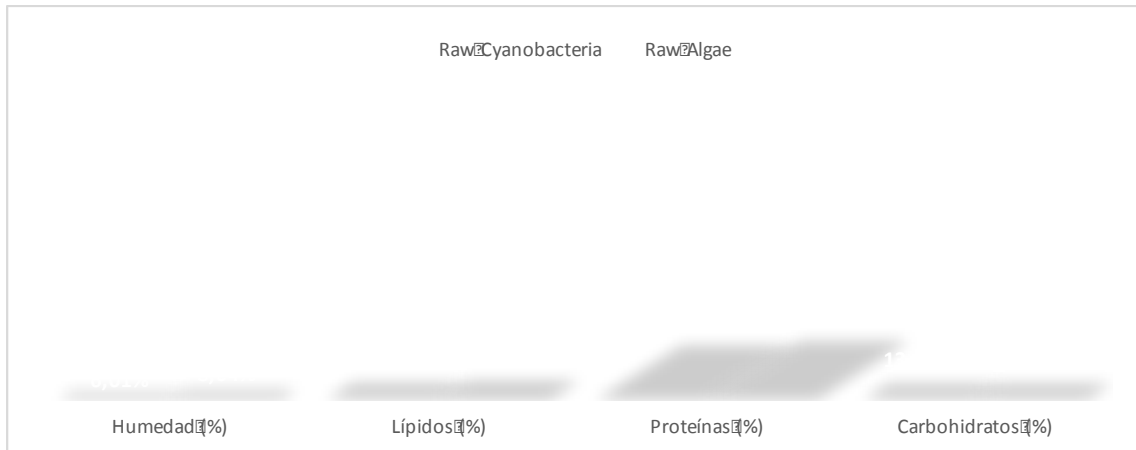
Los resultados obtenidos para cada sustrato empleado en este estudio se representan a continuación (Tabla 5.4. y Tabla 5.5.).

**Tabla 5.4.** Composición de las microalgas utilizadas como sustrato en el ensayo.

Raw Algae				
Humedad (%)	Materia Orgánica (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)
8,04%	75,20%	16,87%	50,39%	13,70%

**Tabla 5.5.** Composición de las cianobacterias utilizadas como sustrato en el ensayo.

Raw Cyanobacteria				
Humedad (%)	Materia Orgánica (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)
6,01%	67,38%	14,31%	47,71%	13,69%

**Figura 5.1.** Composición de las microalgas y las cianobacterias.

Tal y como se muestra en la figura anterior, la composición de ambos sustratos es bastante similar. Existen pequeñas diferencias que influirán en la producción y composición del biogás obtenido en las digestiones.

Se debe destacar que los elementos restantes (hasta 100%) se considera materia inorgánica presente en los sustratos y que por tanto no influyen en la digestión anaeróbica de los mismos.

### 5.2.2. Pretratamiento térmico y alcalino-térmico: Caracterización de los estratos después del pretratamiento.

Tal y como se ha explicado anteriormente, la aplicación de los pretratamientos se realiza con el objetivo de romper la pared celular y así poder acceder con mayor facilidad al interior de las células de ambos sustratos, mejorando la producción de biogás, y por tanto de metano, en la etapa de digestión anaerobia de los mismos. No obstante este pretratamiento puede ocasionar variaciones en las características de los sustratos.

Con el fin de entender cuál ha sido el efecto de los pretratamientos una vez aplicados, en el presente apartado se procede a analizar la Demanda Química de Oxígeno soluble (DQOs) y total (DQO), los sólidos volátiles (SV), los sólidos totales (ST), la concentración de carbohidratos (CH) y la concentración de nitrógeno (N) presentes tanto en las muestras pretratadas como en una muestra sin pretratar o control.

*Tabla 5.6. Caracterización de las microalgas tras el pretratamiento.*

Muestra	pH, ini	pH, fin	sCOD (g/L)	COD (g/L)	sCOD/ COD	COD losses (%)	TS (g/L)	VS (g/L)	VS/TS	CH (g/L)	N (g/L)
Control	6,82	6,85	0,55	42,70	0,01	-	28,53	21,32	74,72%	0,03	0,047
Térmico	6,82	6,43	4,41	40,57	0,11	-5,00%	29,03	21,70	74,77%	0,98	0,433
4% CaO	11,31	8,31	5,13	36,70	0,14	-14,05%	30,76	21,65	70,38%	0,99	0,551
10% CaO	12,06	10,81	8,34	38,47	0,22	-9,91%	32,76	20,67	63,08%	1,18	0,719
4% NaOH	10,94	8,44	7,33	39,57	0,19	-7,34%	29,61	21,06	71,12%	1,33	0,653
10% NaOH	12,07	9,97	12,04	37,63	0,32	-11,87%	31,48	20,77	65,96%	1,37	0,772

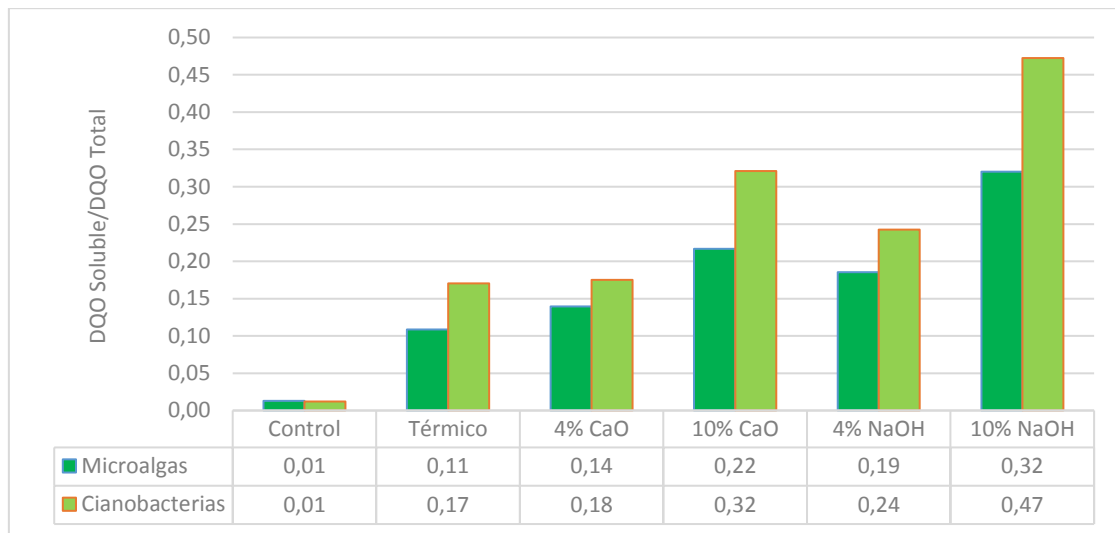
*Tabla 5.7. Caracterización de las cianobacterias tras el pretratamiento.*

Muestra	pH, ini	pH, fin	sCOD (g/L)	COD (g/L)	sCOD/ COD	COD losses (%)	TS (g/L)	VS (g/L)	VS/TS	CH (g/L)	N (g/L)
Control	6,91	6,83	0,55	46,00	0,01	-	35,04	23,13	66,01%	0,04	0,039
Térmico	6,91	6,47	7,65	44,90	0,17	-2,39%	34,55	23,08	66,79%	1,45	0,782
4% CaO	11,88	8,99	7,89	45,00	0,18	-2,17%	36,59	22,89	62,57%	1,15	0,789
10% CaO	12,69	11,99	14,08	43,90	0,32	-4,57%	38,01	21,78	57,46%	1,41	1,176
4% NaOH	11,19	8,96	10,54	43,50	0,24	-5,43%	35,12	22,07	62,84%	1,67	0,961
10% NaOH	12,75	11,08	19,71	41,70	0,47	-9,35%	36,99	21,69	58,65%	2,54	1,440

Tal y como se ha explicado anteriormente, el pH de las muestras aumentará en función del reactivo químico a adicionar y la cantidad vertida del mismo para realizar el pretratamiento. Se observa que, en ambos casos, una vez concluido el ensayo de pretratamiento, el pH ha disminuido ligeramente con respecto al inicio del mismo. Esto es debido a que, transcurridas las 24 horas en las que se aplica el pretratamiento, el pH de la muestra sufre una disminución debido a un efecto de homogeneización en la misma.

De forma gráfica, a continuación, se representan los parámetros analizados tras la aplicación de los pretratamientos sobre las muestras:

■ **Relación DQO soluble y DQO total.**



**Figura 5.2.** Comparación de la relación de DQOs/DQO en los dos sustratos microalgas y cianobacterias.

Una vez aplicados los pretratamientos cabe esperar que la solubilidad en las muestras se vea favorecida por los mismos. En este caso en concreto, es de esperar que la solubilidad para las muestras en las que se han aplicado los reactivos químicos más agresivos (NaOH) y en las cuales se ha adicionado una mayor cantidad de reactivo (10%) sean las que presenten una mayor relación DQOs/DQO.

Tal y como se observa en la figura anterior, en ambos casos la agresividad del pretratamiento aplicado favorece una mayor relación sDQO/DQO. Esto significa que mayor parte de la materia orgánica oxidable pasa a la fase soluble. En principio, esta solubilización de la materia orgánica es una ventaja ya que el proceso de digestión anaerobia se verá favorecido.

En este caso los pretratamientos más agresivos para ambos sustratos son la Sosa al 10%, la cual supone la mayor relación de DQOs/DQO para microalgas y cianobacterias con valores de 0,32 y 0,47 respectivamente. A continuación, se encuentra el pretratamiento de la Cal al 10% cuya relación de DQOs/DQO alcanzan valores de 0,22 para microalgas y 0,32 en las cianobacterias.

