

**TRABAJO  
DE FIN DE  
GRADO**

**“DIGESTIÓN ANAEROBIA DE RESIDUOS DE  
PROCESOS DE APROVECHAMIENTO DE  
MICROALGAS. CO-DIGESTIÓN CON OTROS  
RESIDUOS”**

**GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL**

**CURSO 2015-2016**

**AUTORA: SULEIMA PADRINO HERNÁNDEZ**

**TUTORAS:**

**ANDREA BRITO ALAYÓN**

**ALICIA TORRES GIL**

**SEPTIEMBRE 2016**



## *AGRADECIMIENTOS*

En primer agradecer a mis tutoras Andrea Brito Alayon y Alicia Torres Gil por la colaboración y el interés mostrado en el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado.

En especial a Alicia Torres Gil por dedicarme su tiempo en ayudarme en la realización experimental como en la redacción de este mismo. Así como a Raimundo Arvelo Álvarez por su ayuda y consejos.

También quiero agradecer a todas las personas que han colaborado o se han interesado en este Proyecto; aportando datos, información, ánimos, curiosidad y muchas cosas más.

Por otro lado, agradecer a Isfemar Berroteran Buyón, Rafael Navarro Soto y Enrique Camacho Francisco por todo su apoyo durante estos años de carrera, además de estar a mi lado en los momentos más complicados.

Por último agradecer a mi familiar el apoyo y el esfuerzo que ha hecho para que hoy pudiera llegar a donde estoy.



## ÍNDICE



|   |    |
|---|----|
| ÍNDICE.....   | 1  |
| 0.-RESUMEN/ABSTRACT.....  | 7  |
| 0.1-Resumen.....  | 9  |
| 0.2.-Abstract.....  | 10 |
| 1.-INTRODUCCIÓN.....  | 11 |
| 1.1.-Problemática Energética.....   | 13 |
| 1.2.-Problemática Medioambiental.....   | 15 |
| 1.3.-Biocombustibles.....   | 17 |
| 1.3.1.-Clasificación de los biocombustibles.....                                | 17 |
| 1.3.2.-Beneficios y retos de los biocombustibles.....                           | 19 |
| 1.3.3.-Biodiésel.....   | 20 |
| 1.4.-Microalgas como fuente productiva de biocombustibles.....                  | 21 |
| 1.5.-Digestión Anaerobia.....   | 22 |
| 1.5.1.-Etapas de la digestión anaerobia.....                                    | 23 |
| 1.5.2.-Parámetros ambientales y operacionales. Variables de control.....        | 25 |
| 1.5.3.-Ventajas de la digestión anaerobia frente a la aerobia.....              | 29 |
| 1.5.4.-Digestión anaerobia aplicada a la gestión de residuos de microalgas..... | 30 |
| 1.6.-Procesos de co-digestión anaerobia.....                                    | 31 |
| 1.6.1.-Inóculos para la co-digestión de residuos de microalgas.....             | 31 |
| 2.-OBJETIVOS.....   | 35 |
| 2.1.-Objetivos generales.....   | 37 |
| 2.2.-Objetivos específicos.....   | 37 |

|  |    |
|--|----|
| 3.-MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 39 |
| 3.1.-Productos químicos utilizados.....  | 41 |
| 3.2.-Materias primas utilizadas.....   | 41 |
| 3.2.1.-Biomasa a digerir.....  | 41 |
| 3.2.1.1.-Microalgas sin tratar.....  | 41 |
| 3.2.1.2.-Residuos de microalgas procedentes del proceso de extracción lipídica.....  | 41 |
| 3.2.1.3.-Residuos de microalgas después de someterse al proceso de reacción de transesterificación <i>in situ</i> .....                  | 42 |
| 3.2.2.-Inóculos empleados.....   | 42 |
| 3.2.2.1.-Lodo anaerobio procedente de la depuración de aguas residuales.....   | 42 |
| 3.2.2.2.-Gallinaza.....  | 43 |
| 3.3.-Co-digestiones anaerobias.....  | 43 |
| 3.3.1.-Procedimiento experimental para las co-digestiones anaerobias.....  | 43 |
| 3.3.2.-Cuantificación de la producción de gas y sus componentes en las digestiones anaerobias.....                                       | 45 |
| 3.4.-Caracterización de los inóculos y de los residuos de las microalgas antes y después de las co-digestiones.....                      | 46 |
| 3.4.1.-Procedimiento experimental para la determinación de los Sólidos Totales, Fijos y Volátiles en muestras sólidas y semisólidas..... | 46 |
| 3.4.2.-Cuantificación de los Sólidos Totales, Fijos y Volátiles en muestras sólidas y semisólidas.....                                   | 47 |
| 3.4.3.-Determinación del pH en los digestores.....   | 48 |
| 3.4.4.-Determinación de la conductividad en los digestores.....  | 49 |
| 3.5.-Técnicas analíticas.....  | 50 |
| 3.5.1.-Técnicas cromatográficas. Cromatografía de gases.....   | 50 |
| 3.5.1.1.-Análisis de las muestras mediante cromatografía de TCD.....   | 51 |
| 4.-RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....  | 53 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1.-Caracterización de los residuos a emplear como biomasa de partida en las co-digestiones..... | 55 |
| 4.1.1.-Caracterización de las microalgas y sus residuos.....                                      | 55 |
| 4.1.2.-Caracterización del lodo anaerobio de depuradora.....                                      | 56 |
| 4.1.3.-Caracterización de la gallinaza.....   | 57 |
| 4.2.-Estudio preliminar. Elección del inóculo para la co-digestión.....                           | 57 |
| 4.3.-Producción de gas y sus componentes en la co-digestión de las microalgas y sus residuos..... | 62 |
| 4.3.1.-Digestores con microalgas sin tratar.....  | 62 |
| 4.3.2.-Digestores con residuos del proceso de extracción lipídica.....                            | 64 |
| 4.3.3.-Digestores con residuos del proceso de reacción <i>in situ</i> .....                       | 65 |
| 4.3.4.-Comparativa de los resultados en función de la biomasa empleada en la digestión.....       | 67 |
| 4.4.-Análisis de Sólidos Totales, Sólidos Volátiles y Sólidos Fijos.....                          | 70 |
| 4.5.-Análisis del pH y conductividad.....   | 72 |
| <br>  |    |
| 5.-CONCLUSIONES/RECOMENDACIONES.....  | 75 |
| <br>  |    |
| 5.1.- Conclusiones.....   | 77 |
| 5.1.- Conclusions.....  | 81 |
| 5.2.- Recomendaciones.....  | 84 |
| 5.2.- Recommendations.....  | 85 |
| <br>  |    |
| 6.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 87 |



**0.-RESUMEN/ABSTRACT**



## 0.1.-Resumen.

Durante los últimos años, el aumento del grado de industrialización ha aumentado de igual manera el consumo de energía primaria. La naturaleza agotable de las reservas de combustibles fósiles y su precio, unido a los problemas medioambientales derivados de su uso y explotación, han movilizadado a los Gobiernos y a la comunidad científica hacia la búsqueda de soluciones alternativas que satisfagan las demandas de la sociedad.

En el creciente interés por la producción de energía a partir de otras fuentes de energía más sostenibles se propone, como una de las alternativas prometedoras, la obtención de biocombustibles a partir de microorganismos, fijando la atención especialmente en las microalgas, que se encuentran clasificadas como la última generación de biocombustibles.

Las microalgas constan de una estructura celular sencilla, no obstante, son altamente eficientes en la fijación del CO<sub>2</sub> y la utilización de la energía solar para producir biomasa. Esta biomasa formada es rica en proteínas, carbohidratos y aceites naturales en forma de triglicéridos que son fundamentales para la producción de biocombustible. Este proceso productivo genera una serie de residuos sólidos que deben ser tratados para minimizar su impacto en el medioambiente.

Este Trabajo de Fin de Grado se centra en el estudio de la “Digestión anaerobia de residuos de procesos de aprovechamiento de microalgas. Co-digestión con otros residuos” buscando la valorización energética de los residuos sólidos de procesos de aprovechamiento de las microalgas junto con diferentes inóculos, como son el lodo anaerobio de depuradora y la gallinaza, para así favorecer la producción de biogás. En él se seleccionó el inóculo más apropiado para el proceso de co-digestión anaerobia, se estudió la producción y composición del biogás producido para tres especies distintas de microalgas y sus residuos, analizando los posibles parámetros inhibidores que contribuyen al cese de la actividad biológica y finalmente caracterizando los residuos generados en el proceso de la co-digestión anaerobia.

## 0.2.-Abstract

In recent years, increasing the degree of industrialization has increased just as the primary energy consumption. The finite nature of fossil fuel reserves and its price, coupled with the environmental problems arising from their use and exploitation, have mobilized governments and the scientific community to search for alternative solutions to meet the demands of society.

In the growing interest in energy production from other more sustainable sources of energy, to obtain biofuels from microorganisms it is proposed as one of the promising alternatives, focusing particularly on microalgae, which are classified as the latest generation of biofuels.

Microalgae consist of a simple cell structure, however, they are highly efficient in CO<sub>2</sub> fixation and utilization of solar energy to produce biomass. This biomass formed is rich in proteins, carbohydrates and natural oils in the form of triglycerides which are essential for the biofuel production. This production process generates a series of solid waste that must be treated to minimize their impact on the environment.

This Final Degree Work focuses on the study of "Anaerobic digestion of microalgae utilization process wastes. Co-digestion with other waste" looking for energy recovery from solid waste process using of microalgae with different inoculants, such as anaerobic sewage sludge and manure, in order to promote the production of biogas. The most appropriate inoculum for the anaerobic co-digestion process has been selected, the production and composition of the biogas produced for the three different species of microalgae and their wastes were studied, analyzing the possible inhibitors parameters that contribute to stop the biological activity and finally the anaerobic co-digestion process wastes have been characterized.

## 1.-INTRODUCCIÓN

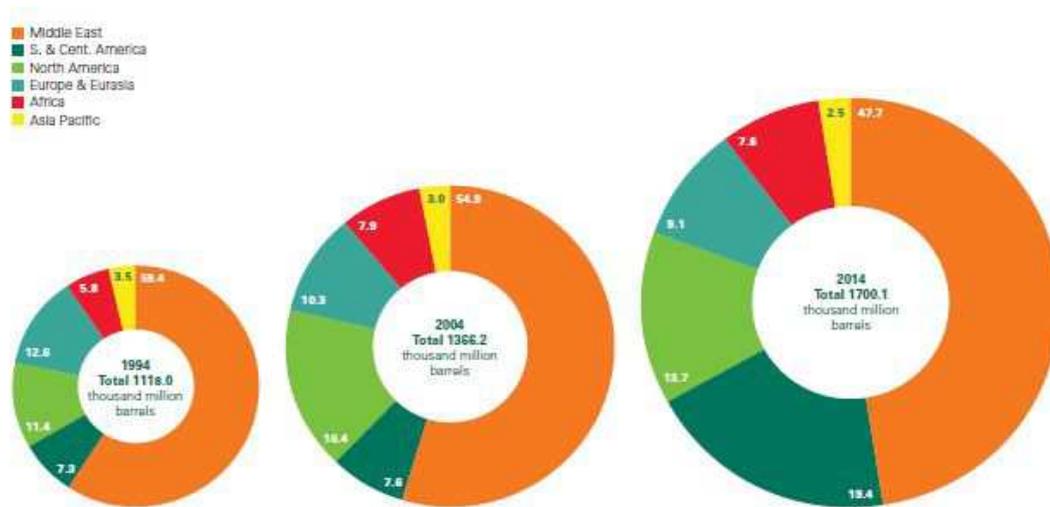


En este capítulo se aborda la problemática energética y ambiental derivada del uso de los combustibles fósiles y se presentan los biocombustibles como alternativa a corto plazo. También se centra en la descripción de las microalgas como cultivo con potencial energético y en la valorización de sus residuos como proceso estratégico.