Atendiendo a los resultados anteriores podemos concluir que los pretratamientos tendrán un mayor efecto sobre las cianobacterias en cuanto a la solubilidad. Esto supone que una mayor parte de la materia orgánica oxidable pasará a la fase soluble una vez aplicado el pretratamiento en cada caso, favoreciendo el proceso de digestión anaerobia.

■ **Concentración de DQO total.**



**Figura 5.3.** Comparación de la concentración de DQO Total en los dos sustratos: microalgas y cianobacterias.

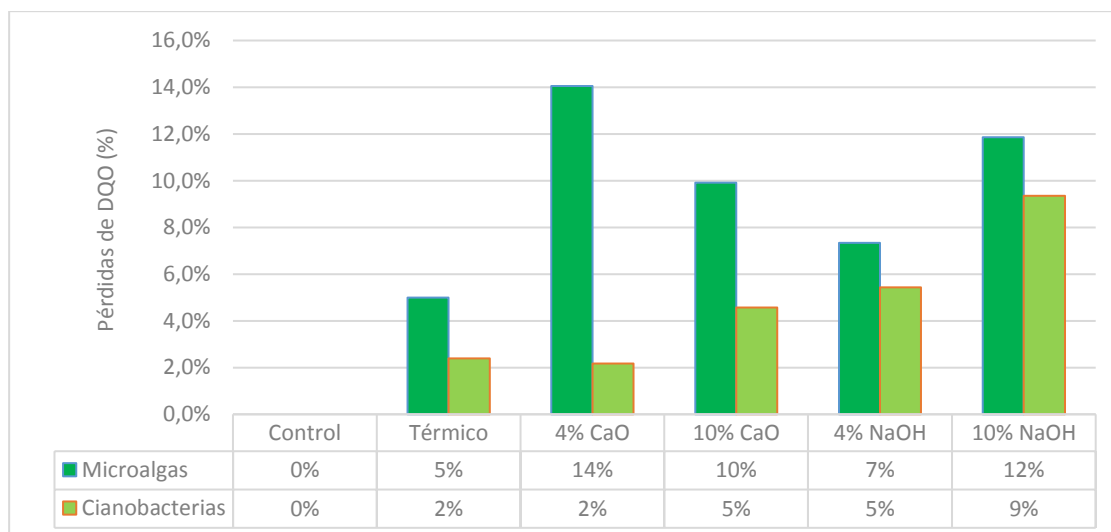
Al contrario que en el caso anterior, en este apartado es de esperar que tras aplicar el pretratamiento la DQO total se vea disminuida a medida que la cantidad de reactivo y su agresividad es mayor. Esto es debido a la aplicación de los pretratamientos pueden dañar las células y por tanto ocasionar una pérdida de materia orgánica oxidable. A su vez se espera que la concentración de DQO en ambos sustratos sea igual o muy similar y no haya diferencias significativas. Tal y como se observa en las figuras anteriores, los controles no presentan los mismos valores siendo mayor en el caso de las cianobacterias (46,00 g/L), por lo que podemos suponer que en este caso que la DQO también será mayor al aplica los pretratamientos.

Centrando nuestro análisis en las cianobacterias, se observa que estas no se ven excesivamente afectadas en cuanto a la concentración de DQO total, siendo su valor mismo de 41,70 g/L y el máximo de 46,00 g/L siendo este valor el correspondiente al control, La variación media de la DQO total para las cianobacterias es de  $\pm 1.50$  g/L.

Tratándose de las microalgas, la variación de la DQO total es más pronunciada en función del pretratamiento y del tipo de reactivo aplicado, siendo su valor máximo el del control con 42,70 g/L y el mínimo el del pretratamiento con Sosa al 10% con un valor de 37,63 g/L de DQO. La variación media de la DQO total para las microalgas es de  $\pm 2,17$  g/L.

Atendiendo a estos resultados en cuanto a la variación de la DQO, podemos concluir que las cianobacterias contienen una mayor cantidad de materia orgánica oxidable, favoreciéndose que una gran parte de la DQO total pasa a la fase soluble (DQOs), tal como muestra el apartado anterior.

▪ **Pérdida de la DQO.**



**Figura 5.4.** Comparación de la pérdida de la DQO en los sustratos microalgas y cianobacterias.

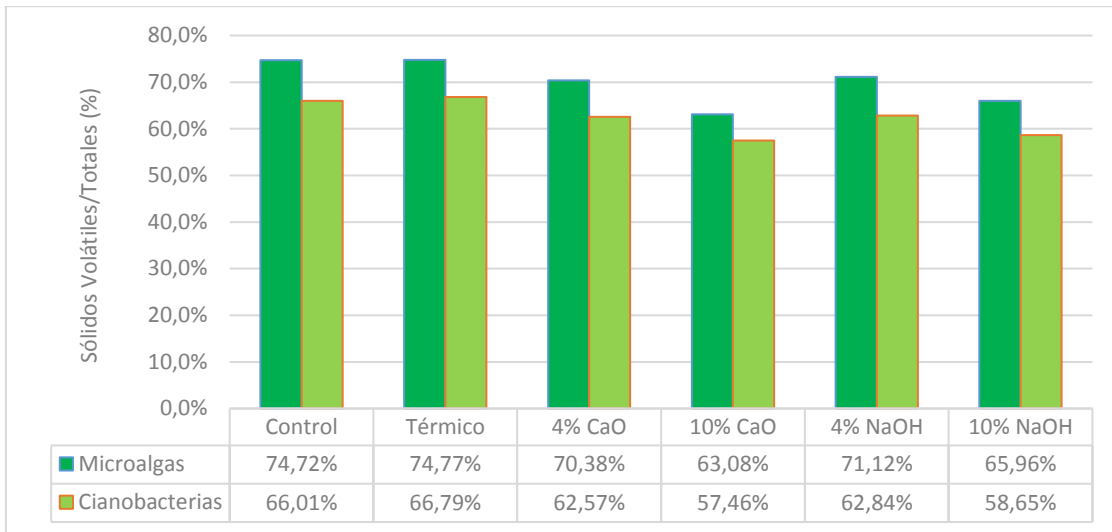
En este apartado se estudia la pérdida de la DQO total de ambos sustratos. Debido a los pretratamientos aplicados, existe una pérdida de la materia orgánica oxidable tanto en microalgas como en cianobacterias. Esto es debido a que la aplicación de estos pretratamientos puede dañar ciertas células de ambos sustratos, ocasionando la muerte de las mismas y por tanto esa pérdida de materia orgánica oxidable. Es importante mencionar que en el control no habrá pérdida de materia orgánica y que los resultados obtenidos son expresados con respecto a esta muestra sin pretratar. En este caso y, habiendo analizado los dos apartados anteriores, es de esperar que se produzca la mayor pérdida de la DQO en el caso de las microalgas. Esto es debido a que tal y como se ha observado, la relación DQOs/DQO es menor en el caso de las microalgas lo cual quiere decir que una menor parte de la DQO total pasa a la fase soluble. Además, en el apartado anterior se observa la concentración de DQO total en este sustrato es menor y la variación de la misma al aplica el pretratamiento mayor.

A la vista de los resultados obtenidos, la pérdida de la DQO en las cianobacterias va en aumento siendo su valor mínimo de 2,17% el obtenido para la Cal al 4% y el máximo para el caso de la Sosa al 10% cuyo valor es de 9,35% siguiendo una tendencia casi proporcional a la agresividad del pretratamiento.

En las microalgas, la pérdida de la DQO no sigue la misma tendencia que en las cianobacterias. La mínima pérdida se observa en el caso del pretratamiento térmico (5,00%) siendo el máximo para el caso de la Cal al 4% (14,05%).

Por tanto, se concluye que la agresividad del tratamiento y la cantidad de reactivo influyen casi linealmente en el caso de las cianobacterias, no siendo así para el caso de las microalgas, cuyo comportamiento debería ser similar. Se deberán realizar ensayos adicionales para corroborar esta tendencia.

■ **Relación de Sólidos Volátiles (SV) frente a Sólidos Totales (ST)**



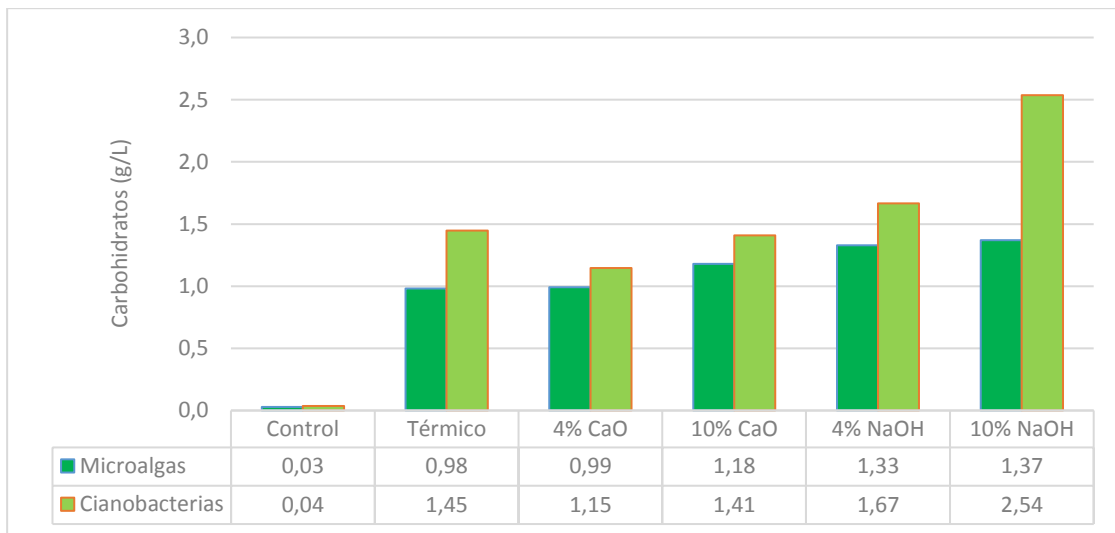
**Figura 5.5.** Comparación de la relación de SV/ST en los dos sustratos microalgas y cianobacterias.

El análisis de los SV sirve para determinar la materia orgánica que hay en una muestra mientras que los ST representan la materia tanto orgánica como inorgánica. Por tanto, en este apartado se analiza la cantidad de materia orgánica con respecto a la materia seca total. Es de esperar que en ambos casos estos valores sean similares. No obstante, el uso de los pretratamientos debería reducir la cantidad de materia orgánica ya que las células pueden verse dañadas por la aplicación de los mismos.

Analizando las figuras anteriores, se observa que para ambos sustratos la mayor cantidad de SV con respecto a los ST se obtiene para el pretratamiento térmico con un 74,77% para los microalgas y un 66,79% para las cianobacterias aproximadamente. Los controles de ambos sustratos también presentan unos valores muy similares a los del pretratamiento térmico, pero ligeramente inferiores (74,22% y 66,01% respectivamente). Esto significa que el pretratamiento térmico favorece la ruptura de la pared celular, pero sin provocar la muerte de las células y por tanto la pérdida de materia orgánica.

A medida que la agresividad del pretratamiento aumenta, la relación SV/ST disminuye. Esto es debido a lo anteriormente explicado: una pérdida de materia orgánica ocasionada por la muerte de algunas células microbianas de tal forma que los valores mínimos de SV/ST se obtienen para los tratamientos más agresivos: Cal al 10% y Sosa al 10% cuyos valores son 63,08% y 66,96% para las microalgas y 57,46% y 58,66% para las cianobacterias, respectivamente. Se observa que la relación SV/ST es mayor en todos los pretratamientos de las microalgas. Este hecho puede ser un indicador de que la producción de biogás se verá favorecida en el caso de las mismas. No obstante, la producción de biogás depende de muchos otros factores que habrá que analizar para sacar una conclusión en claro.

### ■ Concentración de Carbohidratos



**Figura 5.6.** Comparación de la concentración de CH en los dos sustratos: microalgas y cianobacterias.

Los carbohidratos son compuestos oxigenados que pueden ser usados como aceptores de electrones. Estos compuestos entre otros, son primero hidrolizados en unidades moleculares más pequeñas y son convertidos en ácidos orgánicos de cadena corta, principalmente ácido acético, propiónico y butírico. En este apartado se estudia la concentración de carbohidratos (CH) en las muestras de los dos sustratos empleados. Es de esperar que, tras la aplicación de los pretratamientos que provocan la ruptura de la pared celular, el acceso a estos compuestos se vea favorecido y su concentración sea mayor a medida que la agresividad del tratamiento también lo es.

Observando la figura anterior, se observa que en ambos casos la tendencia es progresiva a medida que la cantidad de reactivo aumenta. De esta forma, en ambos sustratos la mayor concentración de CH se encuentra en la Sosa al 10% con unos valores de 1,37 g/L y 2,54 g/L para microalgas y cianobacterias, respectivamente. El valor mínimo, sin tener en cuenta el control (0,03 g/L y 0,04 g/L respectivamente), le corresponde al pretratamiento realizado con Cal al 4% cuyos valores son de 0,99 g/L en el caso de las microalgas al 1,15 g/L para las cianobacterias.

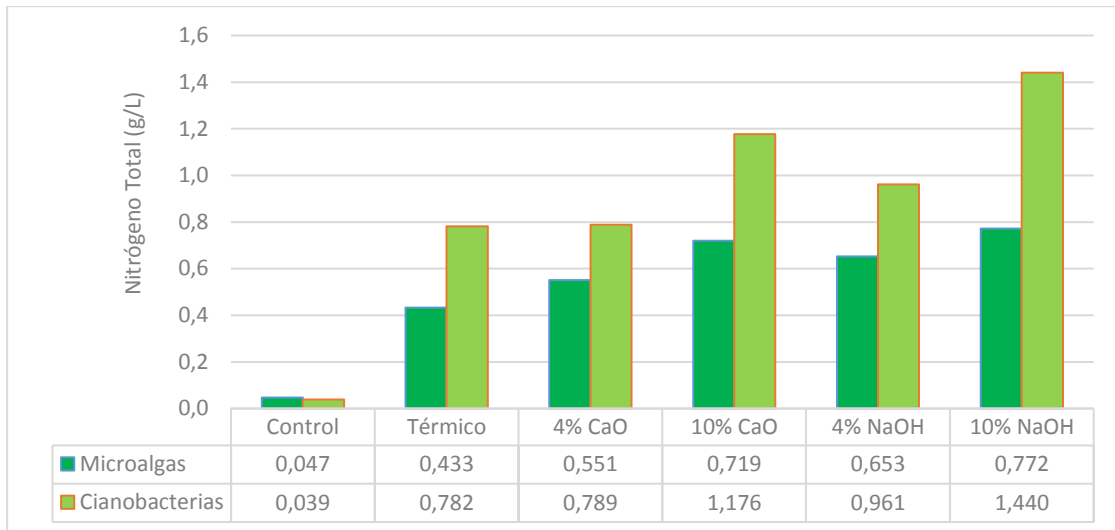
Se debe destacar que, en el caso de las cianobacterias, la aplicación del pretratamiento térmico presenta un valor de 1,45 g/L de CH siendo mayor que en caso del pretratamiento con Cal al 4% (1,15 g/L) y Cal al 10% (1,41 g/L).

Al contrario que las cianobacterias, la concentración de CH en las microalgas tiene una tendencia progresiva a medida que la agresividad del pretratamiento es mayor, tal y como se ha explicado anteriormente.

A raíz de los resultados obtenidos, se concluye que la concentración de CH favorece el proceso de digestión anaerobia. No obstante, una elevada concentración de estos compuestos como en el caso de las cianobacterias, puede producir una alta cantidad de ácidos y por tanto la inhibición del proceso en las etapas iniciales de la digestión.



■ **Concentración de Nitrógeno total.**



**Figura 5.7.** Comparación de la concentración de nitrógeno en los dos sustratos; microalgas y cianobacterias.

El nitrógeno total presente en las muestras se ha calculado a partir de analíticas de laboratorio. La cantidad de nitrógeno presente en la muestra analizada será representada como nitrógeno *Kjeldahl*. A esta concentración de nitrógeno habrá que restarle los nitritos y nitratos presentes, ya que se considera que estos no intervienen en el proceso de digestión anaerobia, obteniendo así el nitrógeno total involucrado en el proceso de digestión. En este apartado, es de esperar que la aplicación de los pretratamientos, al favorecer la ruptura de la pared celular, también favorezca el acceso y la liberación a este compuesto químico y, por tanto, cuanto más agresivo sea el pretratamiento mayor concentración de N habrá en la muestra.

Analizando los valores obtenidos, se observa que la concentración de nitrógeno es superior en el caso de las cianobacterias, obtenido sus valores más altos en el caso de la Cal al 10% y de la Sosa al 10% siendo estos de 1,176 g/L y 1,440 g/L, respectivamente.

Tratándose de las microalgas, la concentración de nitrógeno en todos los casos es inferior excepto en el control (0,047 g/L frente a 0,039 g/L en las cianobacterias). No obstante, al igual que en las cianobacterias los valores más elevados de nitrógeno se encuentran en los pretratamientos de Cal al 10% y de Sosa al 10% siendo estos de 0,719 g/L y 0,772 g/L respectivamente.

La elevada concentración de nitrógeno en las muestras de cianobacterias puede suponer un problema a la hora de realizar el proceso de digestión anaerobia. Esto es debido a que el nitrógeno puede actuar como inhibidor en las primeras etapas de este proceso, sobre todo en las bacterias encargadas de realizar la hidrólisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que las cianobacterias deberían ser un sustrato más adecuado para realizar la digestión anaerobia ya que presentan una mayor cantidad de materia orgánica oxidable (DQO) y una menor pérdida de la misma al aplicar los pretratamientos. Por otro lado, las microalgas presentan una mayor relación de materia orgánica con respecto a la materia orgánica total (SV/ST). A su vez la cantidad de nitrógeno total y de carbohidratos también es mayor en el caso de las cianobacterias en comparación con las microalgas. No obstante tal y como se ha descrito anteriormente esta mayor concentración de nitrógeno en la muestra puede provocar problemas de inhibición, sobre todo en las primeras fases de la digestión anaerobia como es la hidrólisis.

Una vez aplicados los pretratamientos a los sustratos que intervienen en el ensayo y analizado su efecto sobre los mismos, se puede proceder a realizar el proceso de la digestión anaerobia en las botellas Batch.

### **5.3. Determinación del potencial de biogás a partir de la digestión de los sustratos fangos digeridos.**

Seguidamente se exponen los resultados obtenidos en el ensayo en discontinuo de digestión anaerobia sobre el estudio de la producción de biogás. Una vez seleccionado el pretratamiento a aplicar se puede proceder a realizar este ensayo batch.

El estudio sobre la producción de biogás sirve para analizar las diferencias entre las digestiones y su evolución a lo largo del tiempo. Al mismo tiempo se espera analizar los diferentes factores que mejoran las producciones de biogás, como la aplicación del pretratamiento o las posibles sinergias entre sustratos e inóculo. Así pues, el ensayo batch presenta una primera aproximación sobre la producción de metano de los sustratos estudiados y también permite hacer una valoración sobre viabilidad económica de todo el proceso.