## 1.1.-Problemática Energética.

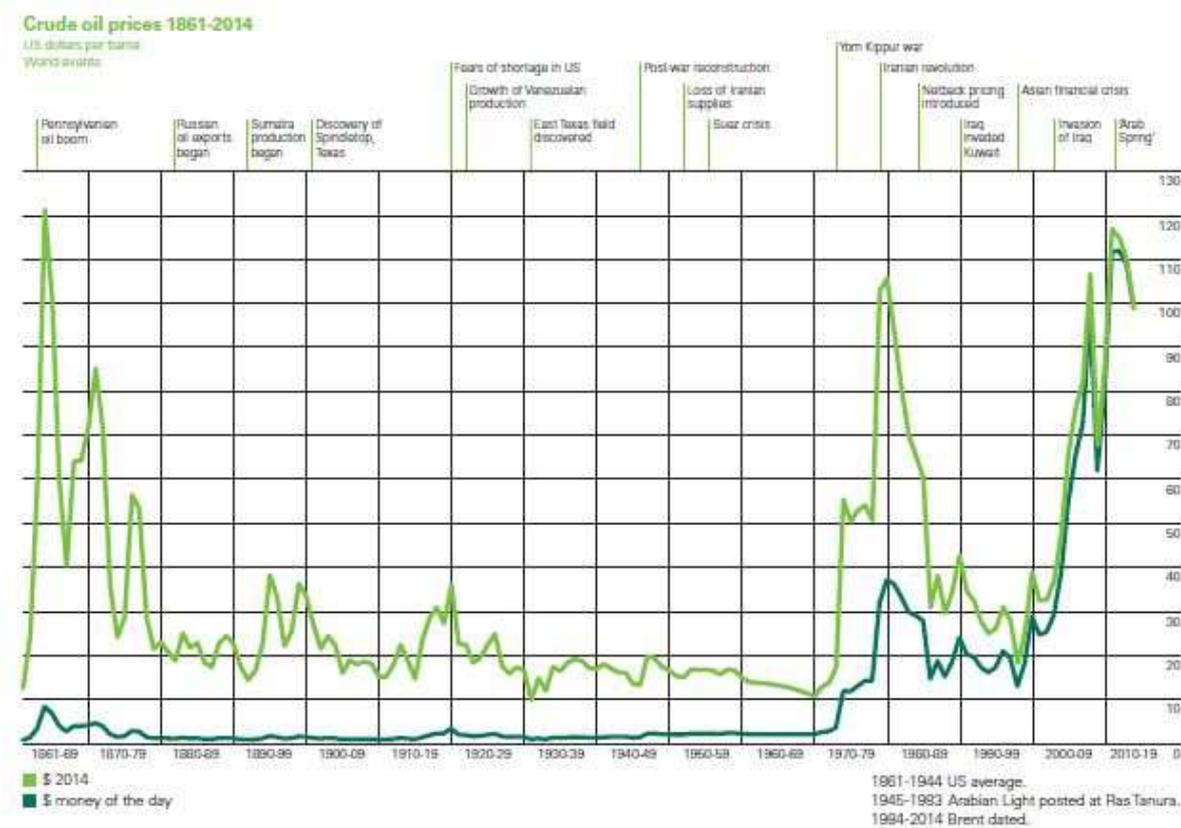
La demanda energética presenta uno de los problemas más complejos que envuelve a la sociedad actual, ya que esta se encuentra sometida a un constante progreso que ha derivado en un aumento de las emisiones de los gases de efecto invernadero.

En la actualidad existe una sobre-oferta de combustible, esto es debido a que las reservas de petróleo han aumentado (figura 1.1), debido a un descenso en la demanda. Esto ha conllevado una bajada de precios y a un descenso de la producción que no ha favorecido a los inversores, que están pendientes de tomar medidas que se harán llegar a los grandes productores para congelar sus extracciones y aliviar el exceso de oferta.



**Figura 1.1.-**Distribución de las reservas de petróleo en 1994, 2004 y 2014. (Bp. Statistical Review of World Energy, 2015).

Este colapso del precio de petróleo (figura 1.2) tendrá consecuencias políticas, siendo un catalizador para los conflictos mundiales, afectando a las naciones exportadoras de materia prima.



**Figura 1.2.-**Precios del crudo desde 1861 hasta 2014. (Bp. Statistical Review of World Energy, 2015).

En la figura 1.2 se puede observar como en los últimos años el precio del barril de petróleo se ha caracterizado por tener una gran inestabilidad, relacionada principalmente con conflictos políticos en los países productores, lo que genera el aumento del precio, y nuevas técnicas extractivas como el *fracking* han producido un importante descenso del precio. En 2014 el precio del barril Brent descendió por debajo de los 100\$ (Bp. Statistical Review of World Energy, 2015).

Este periodo temporal de precios bajos es una oportunidad para poner en marcha un cambio en el modelo energético que no sea tan dependiente del petróleo, ya que apostar por las prospecciones de petróleo o por el *fracking* es una hipoteca para el futuro que nos ancla en el mantenimiento de un modelo energético no deseado y no sostenible. Es por esto que debemos destinar parte de los recursos en iniciar un proceso de adaptación hacia una economía eficiente y medioambientalmente sostenible. Además, nunca debemos olvidar que la energía es un bien básico y un derecho ineludible para las personas y que es necesario evaluar las distintas alternativas.

Por todo lo expuesto con anterioridad, es necesario buscar una serie de alternativas que puedan abarcar la demanda y disminuir la dependencia de los combustibles fósiles, siendo las energías renovables la opción más prometedora.

## 1.2.-Problemática Medioambiental

La actividad socioeconómica humana sobre el sistema biológico de la naturaleza ha provocado numerosas alteraciones en el medioambiente ya que, cuanto mayor sea el número de habitantes, más recursos serán necesarios, lo que ha conducido al aumento de la contaminación. Esta contaminación se puede identificar por las siguientes evidencias como es el calentamiento global, la disminución de la capa de ozono o la lluvia ácida. La cantidad de CO<sub>2</sub> atmosférico había permanecido estable, aparentemente, durante siglos pero desde 1750 se ha incrementado en un 30%. Lo significativo de este cambio es que ha provocado un aumento de la temperatura de la Tierra. Según los científicos de la Met Office británica ([www.metoffice.gov.uk](http://www.metoffice.gov.uk)) el aumento global de las temperaturas con respecto a la era preindustrial ha sido de 1,02°C (± 0,11°C) siendo el 2015 como el año más caluroso.

Además la Organización Meteorológica Mundial (OMM) advierte que la concentración media de CO<sub>2</sub> supera las 400 ppm frente a los 275 ppm antes de la revolución industrial y por encima de los 350 ppm designados como límite de seguridad para evitar un impacto medioambiental incontrolable ([www.aemet.es](http://www.aemet.es)).

No solo la concentración de CO<sub>2</sub> han provocado el efecto invernadero, también otros gases como:

- ✓ El Metano (CH<sub>4</sub>): proviene del resultado de las actividades humanas que incluyen descomposición de vertederos, la digestión de rumiantes y el manejo de desechos de ganado y animales de producción. Los niveles de este hidrocarburo alcanzan los 2,845 ppb registradas el 25 de abril de 2015, los niveles de CH<sub>4</sub> globales han aumentado bruscamente desde un mínimo de 723 ppb en 1755.
- ✓ Los óxidos de nitrógeno: provienen de instalaciones fijas de combustión, de vehículos de gasolina y de los motores diésel. En la época preindustrial constaba de una concentración de 0,275 ppm. Cada año el incremento ronda el 0.25 % alcanzando en 2012 los 0,325 ppm.

Otro factor que provoca alteraciones en el medioambiente debido al aumento de la población es la generación de residuos sólidos. Al hablar de residuos sólidos se puede pensar inmediatamente en las basuras domésticas, sin embargo, la procedencia y los tipos de residuos son muy variados. La clasificación más utilizada de los residuos es mediante en función de su origen, clasificándolos en residuos domésticos, agrícolas y ganaderos, sanitarios, industriales y radiactivos.

La acumulación incontrolada de estos residuos, puede afectar de la siguiente forma al medioambiente:

- ✓ Los residuos con materia orgánica aumentan los riesgos de plagas que pueden ser portadoras de enfermedades, además de los malos olores debido a las fermentaciones por microorganismos.
- ✓ Degradación del paisaje.
- ✓ Los vertidos incontrolados pueden ocasionar contaminación en las aguas, tanto superficiales como subterráneas, debido a los lixiviados producidos cuando el agua de lluvia arrastra las sustancias tóxicas.

En resumen, los residuos sólidos sin tratar originan problemas para la salud y en el medioambiente, además de aumentar riesgos, ocupar suelo útil, agotamiento de los recursos y alto gasto económico de su almacenamiento.

Las perspectivas de futuro, en lo que al medioambiente se refiere son poco claras. A pesar de los cambios económicos y políticos, el interés y la preocupación por el medioambiente es importante. Para mejorar la calidad del aire se requiere una acción global coordinada para minimizar los problemas medioambientales derivados de la lluvia ácida, las emisiones de gases clorofluorocarbonados, la pérdida de la capa de ozono y la enorme contaminación atmosférica. Mientras no disminuya la lluvia ácida, la pérdida de vida continuará en los lagos y corrientes del norte, y puede verse afectado el crecimiento de los bosques. La contaminación del agua seguirá siendo un problema mientras el crecimiento demográfico continúe incrementando la presión sobre el medioambiente. La infiltración de residuos tóxicos en los acuíferos subterráneos y la intrusión de agua salada en los acuíferos costeros de agua dulce no se han interrumpido.

### **1.3.-Biocombustibles.**

Sobre las bases de las ideas expuestas anteriormente los biocombustibles son un factor clave a tener en cuenta para combatir el problema energético con la dependencia de los combustibles fósiles y la problemática medioambiental.

Los biocombustibles son combustibles de origen biológico, por lo que con esta definición se puede incluir el petróleo porque provienen de restos fósiles desde un punto de vista etimológico, sin embargo, los combustibles fósiles que provienen de la materia orgánica acumulada durante enormes períodos de tiempo, a diferencia de los biocombustibles, que provienen de una fuente renovable como es la biomasa. La biomasa es la materia orgánica que constituye todos los seres vivos, sus productos y desechos.