En este caso, se han analizado digestiones entre microalgas y cianobacterias con fangos digeridos pensando en el posible beneficio que pueden aportar los lodos sobre los dos sustratos. El ensayo se ha diseñado con digestiones diferenciadas por los sustratos y por la aplicación o no de un pretratamiento, para observar cómo afectan estos factores en la producción de biogás.

#### **5.3.1. Efecto del pH en el ensayo discontinuo de digestión anaerobia**

Antes de comenzar el ensayo se debe destacar que, tras aplicar el pretratamiento, se introducen las muestras en las botellas para el ensayo Batch y se añade, si es necesario y en su cantidad correspondiente: agua destilada y/o la disolución tampón, la cual regulará el pH de la muestra y evitará que se formen compuestos no deseados, favoreciendo el proceso de digestión anaerobia.

Tras añadir la disolución tampón, el pH queda de la siguiente manera:

*Tabla 5.8. Valores de pH en las botellas Batch: efecto de la disolución tampón.*

MUESTRA	pH	MUESTRA	pH
Blanco (Inóculo)	7,66	Blanco (Inóculo)	8,20
Control Algas	7,52	Control Cianos	8,18
Algas Pret. Térmico	7,55	Cianos Pret. Térmico	8,49
Algas Pret. Cal-4%	7,55	Cianos Pret. Cal-4%	8,56
Algas Pret. Cal-10%	7,88	Cianos Pret. Cal-10%	8,85
Algas Pret. Sosa-4%	7,72	Cianos Pret. Sosa-4%	8,42
Algas Pret. Sosa-10%	8,11	Cianos Pret. Sosa-10%	8,92

Tal y como se observa en las tablas anteriores, los valores del pH al comenzar el ensayo de la digestión anaerobia son muy diferentes entre los dos sustratos. Esto puede deberse a que las cianobacterias sean más sensibles a los pretratamientos o que, por su composición, el pH del medio sea más alcalino. Tendremos que tener especial atención con este caso (cianobacterias) ya que el pH de las muestras en las botellas Batch se alejan del pH neutro y por tanto pueden provocar problemas de inhibición en las etapas y/o bacterias que intervienen en el proceso de la digestión anaerobia.

### 5.3.2. Estudio de la producción de metano

A partir del muestreo efectuado durante el ensayo batch se han dibujado las curvas de producción de biogás para cada situación de este estudio. Las curvas que se presentan son la producción de biogás acumulada a lo largo del tiempo. El ensayo duró unos 50 días, momento en el que se ha considerado que el aumento de producción era insignificante y por lo tanto las curvas ya tendían a una asíntota.

Para la determinación de las curvas se ha calculado el biogás acumulado en cada punto del muestreo, tal como se ha expuesto en el apartado Métodos Analíticos. Las curvas representan el biogás producido por el sustrato bajo estudio. Es decir, en el biogás total producido en cada tipo de digestión se le ha restado el generado por el inóculo para obtener la producción real únicamente del sustrato en cuestión. Los valores obtenidos que se utilizan para elaborar las curvas han sido los valores medios de cada conjunto de los mismos (tríos o pares), habiendo comprobado previamente la coherencia de cada conjunto.

Los resultados obtenidos muestran la importancia de realizar un pretratamiento ya sea térmico o termo-químico aunque la producción mediante el empleo de estos últimos es notablemente mayor. Tanto las cianobacterias como las microalgas pretratadas aumentan su producción de metano respecto a sus homólogos no pretratados. Especialmente, la producción total de metano en valor absoluto es más elevada en las microalgas que en las cianobacterias, debido a las características inherentes de los sustratos, así como a problemas de inhibición en las primeras etapas de digestión en el caso de las cianobacterias.

La producción de metano para cada sustrato empleado en el presente estudio se representa en las gráficas a continuación:

## Microalgas

Para poder contrastar los valores obtenidos con otros experimentos, se han elaborado las curvas de la tasa de producción acumulada de metano, donde los valores de producción se expresan según la cantidad de sustrato que se ha digerido y que se ha pretratado (gramos de SV). De esta manera, se han obtenido unos valores de referencia comparables con otros, dando una idea del potencial de producción de metano en función del pretratamiento aplicado sobre el sustrato a digerir.

Los valores máximos de producción obtenidos corresponden a los pretratamientos más agresivos (Cal y Sosa al 10%) mientras que los valores mínimos de producción se obtienen en el caso del control. De esta forma el rango de valores para la producción de metano va desde 258 mL CH<sub>4</sub> / g SV correspondiente al pretratamiento con Sosa al 10% hasta 148 mL CH<sub>4</sub> / g SV correspondientes al control de microalgas.

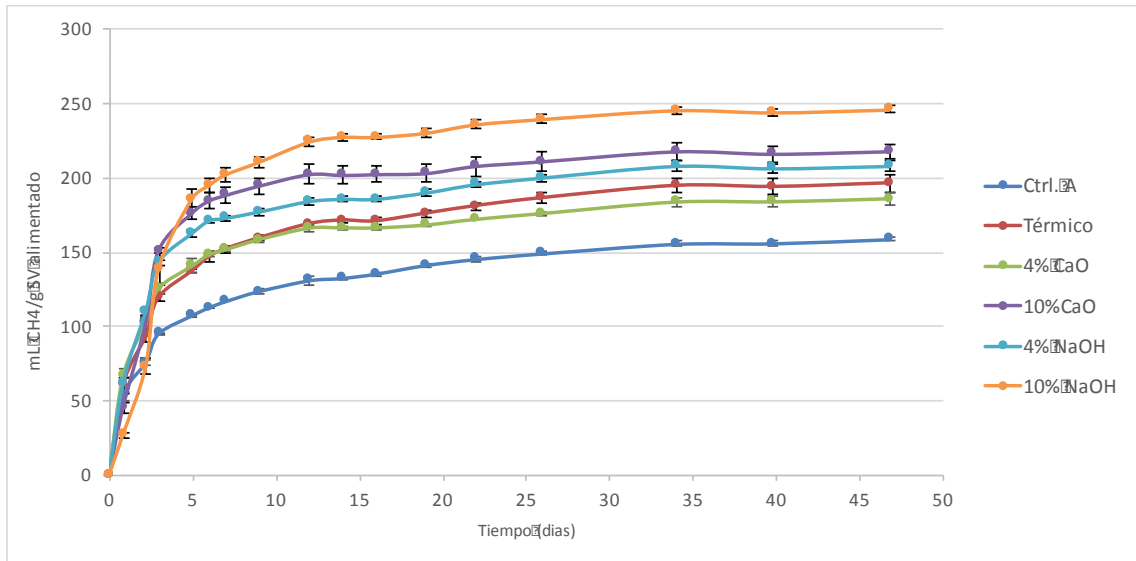
*Tabla 5.9. Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato.*

	SUSTRATO ALIMENTADO		SUSTRATO PRETRATADO	
	Producción específica de Metano (mL CH <sub>4</sub> /g SV) Sustrato alimentado	Incremento total de producción de Metano (%)	Producción específica de Metano (mL CH <sub>4</sub> /g SV) Sustrato pretratado	Incremento total de producción de Metano (%)
Control Microalgas	159±1	-	148±16	-
Pret. Térmico	197±6	23,66%	197±6	24,01%
Pret. 2% CaO	186±4	17,05%	187±4	17,69%
Pret. 10% CaO	218±5	37,14%	230±5	44,45%
Pret. 2% NaOH	208±3	31,02%	215±4	35,40%
Pret. 10% NaOH	246±2	54,86%	258±3	62,32%

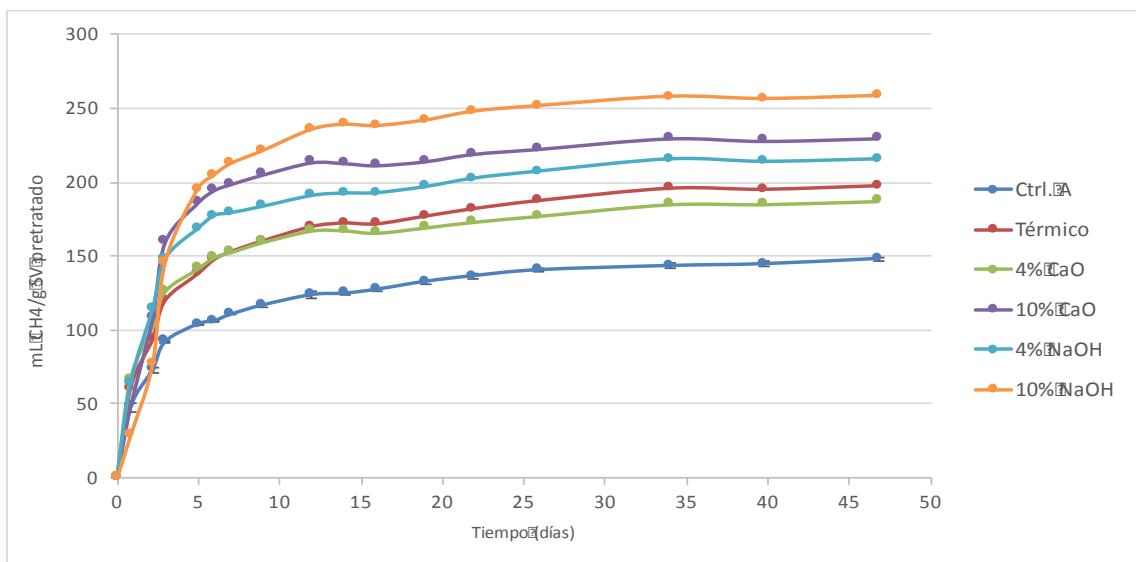
En la tabla 5.9 además de representar la tasa de producción acumulada en función de la cantidad de sustrato digerido, se muestra el incremento total de la producción de metano con respecto al control. El incremento en la producción de metano demuestra que a medida que el pretratamiento es más agresivo, favoreciendo la ruptura de la pared celular, y por tanto el incremento de la producción de metano es mayor.