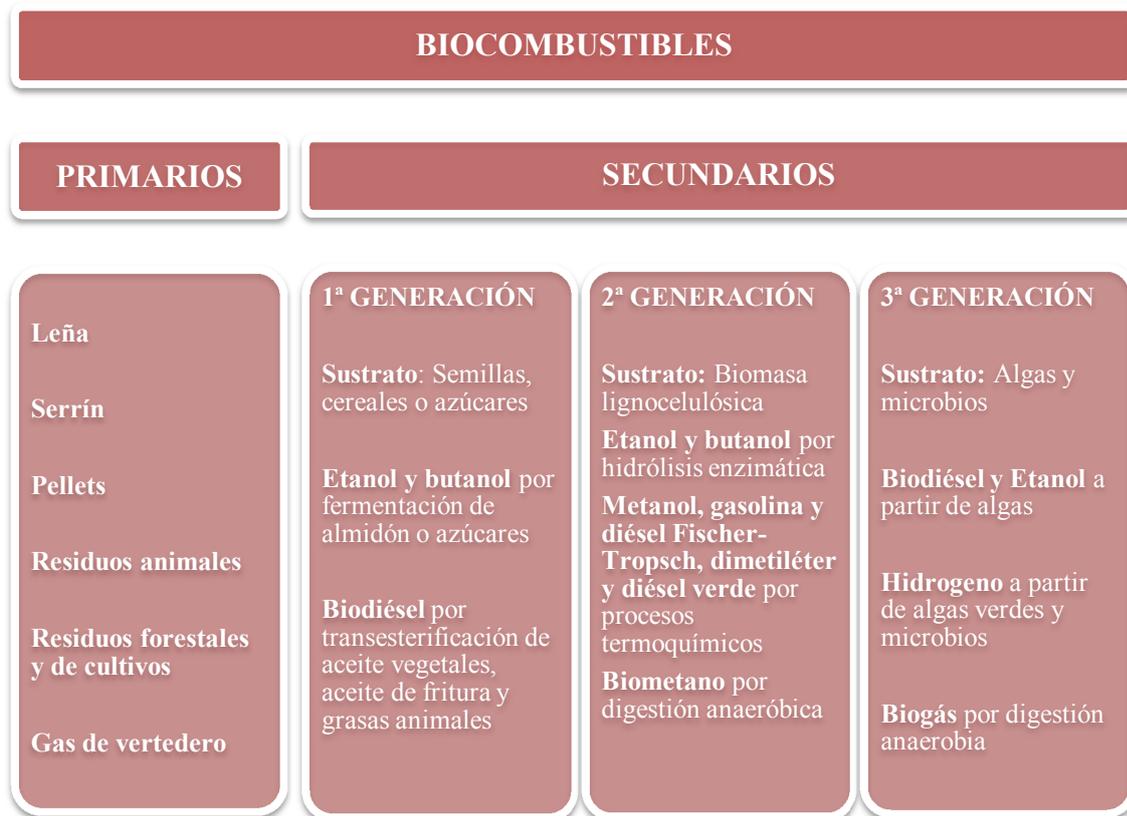
El CO<sub>2</sub> generado en su combustión se convierte en la fuente de carbono que necesita la biomasa de la que procede para su crecimiento, estableciéndose un ciclo cerrado en la producción y consumo de CO<sub>2</sub>. En el caso del biodiésel y bioetanol actualmente son mezclados con otros combustibles en pequeñas proporciones del 5 o 10%, proporcionando una reducción útil pero limitada de gases de efecto invernadero. En Europa y Estados Unidos, se ha implantado una legislación que exige a los proveedores mezclar biocombustibles hasta unos niveles determinados. Esta legislación ha sido copiada luego en muchos otros países (López, 2008).

#### **1.3.1.-Clasificación de los biocombustibles.**

Existen varias clasificaciones para los biocombustibles. En este caso la clasificación se realiza en función de la biomasa de partida.

En líneas generales, los biocombustibles están clasificados en dos grandes grupos: primarios y secundarios. Los secundarios a su vez se clasifican en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación en función del tipo de sustrato del que se obtienen.

En la tabla 1.1 se muestra el esquema completo de la clasificación de biocombustibles atendiendo a la naturaleza de la biomasa de origen:



**Tabla 1.1.-**Clasificación de los biocombustibles (adaptado de Nigam and Singh, 2010).

Los biocombustibles primarios son biomasa utilizada en su forma natural no procesada ni químicamente modificada. Se emplean en combustión directa, generalmente para aplicaciones industriales que impliquen calentamiento o la producción de electricidad.

Los biocombustibles secundarios son combustibles primarios modificados, que han sido procesados y producidos en forma sólida (carbón), líquida (etanol y biodiésel) o gaseosa (biogás, gas de síntesis e hidrógeno). Pueden utilizarse para un amplio rango de aplicaciones, incluyendo transporte y procesos industriales a altas temperaturas. Los biocombustibles secundarios se clasifican a su vez en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación, según la naturaleza de la biomasa de la que se obtienen.

Los biocombustibles de primera generación se están produciendo en una cantidad comercial significativa en distintos países. La viabilidad de su producción es, sin embargo, cuestionable debido al conflicto que existe con el suministro de alimento (Bajpai and Tyagi, 2006). Tienen elevados costes de producción debido a que la materia prima empleada para producir el combustible es también, en algunos casos, base de la cadena alimentaria. El uso de cultivos como la caña de azúcar, la remolacha azucarera, el maíz, la soja y la colza genera una

enorme tensión en los mercados alimentarios mundiales, contribuye a la escasez de agua y acelera la destrucción de los bosques (Brennan and Owende, 2010). Esta limitación ha favorecido la búsqueda de biomasa no comestible para la producción de biocombustibles. Además, la utilización de una pequeña parte de la planta reduce la eficiencia del uso del terreno.

Los biocombustibles de segunda generación se producen a partir de biomasa lignocelulósica que representa la parte no comestible de los cultivos destinados a la alimentación, residuos forestales o que provienen de plantas no comestibles. Al emplear biomasa no comestible como materia prima estos biocombustibles limitan la competición entre alimento y combustible asociada a los de primera generación, mejorando la economía del proceso. La biomasa empleada en este caso puede ser producida específicamente con fines energéticos, aprovechando una mayor fracción de la planta para el proceso, dando como resultado una mayor eficiencia en el uso del terreno (Nigam and Singh, 2010) y aprovechando terrenos no aptos para el cultivo de alimentos. El principal inconveniente de los biocombustibles de segunda generación es que requieren de terreno de cultivo para producir biomasa (Brennan and Owende, 2010) lo que puede producir un cambio en el uso del terreno, pasando de cultivos alimentarios a los cultivos energéticos, manteniendo igualmente la competición entre alimento y combustible.

La última generación de biocombustibles centra su atención en los organismos microscópicos. Por tanto, en base al conocimiento científico y a las proyecciones tecnológicas actuales, los biocombustibles de tercera generación derivados de microbios y microalgas están considerados como un recurso energético alternativo viable que carece de la mayoría de los inconvenientes asociados a los biocombustibles de primera y segunda generación (Nigam and Singh, 2010).

### **1.3.2.-Beneficios y retos de los biocombustibles.**

Los biocombustibles ofrecen la promesa de numerosos beneficios relacionados con las garantías energéticas, económicas y medioambientales.

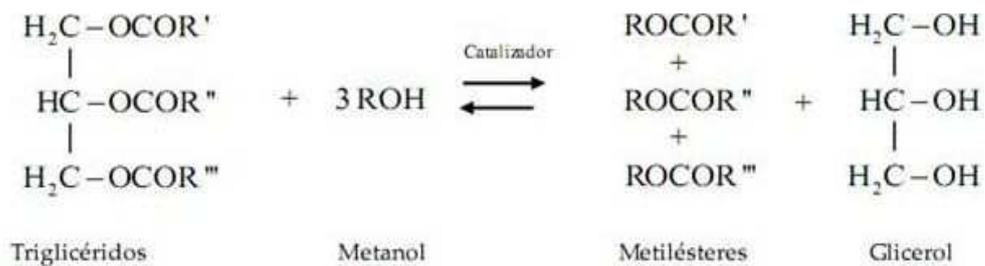
Para que la promesa se convierta en realidad se requieren muchos esfuerzos, empezando por la producción necesaria de biomasa y el almacenamiento efectivo de la misma. Esto combinado con fuertes políticas de apoyo a la I+D, producción y uso de los biocombustibles y, con las mejoras tecnológicas que aumenten la eficiencia del sistema y permitan la

recuperación de los co-productos de alto valor, son retos fundamentales para que los biocombustibles puedan reemplazar de forma efectiva a los combustibles fósiles (Nigam and Singh, 2010).

### 1.3.3.-Biodiésel.

El biodiésel es un biocombustible líquido compuesto de ésteres de alcoholes de cadena corta como etanol y metanol, a partir de ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable como aceites vegetales y grasas animales (Robles-Medina et al., 2009).

Los métodos para la obtención del biodiésel son cuatro: craqueo térmico (pirólisis), microemulsión, dilución y transesterificación. De las cuatro técnicas, la transesterificación de aceites es la solución más factible al problema de las altas viscosidades (Balat, 2011). La transesterificación es la reacción reversible entre triglicéridos y un alcohol para producir ésteres de ácidos grasos (biodiesel) y glicerol como subproducto.



**Figura 1.3.-**Reacción global de transesterificación de aceite a biodiésel.

La figura 1.3 se refiere al proceso global. Este proceso implica una secuencia de tres reacciones reversibles consecutivas en las cuales la molécula de triglicérido se convierte sucesivamente en diglicérido, monoglicérido y glicerol. Durante la reacción de transesterificación un mol de triglicérido reacciona con tres moles de alcohol para formar un mol de glicerol y tres moles del éster alquílico del ácido graso correspondiente.

Como consecuencia de lo anterior, durante el proceso se liberan tres moléculas de ésteres metílicos, es decir, tres moléculas de biodiésel ya que la relación estequiométrica entre el alcohol y el aceite es de 3:1.

En la reacción de transesterificación se utiliza un catalizador para mejorar la velocidad de reacción y el rendimiento final. Los catalizadores pueden ser ácidos homogéneos ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ) ácidos heterogéneos (Zeolitas, resinas), bases heterogéneas ( $\text{MgO}$ ,  $\text{CaO}$ ), básicos homogéneos ( $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ) o enzimáticos. En el caso del aceite de microalga el catalizador

empleado en el proceso debe tener carácter ácido debido al contenido en ácidos grasos libres del aceite (>0,5% en peso).

### **1.4.-Microalgas como fuente productiva de biocombustibles.**

Las microalgas son organismos unicelulares microscópicos (2-200 $\mu$ m), su metabolismo puede ser autótrofo o heterótrofo y suelen ser eucariontes, aunque las cianobacterias procariontas son clasificadas como microalgas (Greenwell et al., 2009).

El enorme interés despertado por estos microorganismos se debe a su rápido crecimiento ya que las células se duplican en un periodo de 1 a 10 días, tienen un alto contenido lipídico (más del 50 % en peso de materia seca en algunos casos) y utilizan menos superficie para su cultivo. Además, se obtiene una producción de aceites de 15 a 300 veces mayor que con otras especies para una misma área y son microorganismos con mayor capacidad para fijar el CO<sub>2</sub>. (Chisti, 2007). Se pueden utilizar con fines energéticos principalmente para la producción de biodiésel aunque también se pueden obtener electricidad o generar calor. Otras aplicaciones comerciales de las microalgas buscan obtener productos de alto valor añadido con aplicaciones en la nutrición y salud humanas, cosméticas e incluso fertilizantes.

A continuación se describen los beneficios de las microalgas para la obtención de biocombustibles:

- ✓ Los cultivos de microalgas pueden realizarse en áreas sumergidas, tierras infértiles e incluso con agua de mar (Singh and Singh, 2010)
- ✓ El cultivo de biomasa de algas aparte de proveer materia prima de biocombustibles, tienen un impacto ambiental favorable al reducir la concentración de gas de efecto invernadero, debido a que utiliza grandes cantidades de CO<sub>2</sub> durante su cultivo (Demirbas, 2008).
- ✓ Requiere una superficie menor que los cultivos agrícolas a los que pretende sustituir y no necesitan pesticidas ni herbicidas
- ✓ Tienen una baja demanda de energía y agua para su producción ya que no requiere suelo fértil ni agua de calidad, pudiendo emplear incluso aguas residuales.

- ✓ Son capaces de producir una reserva de lípidos de hasta el 70% de su masa.
- ✓ El proceso de fotosíntesis tiene una eficiencia en la fijación de CO<sub>2</sub> entre 4-8% frente a la de otras plantas que alcanzan un 2%.
- ✓ Algunas especies no necesitan sustrato orgánico para su supervivencia, propiciando su cultivo en lugares que carecen de interés para otro tipo de actividad.
- ✓ Dado que son organismos unicelulares, las reservas de biomasa son de fácil acceso al reproducirse de forma exponencial y cultivarse en numerosos medios.
- ✓ La ausencia de fósforo y el hecho que presentan lípidos con alto porcentaje de ácidos grasos, hacen que las microalgas sean ideales para la producción de biocombustibles debido a su baja sensibilidad a la oxidación.

Se han descrito numerosos aspectos que perfilan a las microalgas como una de las fuentes más adecuadas para la producción de biocombustibles. No obstante, el principal factor a superar es el costo de producción de la biomasa, que involucra la optimización de medios.

Además, es obligatorio considerar el proceso de obtención de la biomasa, la tecnología de transesterificación, purificación, y el uso de subproductos. También es necesario el desarrollo de un proceso propio de producción de microalgas a gran escala y de sistemas adaptados a las necesidades y condiciones de la región que se ha de realizar.

En el caso del biodiésel a partir de microalgas, tanto el proceso de obtención de biodiésel en dos etapas (extracción-reacción) como el proceso en una etapa (directo o *in situ*) generan residuos sólidos de microalgas que son susceptibles de ser valorizados mediante otros procesos de conversión para la recuperación energética o para la generación a su vez de materias primas para otros procesos.

### **1.5.-Digestión Anaerobia.**

Los tratamientos biológicos surgen como una gran alternativa para la estabilización de parte de los residuos generados.

En todos los sistemas de tratamiento de residuos, la descomposición ocurre aeróbica o anaeróbicamente, donde cada una de las rutas tiene alguna característica distintiva que se

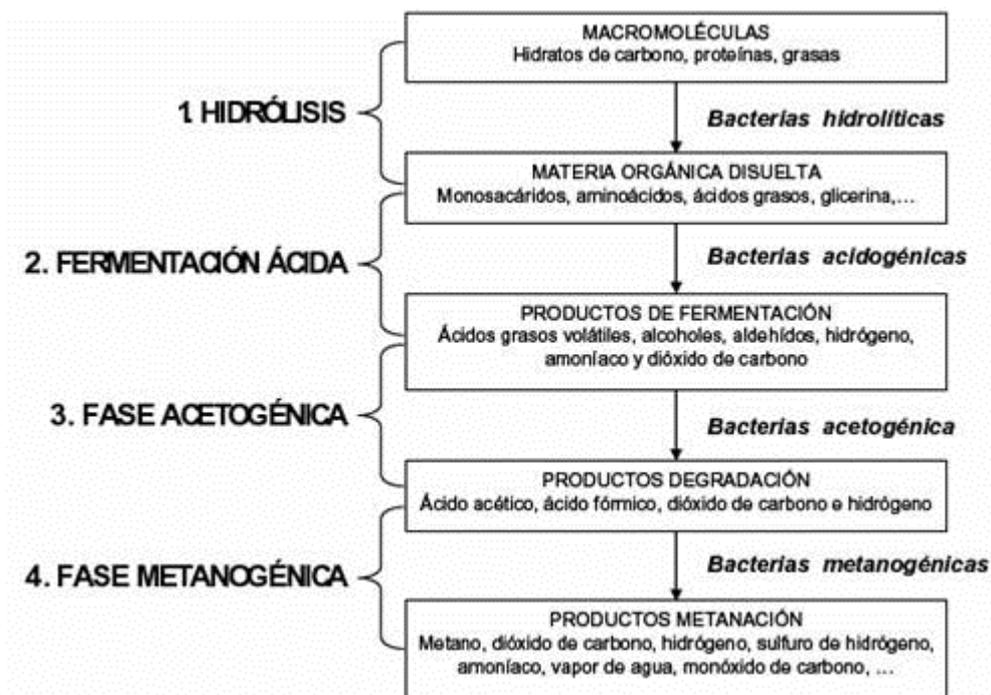
busca en los procesos de tratamiento (Tauseef et al., 2013). La digestión anaerobia es un proceso de degradación biológica donde una parte de la materia orgánica que es contenida por un sustrato se transforma en diversos gases (principalmente  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ), por medio de la acción de un grupo de microorganismo y sin la presencia de oxígeno ( $\text{O}_2$ ). De forma natural se produce en ambientes donde se acumula material orgánico biodegradable en ausencia de  $\text{O}_2$ , como vertederos y pantanos.

Este proceso genera diversos gases, entre los cuales el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{CH}_4$  son los más abundantes. Esta mezcla de gases obtenida a partir de residuos orgánicos (biomasa) se denomina biogás.

### 1.5.1.-Etapas de la digestión anaerobia.

La digestión anaerobia es un proceso muy complejo tanto por el número de reacciones bioquímicas que tienen lugar, como por la cantidad de grupos de bacterias involucradas en ellas. De hecho, muchas de estas reacciones ocurren de forma simultánea.

A continuación se muestra una figura en la que se encuentran recogidas las cuatro fases del proceso de la digestión anaerobia.



**Figura 1.4.-**Esquema de reacciones en el proceso de digestión anaerobia.

1. Etapa de hidrólisis: La hidrólisis consiste en una transformación controlada por enzimas extracelulares en la que las moléculas orgánicas complejas y no disueltas se rompen en compuestos susceptibles de emplearse como fuente de materia y energía para las células de los microorganismos, es decir, los compuestos de alto peso molecular como proteínas, polisacáridos y lípidos no pueden ser utilizados directamente por los microorganismo, por lo que se transforman en moléculas más sencillas. Las materias de partida a tratar tienen un alto contenido en sólidos, por lo que la etapa hidrolítica puede ser la etapa limitante de la velocidad del proceso global. La humedad es otro parámetro directamente proporcional a la velocidad de la etapa por esta razón son más favorables al uso cuanto más humedad tengan.
2. Etapa acidogénica o fermentación ácida: La segunda etapa, controlada por bacterias, consiste en la transformación de los compuestos formados en la primera etapa en otros compuestos de peso molecular intermedio, como  $\text{CO}_2$ , hidrógeno ( $\text{H}_2$ ), ácidos y alcoholes alifáticos, metilamina, amoníaco y sulfhídrico, es decir se produce la conversión de los materiales orgánicos simples a ácidos grasos volátiles (AGV's), lo que normalmente causa la disminución del pH por debajo de 7.
3. Etapa acetogénica: En la etapa acetogénica, los ácidos y alcoholes que provienen de la de la acidogénesis se va transformando por la acción de bacterias en ácido acético,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  Las bacterias acetogénicas son las encargadas de esta conversión.
4. Etapa metanogénica: La metanogénesis, última etapa, consiste en la transformación bacteriana del ácido acético y del ácido fórmico en  $\text{CO}_2$  y la formación de  $\text{CH}_4$  a partir de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ .

Las bacterias responsables de este proceso son anaeróbicas estrictas. Se distinguen dos tipos de microorganismos, los que degradan el ácido acético a  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  (bacterias metanogénicas acetoclásticas) y los que reducen el dióxido de carbono con  $\text{H}_2$  a  $\text{CH}_4$  y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (bacterias metanogénicas hidrogenófilas). A través de los sustratos monocarbonados o con dos átomos de carbono unidos por un enlace covalente, aumentan los valores de pH por encima de 7, y los sustratos son transformados a  $\text{CH}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .

El metano no es el único gas que se produce en la degradación de la materia orgánica en condiciones anaerobias sino que se trata de una mezcla de gases conocida como biogás, que está compuesta mayoritariamente por CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y trazas de otros gases (Tabla 1.2) La composición o riqueza del biogás dependerá del sustrato digerido y del funcionamiento del proceso.

| <b>Tabla 1.2.-Composición de referencia del biogás.</b> |                      |
|---|----------------------|
| <b>Compuesto</b>  | <b>Concentración</b> |
| <b>Metano (CH<sub>4</sub>) (%)</b>                      | 50-70                |
| <b>Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) (%)</b>          | 30-50                |
| <b>Hidrógeno (H<sub>2</sub>) (%)</b>                    | 1-10                 |
| <b>Nitrógeno (N<sub>2</sub>) (%)</b>                    | < 3                  |
| <b>Oxígeno (O<sub>2</sub>) (%)</b>                      | < 0,1                |
| <b>Ácido Sulhídrico (H<sub>2</sub>S) (ppm)</b>          | 0-8000               |

### 1.5.2.-Parámetros ambientales y operacionales. Variables de control.

Existen distintos factores que afectan a la producción de biogás, algunos especialmente sensibles cuando se parte de los residuos orgánicos. La actividad metabólica involucrada en el proceso metanogénico se ve afectada por diversos factores y dado que cada grupo de bacterias intervinientes en las distintas etapas del proceso responde, en forma diferencial, a esos cambios no es posible dar valores de forma precisa sobre el grado de afección de cada uno de ellos en lo relativo a la producción de gas.

Entre los factores más importantes a tener en cuenta se destacan los siguientes:

- ✓ Temperatura del sustrato: En el proceso de digestión anaerobia uno de los parámetros importantes es la temperatura, la cual está relacionada con la velocidad de las reacciones involucradas con el proceso y características de las comunidades microbianas como supervivencia, crecimiento y competición entre las especies.

Muchos estudios han demostrado un efecto negativo en la actividad metabólica de los microorganismos anaerobios al disminuir la temperatura (McHugh et al., 2004; Morgan-Sagastume and Allen, 2005; Connaughton et al., 2006; Nadarajah et al., 2007; Enright et al., 2009). A pesar de que los microorganismos anaerobios pueden aclimatarse a diferentes condiciones de temperatura de operación, esto podría afectar la actividad de la biomasa y por lo tanto al rendimiento del digestor (Bergamo et al., 2009). La temperatura tiene una fuerte influencia sobre la respuesta de las comunidades microbianas responsables de la digestión anaerobia, podrían considerarse como una perturbación o factor de inhibición.

En función de la temperatura a la que tiene lugar el proceso predominarán unas bacterias u otras (Tabla 1.3).

| <b>Tabla 1.3.- Clasificación de las bacterias según la temperatura óptima de crecimiento (Metcalf and Eddy, 1995).</b> |                         |                 |
|--|-------------------------|-----------------|
| <b>Tipo de bacteria</b>  | <b>Temperatura (°C)</b> |                 |
|  | <b>Intervalo</b>        | <b>T óptima</b> |
| <b>Psicrófilas</b>   | -10 – 30                | 12 – 18         |
| <b>Mesófilas</b>   | 20 – 50                 | 25 – 40         |
| <b>Termófilas</b>  | 35 – 75                 | 55 – 65         |

La actividad biológica aumenta con la temperatura, pero también se incrementan los costos de producción y la sensibilidad a algunos inhibidores, como el amoníaco. Al mismo tiempo se deberá tener en cuenta que al no generar calor en el proceso, la temperatura deberá ser lograda y mantenida mediante energía exterior. El cuidado en el mantenimiento también debe extremarse a medida que aumenta la temperatura, dada la mayor sensibilidad que presentan las bacterias termofílicas a las pequeñas variaciones.

Todas estas consideraciones deben ser evaluadas antes de escoger un rango de temperaturas para el funcionamiento de un digestor ya que a pesar de

incrementarse la eficiencia y producción de gas paralelamente aumentara los costos de instalación y complejidad de la misma.

- ✓ Tipo de materia prima o nutriente disponible: Las materias primas fermentables incluyen dentro de un amplio espectro a los excrementos animales y humanos, restos de cosechas y basuras de diferentes tipos como los efluentes de determinadas industrias químicas. El proceso microbiológico no solo requiere de fuentes de carbono y nitrógeno sino que también deben estar presentes en un cierto equilibrio.
- ✓ Tiempo de retención: Es el tiempo que deben permanecer la materia orgánica en el digestor para su completa conversión del biogás. Este término es definido para los sistemas de digestión discontinua, ya que en los de digestión continua se hace referencia al volumen de digestor y volumen de carga diaria. El tiempo de retención está íntimamente ligado con la temperatura de digestión, a mayor temperatura menos tiempo de retención, disminuyendo así el volumen del digestor y los sistemas de calefacción de la mezcla, siendo la relación coste-beneficio la que determine los valores de la temperatura.
- ✓ Nivel de acidez o pH de la muestra: Otro parámetro importante a controlar en el proceso de digestión es el pH. El valor de este parámetro depende de la concentración de ácidos volátiles y de la propia alcalinidad o acidez de la materia orgánica a digerir. Los valores óptimos para el pH están entre 6,6 y 7,6. Las desviaciones conducen a una ineficiencia de la producción del biogás, ya que las bacterias metanogénicas son sensibles a las variaciones del pH. La mezcla a digerir puede absorber variaciones de este parámetro debido a los equilibrios bicarbonatos-dióxido de carbono ( $\text{HCO}_3^- - \text{CO}_2$ ) y amonio-amoniaco ( $\text{NH}_4^+ - \text{NH}_3$ ), a pesar de esto se puede equilibrar introduciendo alguna sustancia reguladora.