De este modo se observa que los mayores incrementos de producción se dan para los pretratamientos de Sosa al 10% siendo de 54,86% en función de los SV de sustrato alimentado y 62,32% en función de los SV de sustrato pretratado. A continuación, se encuentra el tratamiento con Cal al 10% del cual se obtienen unos valores de 37,14% y 44,45% para los SV de sustrato alimentado y los SV de sustrato pretratado, respectivamente.

A continuación, se representa de forma gráfica lo explicado anteriormente, mostrando la producción acumulada de biogás en función de los SV de sustrato alimentado (Figura 5.8) y pretratado (Figura 5.9).



**Figura 5.8.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato alimentado de microalgas.



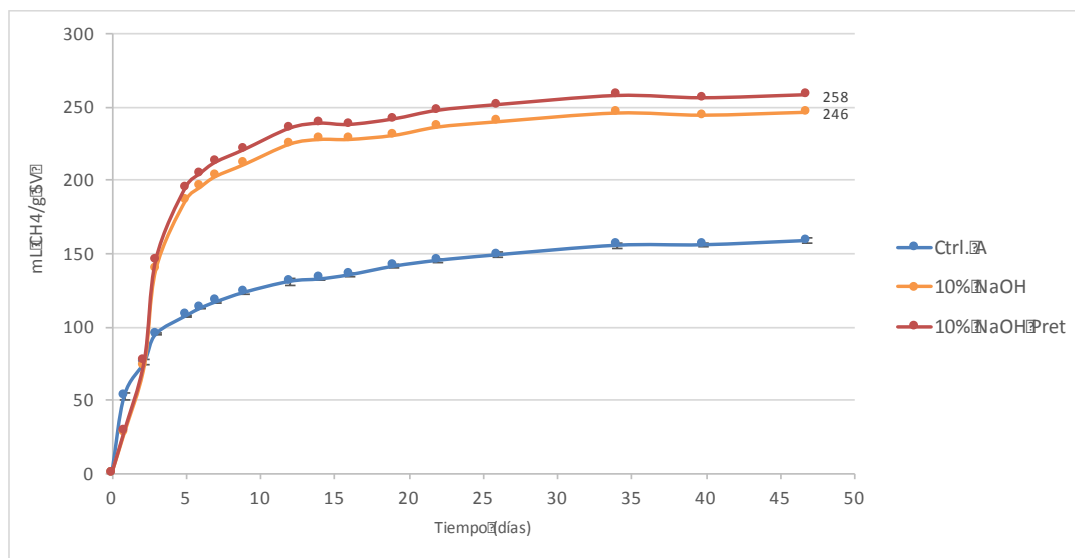
**Figura 5.9.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato pretratado de microalgas.

Tal y como se observa en las figuras anteriores, la representación gráfica de la producción de metano describe una curva en la que los primeros días del ensayo de digestión anaerobia la pendiente es notablemente pronunciada. Esto es debido a que los primeros días la producción de metano se realiza de forma muy rápida. Según transcurren los días se observa que la producción de metano se estabiliza debido a la mayor descomposición del sustrato por los procesos que tienen lugar en la digestión anaerobia para, finalmente, tender a una asíntota, momento en el que el experimento se da por finalizado. En este caso concreto, el ensayo dura unos 47 días.

Haciendo un análisis de las curvas, se observa que, en el caso de la muestra de control, se ha experimentado la producción más baja. Es decir, todas las botellas donde se ha aplicado los pretratamientos han experimentado un incremento de producción de biogás respecto al control. Por otra parte, también se observa que los valores más bajos de producción corresponden a botellas con pretratamientos térmicos seguidos del pretratamiento con Cal y Sosa al 4%, y van aumentando progresivamente hasta las curvas de mayor producción que corresponden a los pretratamientos con Cal y Sosa al 10% sobre todo en esta última.

En ambos casos se observa que la mayor producción de metano se produce al aplicar un pretratamiento de Sosa (NaOH) al 10%, seguido del pretratamiento con Cal (CaO) al 10%. Ambos se consideran en este estudio como los pretratamientos más agresivos para las células de la materia microbiana. Estos pretratamientos se considerarán los más adecuados para realizar el proceso de digestión anaerobia debido a su elevado rendimiento en el proceso, siendo el de Sosa al 10% el que una mejor producción de metano presenta, en torno al 248 mL CH<sub>4</sub> / g SVa los 47 días del experimento.

Por tanto, a raíz de los resultados obtenidos, siendo el sustrato las microalgas y observando que el pretratamiento más efectivo es aquel que emplea Sosa (NaOH) al 10% se representan las curvas correspondientes a continuación:



**Figura 5.10.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato de microalgas para el pretratamiento aplicado con Sosa al 10% y control.

Tal y como se observa en la figura anterior, la producción de metano en función de los SV de sustrato pretratado es ligeramente superior. Esto indica que el empleo de un pretratamiento mejora la producción de metano de forma óptima y que, en ambos casos, el uso del pretratamiento favorece una producción de metano notablemente superior al control de las microalgas, al cual no se le aplica pretratamiento.

## Cianobacterias

Al igual que en el caso de las microalgas, para poder contrastar los valores obtenidos con otros experimentos, se han elaborado las curvas de la tasa de producción acumulada de metano por gramo de SV de sustrato.

Los valores máximos de producción obtenidos corresponden al pretratamiento en el cual se ha empleado Sosa al 10% siendo de 161 mL CH<sub>4</sub>/g SV, mientras que los valores mínimos de producción se obtienen en el caso del control: 140 mL CH<sub>4</sub>/g SV. En este caso se observan grandes variaciones con respecto a las microalgas y se observa a su vez que la producción de metano por SV de sustrato es notablemente inferior ya que el valor de producción máxima de las microalgas estaba en torno a 250 mL CH<sub>4</sub>/g SV aplicando Sosa al 10% y en este caso se obtienen valores máximos de producción de 161 mL CH<sub>4</sub>/g SV para el mismo reactivo químico.

Se deben destacar las anomalías en los resultados obtenidos, mostrando valores negativos en los incrementos de producción total de metano en mL CH<sub>4</sub>/g SV. Estos valores negativos representan que la producción de metano del proceso de digestión anaerobia tras aplicar los distintos pretratamientos (exceptuando la Sosa al 10% y el pretratamiento térmico en el caso de SV de sustrato alimentado) es inferior a la producción total de metano del control.

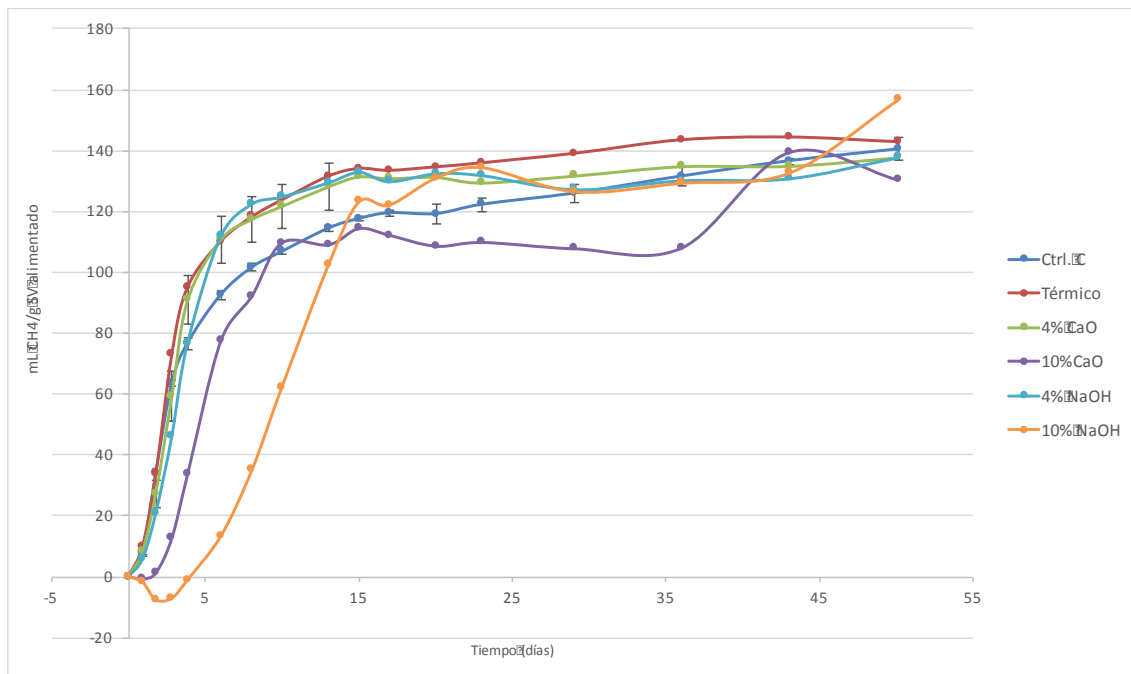
Este comportamiento puede ser debido a las propiedades inherentes de las cianobacterias y que se ven potenciadas mediante el uso de pretratamientos como por ejemplo la elevada concentración de carbohidratos y nitrógeno, los cuales pueden ocasionar problemas de inhibición en las distintas etapas de la digestión anaerobia.