Las desviaciones de los valores normales son indicativas de un fuerte deterioro del equilibrio entre las bacterias de la fase ácida y la metanogénica provocando severas fluctuaciones en algunos de los parámetros que gobiernan el proceso.

- ✓ Contenido en sólidos: Según esta variable se determina la movilidad de las bacterias y por lo tanto puede verse afectada la eficiencia de la producción del biogás.
- ✓ Inhibidores del proceso: Todas las sustancias son necesarias en su justa medida, cuando se sobrepasan esos valores se pueden llegar a interrumpir la actividad bacteriana. En la tabla 1.4 siguiente se muestran los inhibidores comunes de la digestión anaerobia (Carrillo, 2003; y Hilbert, 2004). Estos valores se deben tomar como orientativos, puesto que las bacterias intervinientes pueden con el tiempo adaptarse a condiciones que en un principio las afectaba marcadamente.

| <b>Tabla 1.4.- Inhibidores comunes de la digestión anaerobia</b> |                                    |
|--|------------------------------------|
| Inhibidor  | Concentración inhibidora<br>(mg/l) |
| Ácidos volátiles   | 2.000                              |
| Nitrógeno  | 3.000                              |
| SO <sub>4</sub>  | 2.000                              |
| NaCl   | 40.000                             |
| Cu   | 100-250                            |
| Cr   | 200                                |
| Ni   | 200-250                            |
| ABS ( detergente sintético)                                      | 20-40                              |
| Na   | 3.500-5.500                        |
| K  | 2.500-4.500                        |
| Ca   | 2.500-4.500                        |
| Mg   | 1.000-1.500                        |

- ✓ Grado de agitación/ mezclado: Este parámetro es de gran importancia, porque favorece el contacto directo entre el sustrato y las bacterias, evitando así la formación de espacio “muerto” sin actividad biológica. Asimismo, se logra distribuir de manera uniforme la temperatura en el interior del digestor. Por

otro lado, se reduce al máximo la formación de una costra flotante en el sustrato.

En la selección del sistema, frecuencia e intensidad de la agitación hay que considerar, dado que el proceso fermentativo involucra un equilibrio simbiótico entre varios tipos de bacterias, la ruptura de ese equilibrio, en el cuál el metabolito de un grupo específico servirá de alimento para el siguiente, implicará una merma en la actividad biológica y por ende una reducción en la producción del gas.

Existen varios mecanismos de agitación utilizados desde los más simples que consisten en un batido manual o el provocado por la entrada y salida de los líquidos hasta sofisticados equipos que involucran agitadores de hélice, recirculaciones de sustratos e inyectores de gas.

### **1.5.3-Ventajas de la digestión anaerobia frente a la aerobia.**

Las principales ventajas de la digestión anaerobia como proceso de conversión son: que implica el uso de tecnologías muy simples y que es un proceso altamente eficiente en la eliminación de materia orgánica. Las instalaciones son fácilmente escalables y se pueden situar prácticamente en cualquier lugar. Las ventajas del proceso de la digestión anaerobia se pueden clasificar en ventajas ambientales y socioeconómicas (López 2008):

- ✓ Se considera que todo el CO<sub>2</sub> emitido, en la combustión del biogás derivado de la digestión anaerobio de la materia orgánica, ha sido previamente fijado en el crecimiento de la materia vegetal que la ha generado, por lo que no contribuye al incremento de su proporción en la atmósfera y, por tanto, no es responsable del aumento del efecto invernadero.
- ✓ La biomasa tiene contenidos en azufre prácticamente nulos, generalmente inferior al 0,1%. Por este motivo, las emisiones de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), y las de óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), que los causantes de la lluvia ácida, son mínimas.
- ✓ El empleo de la tecnología de digestión anaerobia para tratar la materia orgánica además de anular su carga contaminante, reduce fuentes de olores y

elimina, casi en su totalidad, los gérmenes y los microorganismos patógenos del residuo.

- ✓ Los fangos resultantes del proceso de digestión anaerobia pueden emplearse como fertilizantes en la agricultura, ya que presentan unas características excelentes por su valor agronómico.
- ✓ El aprovechamiento energético de la materia orgánica contribuye a la diversificación energética, uno de los objetivos marcados por los planes energéticos, tanto a escala nacional como europea. Debido a la producción biogás en la digestión anaerobia se obtiene una fuente de energía alternativa.

#### **1.5.4.-Digestión anaerobia aplicada a la gestión de residuos de microalgas.**

El uso masivo de microalgas para diversos usos implicaría el desarrollo de instalaciones de cultivos a gran escala, por lo que habría que tener en cuenta la necesidad de gestión de grandes cantidades de residuos. En este sentido, la digestión anaerobia se convierte en un proceso clave que puede resolver la gestión de los residuos además de hacer favorable el balance económico y energético. De hecho, hay autores que aseguran que la conversión de microalgas en  $\text{CH}_4$  después de la extracción de lípidos es un proceso que puede recuperar más energía que la derivada de los lípidos extraídos (Sialve et al., 2009).

En la digestión de microalgas se han identificado una serie de factores clave que condicionan su biodegradabilidad. La pared celular no es fácilmente biodegradable y puede dar lugar a bajos rendimientos en la producción de metano. La resistencia de la pared celular a la hidrólisis enzimática limita la accesibilidad de las bacterias anaerobias al contenido intracelular. Este factor debe tenerse en consideración a la hora de seleccionar las especies para fines energéticos.

Además, su alto contenido de proteínas provoca una liberación de amoníaco que inhibe el proceso de digestión (Chen et al., 2008). Una característica de las microalgas es su baja relación C/N (altamente dependiente de la especie) especialmente si se compara con los cultivos terrestres. La relación C/N tiene un valor medio de 10,2 para especies dulceaquícolas mientras es de 36 para cultivos terrestres (Elser et al., 2000). La composición celular es

también altamente dependiente de las condiciones de cultivo (Droop, 1983; Leadbeater, 2006).

Las soluciones más adecuadas para superar los obstáculos presentes son los pretratamientos con el objetivo de debilitar la pared celular, la co-digestión con un sustrato de elevado contenido en carbono para equilibrar la alta concentración de nitrógeno de las algas, o cambios en las condiciones del proceso de digestión como el tiempo de residencia y la temperatura. (Sialve et al., 2009).

## **1.6.-Procesos de co-digestión anaerobia.**

La co-digestión es la digestión de dos o más sustratos diferentes. Su principal ventaja consiste en aprovechar la sinergia de la mezcla, compensando las carencias que cada uno de los sustratos tengan por separado. Sus objetivos generales:

- ✓ Aprovechar la complementariedad de los compuestos para dar lugar a procesos más eficaces.
- ✓ Compartir instalaciones y unificar metodologías reduciendo así costes de inversión y explotación.
- ✓ Amortiguar las variaciones temporales en producción y composición de cada residuo por separado.

### **1.6.1-Inóculos para la co-digestión de residuos de microalgas.**

Es importante determinar inicialmente la viabilidad de las mezclas antes de realizar los experimentos, puesto que pueden ser tóxicos o inhibidores que invaliden el nuevo producto como co-sustrato para la co-digestión. Inclusive debe analizarse la proporción adecuada de cada residuo con la intención de evitar sobrecargas orgánicas en el digestor, así como los parámetros de operación. Para ilustrar esta afirmación, un alto contenido en lípidos de algunos residuos proporciona elevados resultados teóricos de producción de biogás, pero en la práctica, depende de la concentración de ácidos grasos, puesto que son tóxicos para el crecimiento microbiano.

A continuación se detallan las características principales de dos sustancias que se han estudiado como inóculos en la co-digestión anaerobia de residuos vegetales:

- ✓ Gallinaza: el empleo de excretas de aves como materia prima para la co-digestión anaerobia ha sido evaluado por diversos autores, debido a su importante contenido en nitrógeno, fósforo y potasio considerándolo uno de los fertilizantes más completos e incluso como complemento alimenticio en la crianza de ganado debido a la riqueza química de sus nutrientes. Esto se debe a que las gallinas solo asimilan entre el 30% y 40% de los nutrientes con las que se les alimenta, lo que hace que en su estiércol se encuentren el restante 60% a 70% no asimilado.

Un beneficio para la gallinaza es que puede ser tratada en los biodigestores, lo que acelera el proceso de descomposición y hace más efectiva la transformación de sus elementos en el proceso de generación de biogás. La cantidad y calidad de la gallinaza está influenciada por los siguientes factores (Rodríguez 1999, Rodrigo 2005):

1. Edad del ave: la cantidad de excretas está relacionada con el tamaño del ave, al ser un ave pequeña, la cantidad disminuye, contrario a lo que pasaría con aves de mayor edad, donde la cantidad de excretas será mayor.
2. Línea de producción: según la línea de producción que se siga el manejo es distinto, particularmente en la composición del alimento, lo que finalmente se refleja en la calidad y la cantidad de las excretas de las aves. Es importante tener como referencia que aproximadamente por cada kilogramo de alimento consumido, las aves producen de 1,1 a 1,2 kg de excretas frescas (70- 80% de humedad en gallinaza).
3. Consumo de alimento: la cantidad de excretas depende de la cantidad de alimento consumido, tomando en cuenta su digestibilidad.
4. Cantidad de alimento desperdiciado: La composición química del alimento utilizado en la industria avícola se encuentra relacionada con la cantidad de la gallinaza. Al desperdiciar alimento y ser depositado en la superficie donde se encuentran las excretas, enriquecerá a la gallinaza (principalmente nitrógeno (N)), dependiendo de la cantidad desaprovechada.

5. Cantidad de plumas: las plumas en su estructura química contienen queratina, dicha proteína tiene como componente principal el N.
  6. Temperatura: alta temperatura y humedad generan gases, principalmente  $\text{NH}_3$ , perdiendo de esta forma grandes cantidades de N y generando una gallinaza de baja calidad
  7. Ventilación: el flujo de aire en la gallinaza reduce la pérdida de N causada por su volatilización en forma de  $\text{NH}_3$ .
- ✓ Lodo de depuradora: Se define como lodos de depuradora al residuo generado en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Los lodos se caracterizan por ser un residuo extremadamente líquido (más de un 95% de agua). Su composición es variable y depende de la carga de contaminación del agua residual inicial y de las características técnicas de los tratamientos llevados a cabo en las aguas residuales. Los tratamientos del agua concentran la contaminación presente en el agua y, por tanto, los lodos contienen amplia diversidad de materias suspendidas o disueltas. Algunas de ellas con valor agronómico (materia orgánica, N, fósforo (P) y potasio (K) y en menor cantidad calcio (Ca), magnesio (Mg)) y otros micronutrientes esenciales para las plantas) y otras con potencial contaminante como los metales pesados, entre ellos cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn), los patógenos y los contaminantes orgánicos.(www.magrama.gob.es)

La composición de los lodos generados en el tratamiento de aguas residuales domésticas se muestra en la tabla 1.5, observándose que sus características varían en función del proceso que da origen a los lodos.

| <i>Parámetros</i>                     | <i>Lodos primarios</i>           | <i>Lodos secundarios (mezcla)</i> | <i>Lodos digeridos</i> |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| pH                                    | 5.5-6.5                          | 6.5-7.5                           | 6.8-7.6                |
| Contenido de agua (%)                 | 92-96                            | 97.5-98                           | 94-97                  |
| ssv (%ss)                             | 70-80                            | 80-90                             | 55-65                  |
| Grasas (%ss)                          | 12-14                            | 3-5                               | 4-12                   |
| Proteínas (%ss)                       | 4-14                             | 20-30                             | 10-20                  |
| Carbohidratos (%ss)                   | 8-10                             | 6-8                               | 5-8                    |
| Nitrógeno (%ss)                       | 2-5                              | 1-6                               | 3-7                    |
| Fósforo (%ss)                         | 0.5-1.5                          | 1.5-2.5                           | 0.5-1.5                |
| Bacterias patógenas (NMP/100ml)       | 10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup> | 100-1000                          | 10-100                 |
| Metales pesados (%ss)<br>(Zn, Cu, Pb) | 0.2-2                            | 0.2-2                             | 0.2-2                  |

**Tabla 1.5.-**Composición de lodos en función del origen (Oropeza, 2006).

El lodo de depuradora, al ser un residuo, necesita ser tratado para minimizar su impacto en el medioambiente. Los tratamientos más comunes buscan, por una parte, la reducción del volumen de lodos y por otra, su estabilización. Los tratamientos más comunes son la digestión anaerobia, la digestión aerobia, compostaje, tratamientos químicos o la incineración.