**Tabla 5.10.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub> / g SV de sustrato.

	SUSTRATO ALIMENTADO		SUSTRATO PRETRATADO	
	Producción específica de Metano (mL CH <sub>4</sub> /g SV) Sustrato alimentado	Incremento total de producción de Metano (%)	Producción específica de Metano (mL CH <sub>4</sub> /g SV) Sustrato pretratado	Incremento total de producción de Metano (%)
Control Cianobacterias	140±4	-	140±4	-
Pret. Térmico	143±8	1,74%	138±8	-1,78%
Pret. 2% CaO	138±13	-1,86%	134±13	-4,490%
Pret. 10% CaO	130±63	-7,15%	133±64	-5,03%
Pret. 2% NaOH	138±65	-1,93%	139±65	-1,00%
Pret. 10% NaOH	157±78	11,62%	161±80	14,64%

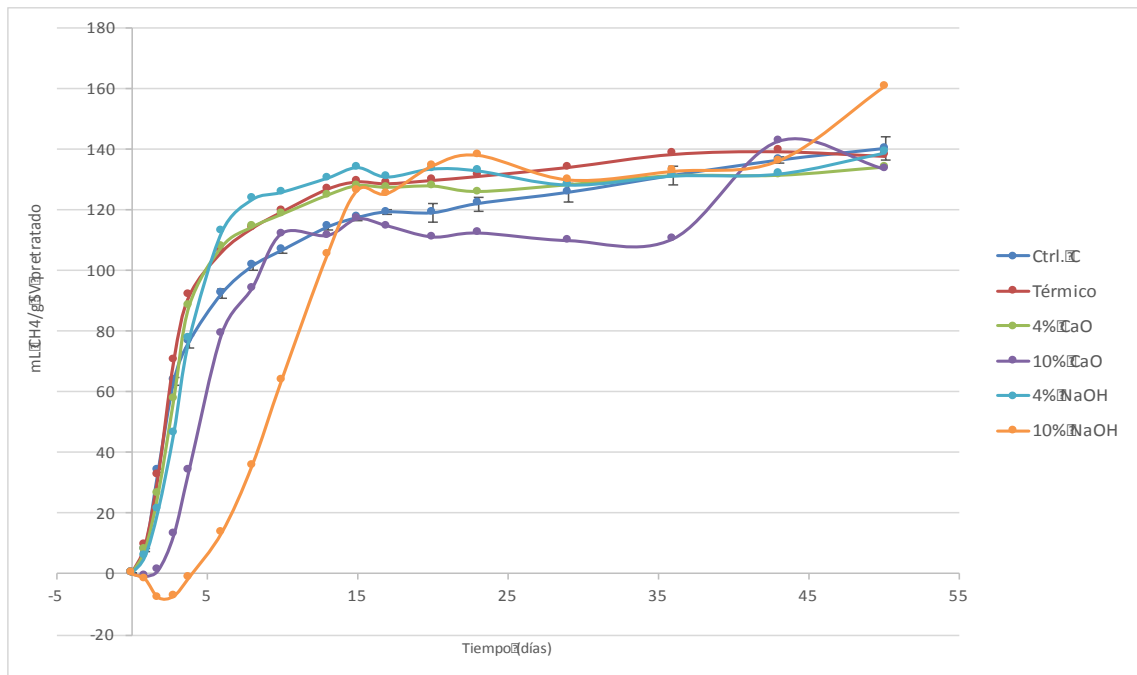
Observando los incrementos de producción de metano, se observa que los mayores incrementos de producción se dan para los pretratamientos de Sosa al 10% siendo de 11,62% en función de los SV de sustrato alimentado y 14,64% en función de los SV de sustrato pretratado. A continuación, se encuentra el pretratamiento térmico del cual se obtienen unos valores de 1,74% para los SV de sustrato alimentado.

A continuación, se representa de forma gráfica lo explicado anteriormente, mostrando la producción acumulada de biogás en función de los SV de sustrato alimentado (Figura 5.11) y pretratado (Figura 5.12).



**Figura 5.11.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato alimentado de cianobacterias.





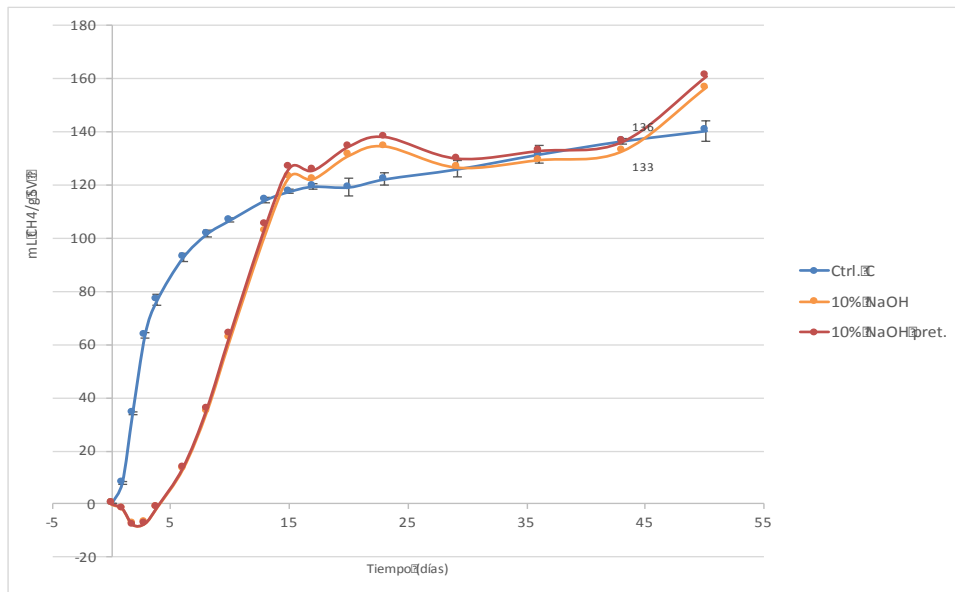
**Figura 5.12.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato pretratado de cianobacterias.

Haciendo un análisis de las curvas, se observa que la producción de metano es bastante irregular al inicio del ensayo y durante el mismo. Esto es debido a que se produce una etapa de inhibición en la mayor parte de las muestras, claramente visible en el caso de la Sosa (NaOH) al 10%. Esta inhibición también se produce en otros pretratamientos, pero en menor medida. Según avanzan los días de ensayo, la producción va en aumento. No obstante, la producción de metano es demasiado irregular obteniendo datos incoherentes como el decremento en la producción en algunas etapas del ensayo. Tal y como se ha explicado en apartados anteriores, esto es debido a las características inherentes de las cianobacterias como la elevada concentración en su composición de carbohidratos, compuestos de nitrógeno o elevado pH.

Analizando los resultados obtenidos se observa que en este caso, la muestra de control no es la que ha experimentado la producción más baja. Algunas botellas donde se ha aplicado los pretratamientos han experimentado un incremento de producción de biogás respecto al control, pero otras han sufrido un notable decremento con respecto a este. Los valores más bajos de producción corresponden a botellas con el pretratamiento con Cal al 4% y al 10%, seguido del control, el pretratamiento térmico y el pretratamiento con Sosa al 4% los cuales presentan valores muy similares. Por último, es el pretratamiento con Sosa al 10% el que presenta la mayor producción de metano en este caso de estudio.

En este caso, el pretratamiento de la Sosa al 10% es el que presenta una mayor producción y por tanto es el más adecuado para realizar el proceso de digestión anaerobia tratándose de este sustrato, las cianobacterias. Su valor de producción correspondiente es de 157 y 161 mL CH<sub>4</sub>/g SV obtenidos a los 50 días del experimento. Por tanto, a raíz de los resultados obtenidos, siendo el sustrato las cianobacterias y

observando que el pretratamiento más efectivo es aquel que emplea Sosa (NaOH) al 10%, se representan las curvas correspondientes a continuación:



**Figura 5.13.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato de cianobacterias para el pretratamiento aplicado con Sosa al 10% y control.

A partir de las irregularidades observadas en los resultados obtenidos y explicadas anteriormente, se puede concluir que este sustrato no presenta las características óptimas para realizar el proceso de digestión anaerobia incluso aplicando pretratamientos y que, por tanto en un caso real, se optaría por el empleo de las microalgas como sustrato aplicando un pretratamiento de Sosa al 10%.

Además, los resultados obtenidos demuestran la importancia de realizar un pretratamiento. Tanto las cianobacterias como las microalgas pretratadas aumentan su producción de biogás respecto a sus homólogos no pretratados. A su vez se observa que las microalgas constituyen un sustrato más adecuado para la realización de la digestión anaerobia y para la aplicación de pretratamientos previos a la misma debido a que se obtienen unos resultados más estables y coherentes y los valores de producción de metano obtenidos son notablemente superiores en todos los casos estudiados.

Comparando los valores obtenidos con los resultados obtenidos en el ensayo de digestión anaerobia de microalgas por *González-Fernández (2010)*, con una producción de 100 a 500 mL / g SV, se observa que los valores del presente ensayo se encuentran en este rango de valores (entre 150 1 250 mL / g SV aproximadamente), pero que aún se podría incrementar si se optimizan las condiciones de ensayo.

Por otra parte la degradabilidad anaerobia de la biomasa microalgal sin tratamiento (control) ha sido relativamente baja (140-160 mL CH<sub>4</sub>/g SV), comparando, por ejemplo con los valores de producción en el caso de la biomasa algal de *S. Obliquus* (210 mL CH<sub>4</sub> / g SV) y de *Phaeodactylum tricorutum* (350 mL CH<sub>4</sub> / g SV) que se cultivan como cultivos puros con suministro de nutrientes (*Zamalloa, 2012*).