## **2.-OBJETIVOS**



## 2.1.-Objetivos generales.

Este trabajo se enmarca dentro de otro más amplio que tiene como objetivo fundamental el estudio de la viabilidad de cultivos energéticos de microalgas para la obtención de biodiésel. Esto ha conducido a la generación de un conjunto de residuos sólidos de microalgas, concretamente a partir de los procesos de extracción de lípidos con metanol y de reacción de transesterificación directa sobre la biomasa, susceptibles de ser valorizados.

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado es la valorización de la biomasa sólida residual generada en los procesos de aprovechamiento de microalgas con fines energéticos. En este caso concreto, el proceso que se ha estudiado ha sido la co-digestión anaerobia de los residuos de microalgas, en la que se emplea un inóculo para favorecer la producción de biogás.

## 2.2.-Objetivos específicos.

Para conseguir el objetivo general de este Trabajo Fin de Grado se establecieron como objetivos específicos del mismo los siguientes puntos:

1. Seleccionar un inóculo que favorezca la co-digestión anaerobia de los residuos de microalgas.
2. Estudiar la producción de biogás y su composición para los distintos tipos de residuos de microalgas.
3. Estudiar la evolución del contenido en sólidos de los biodigestores después del proceso de co-digestión anaerobia, para así poder evaluar el grado de descomposición alcanzado.
4. Estudiar la influencia del pH y la conductividad en el proceso de co-digestión anaerobia.



### **3.-MATERIALES Y MÉTODOS**



A continuación se describen los productos químicos, materias primas, técnica analítica, y técnica experimental utilizados en este Trabajo Fin de Grado.

### 3.1.-Productos químicos utilizados.

Para la preparación de los biodigestores se han utilizado los siguientes productos:

- ✓ Ácido clorhídrico (HCL), 37% Merck.
- ✓ Carbonato cálcico (CaCO<sub>3</sub>), Panreac 99,0%.
- ✓ Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), Panreac 99,5%.
- ✓ Disolución Buffer, pH=7,00 (20°C), Scharlau.
- ✓ Hidróxido de sodio en lentejas (NaOH), Scharlau 99,0%.

### 3.2.-Materias primas utilizadas.

Las materias primas utilizadas son las que se exponen a continuación:

#### 3.2.1.-Biomasa a digerir.

##### 3.2.1.1.-Microalgas sin tratar.

Las especies estudiadas en este trabajo han sido cultivadas en las infraestructuras del Instituto Tecnológico de Canarias (ITC) en Pozo Izquierdo (Gran Canaria). El ITC trabaja con diversidad de especies, siendo las utilizadas para este trabajo *Chlorella s.p*, *Nannochloropsis s.p* y *Senedesmus s.p*. La *Nannochloropsis s.p* ha sido cultivada en medio marino, mientras que las otras dos especies son dulceacuícolas.

Las especies se recibieron liofilizadas y envasadas al vacío, una vez abierto el envase fue necesario mantenerlas en frío (4°C) y protegidas de la luz para evitar la oxidación de las mismas.

##### 3.2.1.2.-Residuos de microalgas procedentes del proceso de extracción lipídica.

Estos residuos proceden de la extracción de la fracción lipídica de las microalgas, que es donde se encuentran los triglicéridos que son los componentes principales para la producción del biodiesel mediante la reacción de transesterificación.

El procedimiento experimental para la obtención de dicho residuo, es la extracción, empleando un dispositivo extractor continuo tipo Soxhlet y metanol como disolvente orgánico.

Para este estudio se han empleado los residuos de extracción obtenidos en un trabajo de investigación anterior a este.

### **3.2.1.3.-Residuos de microalgas después de someterse al proceso de reacción de transesterificación *in situ*.**

En este caso la reacción de transesterificación se hace directamente sobre la biomasa, sin ninguna etapa previa de extracción.

A partir de este proceso se obtienen dos fases, una fase líquida que contiene los productos y subproductos de reacción, los reactivos en exceso y el catalizador empleado, además de una fase sólida que constituye los residuos de reacción.

Igual que en el caso de los residuos de extracción, los residuos de reacción que se han empleado en este trabajo han sido obtenidos en un estudio anterior a este.

### **3.2.2.-Inóculos empleados.**

#### **3.2.2.1.-Lodo anaerobio procedente de la depuración de aguas residuales.**

Este inóculo ha sido seleccionado como respuesta a la búsqueda de soluciones para favorecer la producción de las microalgas mediante co-digestión anaerobia. El lodo anaerobio que se ha empleado para llevar a cabo el estudio, ha sido cedido por el Grupo de Investigación de Tratamiento y Regeneración de Aguas Residuales de la Universidad de La Laguna y ha sido generado en una planta piloto de tratamiento de aguas residuales con reactores anaerobios de membrana situada en la localidad de Valle de Guerra (Tenerife).

Son varios autores que han estudiado el lodo anaerobio de depuradora como inóculo en procesos de co-digestión anaerobia con distintos tipos de residuos, dando como resultado una mejora en la producción de biogás con respecto al residuo solo (Olsson et al., 2013; Wang et al., 2013). Por este motivo se ha seleccionado el lodo anaerobio de depuradora como inóculo para este estudio.

### 3.2.2.2.-Gallinaza.

Este inóculo ha sido elegido por el gran volumen producido en explotaciones avícolas, por su alto poder contaminante y su elevado grado de biodegradabilidad, lo que hace que pueda resultar de interés el hecho de conocer su potencial para obtener biogás vía co-digestión anaerobia.

Su composición depende principalmente de la dieta y del sistema de alojamiento de las aves. Aunque no existe mucha bibliografía sobre este tipo de co-digestiones, por su naturaleza se intuye que la gallinaza podría favorecer la producción de biogás.

En este caso el estiércol de gallina o gallinaza proviene de un corral particular donde se ha recolectado manualmente y se ha almacenado en frascos plásticos estériles. Al ser obtenido de una explotación de corral particular, el estiércol se compone de una mezcla de deyecciones de las aves junto con material absorbente que puede ser viruta, pasto seco, cascarillas, residuos de alimentos, plumas entre otros.

## 3.3.-Co-digestiones anaerobias.

Las materias primas utilizadas se sometieron a un proceso de co-digestión anaerobia, con la finalidad de cuantificar cuantitativa y cualitativamente la calidad del biogás que podía ser generado por cada biodigestor.

### 3.3.1.-Procedimiento experimental para las co-digestiones anaerobias.

Las co-digestiones anaerobias siguieron el procedimiento experimental descrito por García-Peña et al. (2011). Se procedió a la realización de dos experimentos, el primero para la elección del inóculo más adecuado y el segundo para la producción del biogás a partir de la co-digestión de las microalgas y sus residuos con el inóculo seleccionado.

Los digestores consistieron en frascos de vidrio ámbar de 500 mL de volumen. En cada uno de los biodigestores se introdujo aproximadamente  $6 \pm 0,05$  g de biomasa a digerir, al que posteriormente se le añadieron 6 mL de disolución 1,5 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (equivalente a 0,8g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ /g de muestra) para proporcionar al medio una fuente de nitrógeno, 1,5 mL de disolución buffer y 50 mg de  $\text{CaCO}_3$  que actúan como tampón.

Para concluir con la preparación de los digestores se introdujo el inóculo (lodo anaerobio o gallinaza) en una relación inóculo:biomasa 1:1 en términos de sólidos volátiles (SV).

Los dos inóculos empleados eran de distinta naturaleza ya que el lodo anaerobio de depuradora era semisólido y la gallinaza era sólida. Cabe destacar que a los biodigestores con gallinaza se les añadió 250 mL de agua destilada, para favorecer a la homogenización de la mezcla y tener el medio acuoso necesario para el proceso de digestión anaerobia.

A continuación a cada biodigestor preparado se le añadió una píldora magnética que permitía la homogeneización del contenido. Una vez mezclado el contenido se ajustó el pH a valores de 7,50-8,50 con una disolución 4M de NaOH.

Para concluir con el montaje de los biodigestores se cerraron herméticamente con un septum de silicona dotado de un toma-muestras para el control rutinario de la calidad del gas producido y una salida con cierre todo-nada hacia el frasco volumétrico. Una vez sellado cada digestor se burbujeó N<sub>2</sub> durante 5 min con la salida al frasco en posición abierta, para desplazar el O<sub>2</sub> contenido en el digestor.

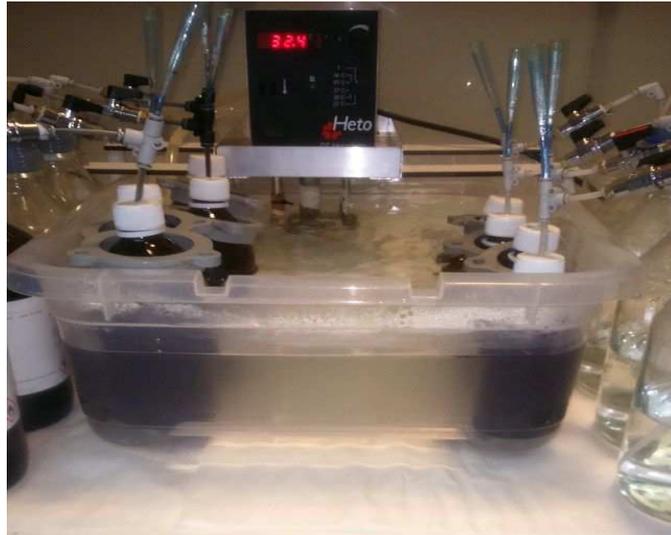
Cada digestor estaba a su vez conectado (siempre abierto) a un frasco volumétrico para hacer el control rutinario de la producción de gas en volumen por desplazamiento de líquido. Los frascos volumétricos se rellenaron con agua destilada acidulada con pH=2 para desplazar el equilibrio  $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$  hacia la izquierda. Cada frasco volumétrico era previamente burbujeado con N<sub>2</sub> durante 5 min para desplazar el O<sub>2</sub> contenido en la cámara de gas.

Para mantener la temperatura del proceso constante todos los digestores se mantuvieron en el interior de un baño termostático a 31,5°C para asegurar las condiciones mesofílicas. Los frascos volumétricos se situaron fuera del baño termostático y cada uno estaba dotado con una descarga atmosférica a un recipiente de desechos, donde el agua acidificada era recuperada para ser reutilizada.

Cada día se hacía la agitación manual de cada digestor, para posteriormente hacer una lectura de volumen desplazado para determinar la producción de gas y una toma de muestra gaseosa para análisis cromatográfico cualitativo. Además se tomaron medidas de presión y temperatura ambientales para normalizar los datos de volumen.