Otro factor que puede influir directamente en el rendimiento del proceso y que no corresponde al sustrato o al pretratamiento, es el inóculo utilizado. Hay que tener en cuenta que el inóculo utilizado en este ensayo ha sido proveniente de lodos de EDAR y que no se ha aclimatado. Por tanto, el uso de un inóculo aclimatado podría aumentar por tanto la producción de metano.

### 5.3.3. Estudio de la relación entre la solubilización de la materia orgánica de las microalgas frente a la producción de metano.

Conociendo los problemas de inhibición debido a las propiedades inherentes de las cianobacterias, se concluye que el sustrato más adecuado para la realización del proceso de digestión anaerobia son las microalgas.

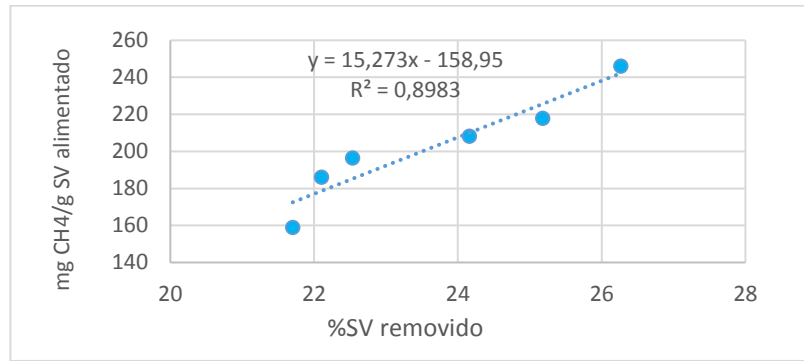
Los resultados obtenidos en el presente ensayo con microalgas y la aplicación de los pretratamientos sugieren que cuanto más alta es la agresividad del pretratamiento aplicado, mayor es la degradabilidad de la materia orgánica, la tasa de producción de metano y el metano. Teniendo en cuenta el bajo contenido orgánico soluble de la biomasa microalgal (<10%), el incremento de la biodegradabilidad anaerobia puede ser explicado por la disrupción de la estructura de la pared celular de las microalgas, que conducen a la degradación de la materia orgánica ocasionada por el proceso del pretratamiento.

Para estudiar la relación entre el grado de solubilización del sustrato a digerir y su potencial de producción de metano, se han recogido los datos de incremento de solubilización de cada muestra (Tabla 5.11) y las tasas de producción de metano de cada pretratamiento más el control y se ha elaborado el gráfico correspondiente.

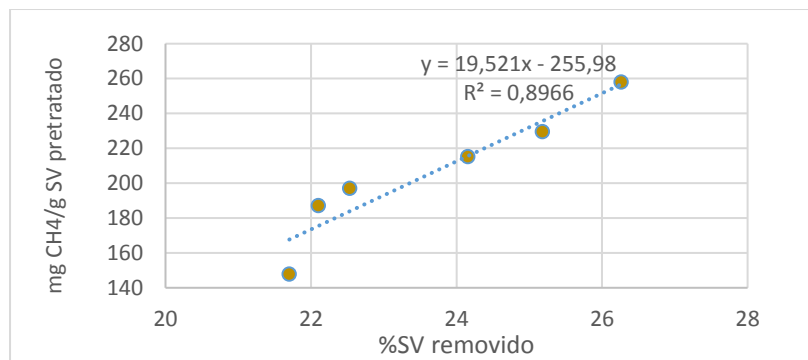
**Tabla 5.11.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato en función de la materia orgánica degradada (%SV).

	%SVremov	mLCH <sub>4</sub> /gSValimentado	mLCH <sub>4</sub> /gSVpretratado
ControlMicroalgas	21,70	159	148
Pret. Térmico	22,53	197	197
Pret. 2%CaO	22,10	186	187
Pret. 10%CaO	25,18	218	230
Pret. 2%NaOH	24,16	208	215
Pret. 10%NaOH	26,26	246	258

Siendo su representación gráfica la siguiente:



**Figura 5.14.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato alimentado en función de la materia orgánica degradada (% SV removido).



**Figura 5.15.** Resultados de la producción de metano en mg CH<sub>4</sub>/g SV de sustrato pretratado en función de la materia orgánica degradada (% SV removido).

Como se puede observar en las figuras anteriores, la producción de metano mostró una correlación lineal con el grado de pérdida de la materia orgánica: cuanto mayor es la degradabilidad de la biomasa, mayor será la producción de metano, cuyos valores aparecen en la Tabla 5.11.

Esto significa, tal y como se explicó anteriormente, que la agresividad del pretratamiento influye notablemente en la solubilización de la materia orgánica y en la producción de metano (mL CH<sub>4</sub> / g SV). Por tanto, los valores más elevados corresponden con los pretratamientos de Sosa y Cal al 10% seguidos de Sosa y Cal al 4% para finalizar con el pretratamiento térmico y, por último, el control.

Otros autores ya han descrito anteriormente la correlación lineal entre la producción de biogás y la solubilización después del pretratamiento térmico. En el caso de la tota de aceite de girasol, el potencial de producción de metano y la solubilización del contenido orgánico tras el pretratamiento mostraron una correlación lineal ( $R^2 = 0,87$ ) para temperaturas de entre 130 y 170°C y de adición de ácido entre 0,74% y 5% (Monlau *et al.* 2013). No obstante, en este caso de estudio en el que se aplican pretratamientos térmico y termo-químicos sobre las microalgas, la correlación se sitúa por encima de estos valores siendo la  $R^2 = 0,89$  tanto para Sv de sustrato alimentado como SV de sustrato pretratado.

## **6. Conclusiones y Líneas de futuro.**

### **6.1. Conclusiones**

Los resultados obtenidos demuestran la importancia de realizar un pretratamiento. Tanto en algunos casos de las cianobacterias como las microalgas pretratadas aumentan su producción de biogás respecto a sus homólogos no pretatados.

El tratamiento térmico aplicado no ha producido una buena solubilización de las microalgas. Ante su efecto insignificante sobre la mejora de la solubilización o la producción de metano de las microalgas y cianobacterias no existe una justificación para aplicar este pretratamiento.

Se ha observado que el pretratamiento con el que mejores resultados se han obtenido en cuanto a la producción de biogás es el de Sosa 10% aplicado sobre microalgas como sustrato.

Cabe destacar que debido a las características propias de los sustratos, el ensayo en discontinuo de la digestión anaerobia para producir biogás es más efectivo y productivo en el caso de las microalgas que en el caso de las cianobacterias. Esto puede ser debido al elevado pH en el caso de las segundas antes de comenzar el ensayo o a la elevada concentración de carbohidratos y nitrógeno, lo cual produjo un importante grado de inhibición sobre todo en las etapas iniciales de la digestión.

### **6.2. Líneas de futuro**

Ante los resultados y conclusiones extraídas sobre el estudio, hay una serie de indicaciones y recomendaciones a tener en cuenta en estudios posteriores. En primer lugar, tanto los pretratamientos como las digestiones de los sustratos con fangos digeridos no presentan desventajas a la hora de combinarlos. Este hecho puede traducirse en la reducción de los costes en las plantas de tratamiento de gran escala ya que no se requeriría tener infraestructura por duplicado o tener que esperar tener un volumen suficientemente elevado de un sustrato determinado para realizar su digestión.

No obstante para la realización del experimento se ha utilizado como inóculo fangos digeridos provenientes de una EDAR urbana. De cara a mejorar el rendimiento de la digestión, es muy recomendable utilizar un inóculo aclimatado. Para conseguir este inóculo necesario digerir el sustrato en digestores en continuo. Analizando los parámetros de la muestra del interior los digestores a lo largo del tiempo, se podrá controlar el rendimiento y ver cómo se optimiza el proceso.

En cuanto a las técnicas de recolección de la biomasa algal, en este trabajo se ha optado por usar un método de sedimentación por su simplicidad. No obstante sería interesante profundizar en el conocimiento de las diferentes técnicas de separación de la biomasa y evaluar que técnica es más apropiada pensando en la explotación de la planta a gran escala.

En este sentido se deberían considerar aspectos como el consumo energético, la concentración de sólidos recolectados o la posible adición de flocculantes u otros compuestos entre otros.

Otro concepto que es indispensable para justificar la viabilidad de la aplicación de este pretratamiento, sería el estudio del balance energético del proceso. Mediante un balance energético global habrá que determinar si el potencial de producción de metano de la biomasa algal considerado la aplicación de un pretratamiento con térmico es suficiente para compensar la energía consumida en el pretratamiento.

Sin embargo, el pretratamiento térmico por este motivo, un pretratamiento a una temperatura más elevada sería más idóneo para aumentar el grado de solubilización y por tanto la producción final de metano. De esta manera se podría conseguir una mejora en el balance energético si la producción de metano incrementase notablemente a pesar de tener que utilizar más energía para el pretratamiento.

A su vez sería conveniente realizar un estudio económico del coste de los reactivos químicos empleados en la aplicación del pretratamiento químico.

---

## 7. Referencias

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Science*, *19*, 257-275.
- APHA (American Public Health Association). (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Vol. 19a). Washington.
- Aragón, A. B., Padilla, R. B., & Ursinos, J. A. (1992). Experimental study of the recovery of algae cultured in effluents from the anaerobic biological treatment of urban wastewaters. *Resources, Conservation and Recycling*, *6*, 293-302.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., & Perales, J. A. (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research*, *49*, 465-474.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., & Perales, J. A. (2013). Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. *Ecological Engineering*, *52*, 143-153.
- Arias, D., Uggetti, E., & García, J. (2015). *A self-supporting system recycling microalgal digestate for biomass cultivation*. Universitat Politècnica de Catalunya, Department of Hydraulic, Maritime and Environmental Engineering, Environmental Engineering and Microbiology Research Group, Barcelona. Spain.
- Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological engineering*, *28*, 64-70.
- Astals, S., Musenze, R., Bai, X., Tannock, S., Tait, S., Pratt, S., & Jensen, P. (2015). Anaerobic co-digestion of pig manure and algae: Impact of intracellular algal products recovery on co-digestion performance. *Bioresouce Technology*, *181*, 97-104.
- Brown, M., Jeffery, S., Volkman, J., & Dunstan, G. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, *151*, 315-331.
- Burgess, J. E., & Pletschke, B. I. (2008). Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini-review. *Water SA*, *34*(3), 343-350.
- C. González-Fernández, B. S., Bernet, N., & J.P.Steyer. (2012). Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresouce Technology*, *110*, 610-616.

- Caporgno, M., Trobajo, R., Caiola, N., Ibáñez, C., Fabregat, A., & Bengoa, C. (2015). Biogas production from sewage sludge and microalgae co-digestion under mesophilic and thermophilic conditions. *Renewable Energy*, *75*, 374-380.
- Carvajal, A., Peña, M., & Pérez-Elvira, S. (2013). Autohydrolysis pretreatment of secondary sludge for anaerobic digestion. *Biochemical Engineering Journal*, *75*, 21-31.
- de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, *101*, 1611-1627.
- 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 bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, *36*, 2941-2948.
- Diputació de Barcelona. Àrea de Medi Ambient. (2002). Disseny de reactors i models cinètics aplicats a la biodegradació anaeròbica de matèria orgànica complexa. En *Estudis i monografies 22. Digestió anaeròbica de residus sòlids urbans* (págs. 31-48). Barcelona: Institut d'Edicions de la Diputació de Barcelona.
- Fabiana Passos, J. C., & Ferrer, I. (2015). Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, *279*, 667-672.
- Gerken, H. G., Donohoe, B., & Knoshaug, E. P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, *237*, 239-253.
- Goldman, J. C., Tenore, K. R., & Stanley, H. I. (1973). Inorganic nitrogen removal in a combined tertiary treatment-marine aquaculture system-II. Algal bioassays. *Water Research*, *8*, 55-59.
- Goldmand, J. C., Tenore, K. R., & I, H. (s.f.).
- González, L. E., Cañizare, R. O., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, *68*, 259-262.
- González, M. S. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *ContactoS*, *59*, 64-70.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J. (2012). Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass and Bioenergy*, *40*, 105-111.
- Guellil, A., Boualam, M., Quiquampoix, H., Ginestet, P., Audic, J. M., & Block, J. C. (2001). Hydrolysis of wastewater colloidal organic matter by extracellular



- enzymes extracted from activated sludge flocs. *Water Science Technology*, 43(6), 33-40.
- IDAE, I.p. I. D. i. A. d. I. E. (2007). *Biomasa: Digestores anaerobios*. Recuperado el 05 de Juny de 2015, de [http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos\\_10737\\_Biomasa\\_digestores\\_07\\_a996b846.pdf](http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_10737_Biomasa_digestores_07_a996b846.pdf)
- Lee, K., Chantrasakdakul, P., Kim, D., Kong, M., & Park, K. Y. (2014). Ultrasound pretreatment of filamentous algal biomass for enhanced biogas production. *Waste Management*, 34, 1035-1040.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2014). Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. *Energy Conversion and Management*, 85, 551-557.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2014). Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. *Energy*, 78, 48-52.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2015). Algal culture integration in conventional wastewater treatment plants: Anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. *Bioresource Technology*, 184, 236-244.
- Marsolek, M. D., Kendall, E., Thompson, P. L., & Shuman, T. R. (2014). Thermal pretreatment of algae for anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 151, 373-377.
- Martínez, M., Sánchez, S., Jiménez, J. M., Yousfi, F. E., & Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73, 263-272.
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romera-Güiza, M. S., Fonoll, X., Peces, M., & Astals, S. (2014). A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 412-47.
- Mendez, L., Mahdy, A., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2014). Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. *Applied Energy*, 129, 238-242.
- Nuñez, V. J., Voltolina, D., Nieves, M., Piña, P., Medina, A., & Guerrero, M. (2001). Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Bioresource Technology*, 78, 161-164.
- Nybroe, O., Jorgensen, P. E., & Henze, M. (1992). Enzyme activities in waste water and activated sludge. *Water Resource*, 26(5), 579-584.

- Olsson, J., Feng, X. M., Ascue, J., Gentili, F. G., Shabijmam, M., Nehrenheim, E., & Thorin, E. (2014). Co-digestion of cultivated microalgae and sewage sludge from municipal waste water treatment. *Bioresource Technology*, 171, 203-210.
- Park, J. B., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal pond for biofuel production. *Bioresources Technology*, 102, 35-43.
- Passos, F., & Ferrer, I. (2014). Microalgae conversion to biogas: Thermal pretreatment contribution on net energy production. *Environmental Science & Technology*, 48, 7171-7178.
- Passos, F., Astals, S., & Ferrer, I. (2014). Anaerobic digestion of microalgae biomass after ultrasound pretreatment. *Waste Management*, 34, 2098-2103.
- Passos, F., García, J., & Ferrer, I. (2013). Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresource Technology*, 138, 79-86.
- Passos, F., Solé, M., García, J., & Ferrer, I. (2013). Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Applied Energy*, 108, 168-175.
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., & Ferrer, I. (2014). Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresource Technology*, 172, 403-412.
- Peña, M., Bravos, O., Pérez-Elvira, S., & Fdz-Polanco, F. (s.f.). *Enzymatic autohydrolysis of secondary sludge*. University of Valladolid, Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, Valladolid, Spain.
- Pouliot, Y., Buelna, G., Racine, C., & Noüe, J. d. (1989). Culture of cyanobacteria for tertiary wastewater treatment and biomass production. *Biological Wastes*, 29, 81-91.
- Richardson, J. W., Johnson, M. D., & Outlaw, J. L. (2012). Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactor for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest. *Algal Research*, 1, 93-100.
- Shao, L., Wang, T., Li, T., Lü, F., & He, P. (2013). Comparison of sludge digestion under aerobic and anaerobic conditions with a focus on the degradation of proteins at mesophilic temperature. *Bioresource Technology*, 140, 131-137.
- Siave, B., Bernet, N., & Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27(4), 409-416.
- Singh, S., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431-444.

- Skiadas, L., Gavala, H. N., Lu, J., & Ahring, B. K. (2005). Thermal pre-treatment of primary and secondary sludge at 70°C prior to anaerobic digestion. *Water Science & Technology*, 52(1-2), 161-166.
- Sukacová, K., Trtílek, M., & Rataj, T. (2015). Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. *Water Research*, 71, 55-63.
- Voltolina, D., Gómez-Villa, H., & Correa, G. (2005). Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using wastewater and a simulated light and temperature cycle. *Bioresource Technology*, 96, 359-362.
- Wang, M., & Park, C. (2015). Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge. *Biomass and Bioenergy*, 80, 30-37.
- Wang, M., Sahu, A. K., Rusten, B., & Park, C. (2013). Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 142, 585-590.
- Wang, T., Yabar, H., & Higano, Y. (2013). Perspective assessment of algae-based biofuel production using recycled nutrient sources: The case of Japan. *Bioresource Technology*, 128, 688-696.
- Ward, A. J., Lewis, D. M., & Green, F. B. (2014). Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, 5, 204-214.
- Whiteley, C., Heron, P., Pletschke, B., Rose, P., Tshivhunde, S., Jaarsveld, F. P., & Whittington-Jones, K. (2002). The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate reducing systems. Properties of proteases and phosphatases. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 419-424.
- Yang, Q., Luo, K., Li, X.-m., Wang, D.-b., Zheng, W., Zeng, G.-m., & Liu, J.-j. (2010). Enhanced efficiency of biological excess sludge hydrolysis under anaerobic digestion by additional enzymes. *Bioresource Technology*, 101, 2924-2930.
- Yu, G.-H., He, P.-J., & Shao, L.-M. (2007). Enzyme activities in activated sludge flocs. *Applied Microbiol Biotechnology*, 77, 605-612.
- Zhang, E., Wang, B., Wang, Q., Zhang, S., & Zhao, B. (2008). Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Bioresource Technology*, 99, 3787-3793.

*Páginas web:*

- [www.ciemat.es](http://www.ciemat.es)
- [www.gencat.cat/icaen](http://www.gencat.cat/icaen)
- [www.idae.es](http://www.idae.es)
- [www.oilgae.com](http://www.oilgae.com)
- [www.pnl.gov](http://www.pnl.gov)
- [www.microbioengineering.com](http://www.microbioengineering.com)

## Màster Interuniversitari UB-UPC d'Enginyeria en Energia

### Acta d'Avaluació de Projecte

Curs: 2015/16  
Codi UPC: **33563**

Data defensa:

Qualificació:

---

Alumne: Alejandro González Calzada

DNI: 05328367 - A

Títol: "Producción de biogàs a partir de microalgas y cianobacterias: efecto de los pretratamientos térmico y alcalino"

Director: Ivet Ferrer Martí

Director: María Solé Bundó

Ponent: Alejandro González Calzada

---

### Tribunal

President:

Vocals:

Suplents:

---

Observacions

### Signatura

Convocatòria Ordinària,	Convocatòria Extraordinària,
Cognoms, nom (President)	Cognoms, nom (President)
Cognoms, nom (Vocal)	Cognoms, nom (Vocal)
Cognoms, nom (Vocal)	Cognoms, nom (Vocal)