Tanto en el estudio para la elección del inóculo más apropiado como en las co-digestiones de los residuos de microalgas se hizo un montaje de un blanco, que consistía en el mismo montaje que para el resto de los digestores pero sin incluir la biomasa, para así poder evaluar el comportamiento del inóculo de forma aislada.

Para todas las digestiones con los diferentes tipos de microalga se realizaron duplicados. En el caso del estudio para la elección del inóculo no se montaron duplicados.



**Figura 3.1.-** Montaje experimental de los biodigestores.

### **3.3.2.-Cuantificación de la producción de gas y sus componentes en las digestiones anaerobias.**

La producción de gas en los digestores se refiere a la cantidad (NL/kg de residuo) de gas que se produce en el proceso de la digestión anaerobia.

Para determinar la producción de gas se hizo por lectura directa del volumen en la escala del frasco volumétrico. Ese mismo volumen también era necesario para determinar la producción por componente en el digestor. Para el análisis cualitativo era necesario tomar una muestra de 0,5 mL de gas del interior del digestor para someterla a análisis cromatográfico descrito en el punto 3.5

A partir del cromatograma obtenido para la muestra analizada se podía conocer su contenido porcentual en O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO y CO<sub>2</sub>. Aplicando estos porcentajes al cálculo de la producción de gas tenemos la siguiente ecuación:

$$\text{Producción de componente (NL componente/kg de residuo)} = \frac{\text{VT} * \%C}{\text{PR} * 100} \quad [3.1]$$

Donde:

**VT:** Volumen total de la mezcla de gases producidos en el digestor en condiciones normales.

**PR:** Peso del residuo de microalgas en el digestor (kg).

**%C:** Porcentaje del componente a cuantificar en la mezcla del digestor en %.

La producción total de gas en los digestores se define como la suma de la producción de cada componente en la mezcla.

### **3.4.-Caracterización de los inóculos y de los residuos de las microalgas antes y después de las co-digestiones.**

#### **3.4.1.-Procedimiento experimental para la determinación de los Sólidos Totales, Fijos y Volátiles en muestras sólidas y semisólidas.**

El procedimiento experimental empleado es el descrito como método normalizado para la determinación de Sólidos Totales (ST), Sólidos Fijos (SF) y Sólidos Volátiles (SV) en muestras sólidas y semisólidas (APHA, et al 1992).

El término ST se aplica a los residuos de material que quedan en un recipiente después de la evaporación de la muestra y su consecutivo secado en estufa a temperatura definida. El término SF se aplica al residuo de ST después de someterse a ignición durante un tiempo determinado a una temperatura especificada. La pérdida de peso por ignición se debe a los SV.

Se realizaron dos procedimientos experimentales distintos, en función de si las muestras de partida eran sólidas (en el caso de las microalgas y sus residuos sólidos) o líquidas (licor de mezcla en los digestores). Para muestras sólidas se partió de 1 g de muestra mientras que para muestras líquidas se partió de 2 mL de muestra.

Se colocó la muestra en una cápsula de porcelana previamente pesada (A) y se mantuvo durante 24 h a 103-105°C en estufa. Pasado ese tiempo se dejó enfriar la muestra en un desecador para luego ser pesada (B).

Después se calcinó durante 1 h a  $550 \pm 50^\circ\text{C}$  en una mufla partiendo del equipo en frío.

Pasado este tiempo se dejó enfriar la muestra en un desecador para volver a ser pesada(C).

### 3.4.2.-Cuantificación de los Sólidos Totales, Fijos y Volátiles en muestras sólidas y semisólidas.

Para la cuantificación de los distintos tipos de sólidos tenemos las ecuaciones descritas a continuación:

Para las muestras sólidas (gallinaza y residuos de microalgas):

$$\text{ST (\% peso sobre residuo)} = \frac{(B-A)}{PM} * 100 \quad [3.2]$$

Para las muestras semisólidas (contenido de los digestores):

$$\text{ST (\% peso sobre residuo)} = \frac{(B-A) * V \text{ digestor}}{V \text{ muestra} * PR} * 100 \quad [3.3]$$

Para la caracterización del lodo anaerobio:

$$\text{ST (g sólidos / mL lodo)} = \frac{(B-A)}{V \text{ muestra}} \quad [3.4]$$

Para todas las muestras:

$$\text{SF (\% peso sobre totales)} = \frac{(C-A)}{(B-A)} * 100 \quad [3.5]$$

$$\text{SV (\% peso sobre totales)} = \frac{(C-B)}{(B-A)} * 100 \quad [3.6]$$

Donde:

**A:** Peso de la cápsula vacía (g).

**B:** Peso de la cápsula con la muestra después de secarse en la estufa (g).

**C:** Peso de la cápsula con la muestra después de calcinarse en la mufla (g).

**PM:** Peso de muestra sólida en la cápsula (g).

**V digestor:** Volumen total del licor mezcla del digestor (mL).

**V muestra:** Volumen de la muestra en la cápsula (mL).

**PR:** Peso inicial de residuo a digerir en el digestor (g).

### 3.4.3.-Determinación del pH en los digestores.

La medida de pH se basa en la capacidad de respuesta del electrodo ante soluciones de diferente actividad de iones  $H^+$ , dando a conocer así su nivel de acidez o de basicidad. La fuerza electromotriz producida en el electrodo varía linealmente con el pH del medio. El pH es uno de los factores que en mayor medida condicionan la evolución de los tratamientos anaerobios a causa de su efecto sobre la actividad microbiana ([www.medidordeph.com](http://www.medidordeph.com)).

Una correcta medida del pH implica la calibración periódica del conjunto instrumento-electrodo con disoluciones tampón. De este modo se compensan las desviaciones del potencial de asimetría y de la pendiente que el electrodo experimenta en el tiempo.

El análisis se lleva a cabo empleando un pH-metro (pH-meter Basic 20, CRISON) dotado con una sonda de pH y temperatura (CRISON 50 14 T), apto para un rango de pH de 0- 14 y de temperatura 10- 100°C. Este equipo puede realizar la calibración en tres puntos, cuyos parámetros quedan almacenados en la memoria hasta que se efectuó una nueva calibración.

Inicialmente se procede a la realización de la calibración del instrumento para corregir el potencial de asimetría y la pérdida de sensibilidad del electrodo. Seguidamente se debe controlar el nivel de electrolito de referencia y rellenarlo si es preciso, mediante una disolución determinada Crisolylt de KCl 3M. Antes de realizar la medida del pH se homogeniza el contenido de los digestores mediante agitación magnética. Una vez agitada la muestra se coloca el electrodo en contacto directo con el contenido de los digestores y se toma la medida por estabilidad.

Cabe destacar que la lectura se puede hacer por estabilidad o en continuo. En la primera no se fija en pantalla la lectura hasta que la señal del electrodo varía menos de 0,01 pH (0,5

mV) durante 6 seg y la segunda el instrumento ofrece directamente en pantalla el valor medido por el electrodo en todo momento.

Uno de los parámetros de control de evolución de las digestiones anaerobias es el pH, ya que los microorganismos que realizan la descomposición son altamente sensibles a él. Antes de comenzar el proceso de digestión se midió el pH del conjunto y se ajustó a valores entre 7,8- 8,5 con una disolución de 4M de NaOH. Al detenerse la producción de gases en los digestores se hizo un segundo control de pH.

#### **3.4.4.-Determinación de la conductividad en los digestores.**

La conductividad de una disolución es la medida de su capacidad para conducir la corriente eléctrica y se expresa habitualmente en  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . La medida se basa en el principio de Whatstone (mide resistencias desconocida mediante el equilibrio de los brazos del puente).

La determinación de conductividad es una técnica sencilla, de gran sensibilidad, de respuesta rápida y de poco mantenimiento, por lo que es una técnica ampliamente difundida para las determinaciones del control de calidad.

La conductividad en medios líquidos, está relacionada con la presencia de sales en solución, cuya disociación genera iones positivos y negativos capaces de transportar la energía eléctrica si se somete el líquido a un campo eléctrico. Estos conductores iónicos se denominan electrolitos o conductores electrolíticos.

La confiabilidad y exactitud de las medidas dependen de varios factores, entre los que se encuentran: la concentración y la movilidad de los iones, la presencia de compuestos orgánicos tales como alcoholes y azúcares, la valencia de los iones y la temperatura ([www.quirumed.com](http://www.quirumed.com)).

Para el análisis de estas muestras se emplea un conductímetro (conductímetro GLP31, CRISON) que está dotado con un electrodo de platino. Al no existir células que permitan medir toda la escala de conductividad con precisión suficiente, se fabrican electrodos de diferente constante que permiten realizar distintas medidas exactas a diferentes escalas. El electrodo utilizado en este caso es el universal de 1 cm, ya que permite medir desde conductividades relativamente bajas a conductividades relativamente altas.

Una vez calibrado, si la muestra está caliente es necesario disminuirle la temperatura hasta aproximadamente 25°C que es la temperatura de referencia del GLP 31. La muestra

debe estar agitada para aumentar la rapidez de respuesta y la reproducibilidad de la misma. Teniendo en cuenta dichos factores se introduce el electrodo en la muestra y se espera hasta que la lectura se estabilice.

Es un parámetro que se ha de controlar durante el proceso anaerobio, debido a que el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se puede considerar como inhibidor si se encuentra a elevadas concentraciones reduciendo la productividad metanogénica y el posible cese de producción de metano. Esta medida se realizó al inicio y al finalizar las co-digestiones.

### **3.5.-Técnicas analíticas.**

A continuación se describen las técnicas analíticas empleadas en este estudio.

#### **3.5.1.-Técnicas cromatográficas. Cromatografía de gases.**

La cromatografía es un conjunto de técnicas muy utilizadas que permiten separar, identificar y determinar los componentes químicos de muestras complejas, cabe señalar que ninguna otra técnica es tan potente y de aplicación tan general.

El funcionamiento es simple, la muestra se desplaza con una fase móvil (gas, líquido o fluido supercrítico), dicha fase se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se fija a una columna o superficie sólida en la cual se produce la separación de los componentes de la muestra, es decir, los componentes son retenidos con distinta afinidad por la fase estacionaria lo que hace que avancen en la fase móvil a distinta velocidad a lo largo de la columna realizando la separación. Con la finalidad de que la separación sea lo más rápida y eficiente, las fases se han de seleccionar teniendo en cuenta que los componentes de la muestra se distribuyan de distinta forma entre las dos fases. Como consecuencia los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas que pueden analizarse cualitativamente y cuantitativamente. (Skoog et al., 2001).

##### **3.3.1.1.-Análisis de las muestras mediante cromatografía de gases TCD**

En este estudio la separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases (GC, Agilent Technologies) dotado con un detector de conductividad térmica (TCD) y un inyector *split/splitless*. La separación cromatográfica se hizo empleando un sistema que contiene dos columnas en paralelo (Agilent CP7429 Select Permanent Gases/ $\text{CO}_2$ ) donde en la primera columna (CP-molsieve 5Å (30m, 0,53 mm DI, 0,53  $\mu\text{m}$ )) se produce la separación

del O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> mientras que en la segunda (CP-PoraBond Q, empaquetada), se produce la separación del aire, CO, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. El equipo estaba conectado a un ordenador para el procesamiento de los datos mediante el software de análisis y control OpenLab CDS ChemStation. El inyector se programó a una temperatura de 175 °C y una presión de 9 psi. La inyección de muestra se realizó en modo *split*, con una relación 5:1 y un volumen de inyección de muestra 0,5 mL. El detector se programó a una temperatura de 180°C con un caudal de referencia de 36 mL/min y un caudal de “*make up*” de 2 mL/min. El horno estaba programado para trabajar a una temperatura constante de 40 °C. El gas empleado por el equipo como fase móvil era helio.



## **4.-RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN**



En el presente Trabajo Fin de Grado se han estudiado el lodo anaerobio de depuradora y la gallinaza como inóculos en la co-digestión anaerobia con distintos tipos de residuos de microalgas, con la finalidad de valorización de los mismos mediante la producción de biogás.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos para la selección del inóculo más favorable y, además, la producción y composición del biogás obtenido en las co-digestiones de los distintos tipos de residuos de microalgas con el inóculo seleccionado previamente.

#### **4.1.-Caracterización de los residuos a emplear como biomasa de partida en las co-digestiones.**

Para la realización de la digestión anaerobia de las microalgas con los inóculos es necesario caracterizar cada uno de los residuos de partida para conocer la cantidad de lodo anaerobio de depuradora y de gallinaza que se debe introducir en cada biodigestor, respetando la relación 1:1 (SV de microalga/ SV de inóculo), con la que se ha decidido trabajar después de la búsqueda bibliográfica.

##### **4.1.1.-Caracterización de las microalgas y sus residuos.**

Los datos de caracterización de las microalgas y sus residuos se obtuvieron como parte de un estudio anterior al trabajo aquí descrito y se presentan en la tabla 4.1, donde aparece el contenido en sólidos totales (ST), sólidos fijos (SF) y sólidos volátiles (SV).

Cada especie de microalga se identifica con su inicial y cada tipo de residuo de la siguiente manera:

**C:** *Chlorella sp.*

**N:** *Nannochloropsis sp.*

**S:** *Scenedesmus sp.*

**MS:** Microalgas sin tratar.

**RE:** Residuos de microalgas generados en proceso de extracción de lípidos.

**RR:** Residuos de microalgas generados en el proceso de reacción de transesterificación *in situ*.

**Tabla 4.1.-Contenido en sólidos de las microalgas y sus residuos.**

| Tipo de residuo | Especie | ST (% peso sobre biomasa) | SV (% ST) | SF (% ST) |
|-----------------|---------|---------------------------|-----------|-----------|
| MS              | C       | 93,86                     | 95,56     | 4,44      |
|                 | N       | 95,12                     | 79,19     | 20,81     |
|                 | S       | 95,40                     | 91,40     | 8,60      |
| RE              | C       | 97,18                     | 89,16     | 10,84     |
|                 | N       | 96,28                     | 79,21     | 20,79     |
|                 | S       | 98,38                     | 93,12     | 6,88      |
| RR              | C       | 93,91                     | 96,82     | 3,18      |
|                 | N       | 94,92                     | 81,78     | 18,22     |
|                 | S       | 93,50                     | 95,64     | 4,36      |

#### 4.1.2.-Caracterización del lodo anaerobio de depuradora.

En la tabla 4.2 aparecen tabulados los datos obtenidos en la caracterización del lodo anaerobio, mediante las ecuaciones [3.4 a 3.6] para el cálculo de los ST, SF y SV respectivamente, que se ha expuesto en el apartado 3.4.2 de materiales y métodos.

**Tabla 4.2.-Contenido en sólidos del lodo anaerobio.**

|                |                      |
|----------------|----------------------|
| ST (g/mL lodo) | $2,00 \cdot 10^{-2}$ |
| SF (%ST)       | 18,12                |
| SV (%ST)       | 81,88                |

Como característica diferenciadora, el lodo anaerobio está en estado líquido, presentándose como una solución con alto contenido en sólidos en suspensión, es por esto que se presentan los datos de la tabla 4.2 como g ST/mL lodo.

### 4.1.3.-Caracterización de la gallinaza.

Análogamente se realiza el mismo proceso que en la caracterización del lodo anaerobio para la caracterización de la gallinaza. De tal manera que se utilizan las ecuaciones [3.2], [3.5] y [3.6] descritas en el apartado 3.4.2 de materiales y métodos. De esta forma se expone en la tabla 4.3 los ST, SF y SV de la gallinaza, cuyos resultados obtenidos se utilizarán para la adición de la gallinaza en el digestor.

| <b>Tabla 4.3.-Contenido en sólidos de la gallinaza.</b> |       |
|---|-------|
| <b>ST (%en peso sobre gallinaza)</b>                    | 43,95 |
| <b>SF (%ST)</b>   | 38,16 |
| <b>SV (%ST)</b>   | 61,84 |

En este caso la gallinaza está en estado sólido, presentándose como una pasta no homogénea muy hidratada, es por esto que se presentan los datos de ST de la tabla 4.3 como % en peso sobre gallinaza.

### 4.2.-Estudio preliminar. Elección del inóculo para la co-digestión.

En este apartado se presentan los resultados correspondientes a las pruebas iniciales, para identificar cual sería el inóculo apropiado para la producción de biogás. Los inóculos estudiados han sido el lodo anaerobio de depuradora y la gallinaza.

Para este estudio se decidió emplear solamente las MS como biomasa a digerir por cuestión de disponibilidad y porque, en función de los resultados obtenidos en trabajos anteriores, se consideró la biomasa más adecuada.

Los resultados están expuestos como datos acumulados de producción. Hay que puntualizar que, al ser un estudio previo, no se montaron duplicados de los digestores.

La producción de gas total en los blancos se consideró en términos de NL/kg de biomasa teórica, entendiéndose estas unidades como la producción de gas total dividida por el

peso teórico de MS que le correspondería a esa cantidad de inóculo considerando la relación 1:1 (SV de microalga/ SV de inóculo).

En las figuras 4.1 se presentan los resultados obtenidos para las co-digestiones del lodo anaerobio de depuradora con las MS y el blanco (B).

Hay que destacar que el digestor correspondiente a la especie *Nannochloropsis sp.* se perdió por falta de estanqueidad en la instalación experimental. Se decidió no volver a montarlo porque con el resto de digestores ya se podía obtener la información necesaria para decidir cuál era el inóculo más apropiado.

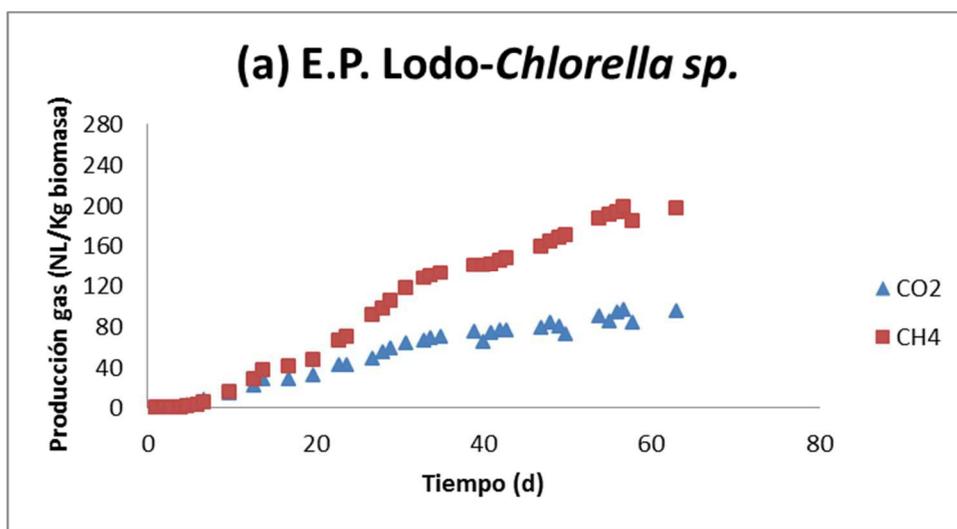


Figura 4.1 (a).-Producción gas (NL/Kg biomasa). Estudio previo Lodo-*Chlorella sp.*

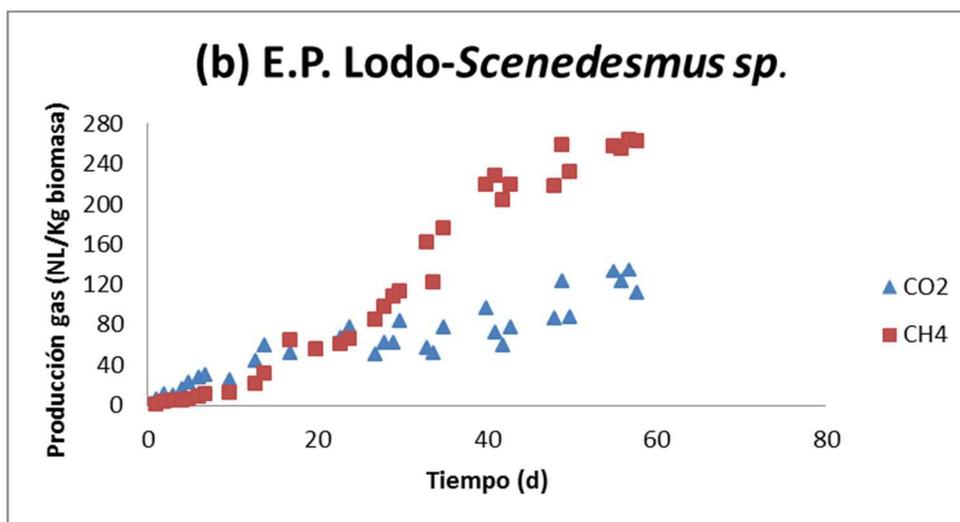
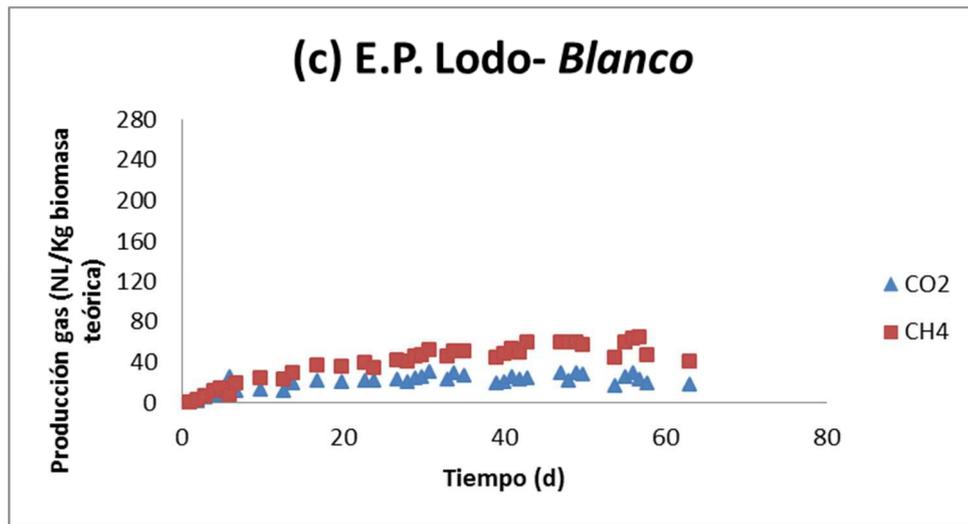


Figura 4.1 (b).-Producción gas (NL/Kg biomasa). Estudio previo Lodo-*Scenedesmus sp.*



**Figura 4.1 (c).**-Producción gas (NL/Kg biomasa). Estudio previo Lodo-Blanco.

En las gráficas expuestas en las figuras 4.1 se observa como la co-digestión de las MS con el lodo anaerobio presentan una mayor producción tanto de CO<sub>2</sub> como de CH<sub>4</sub> en comparación con los datos obtenidos para el blanco del lodo anaerobio. Este comportamiento es independiente de la especie de microalga.

De las dos especies para las que se obtuvieron resultados es *Scenedesmus sp.* la que presentó mayor producción de gas.

Tanto las co-digestiones como el blanco produjeron una mezcla de gases con composición de biogás, siendo los valores medios finales de % CH<sub>4</sub> en volumen de un 68,08% en el caso de la co-digestión Lodo-C, un 67,76% en el caso del Lodo-S y de un 69,74% en el caso del blanco.

En las figuras 4.2 se presentan los resultados obtenidos para las co-digestiones de la gallinaza con las MS y el blanco.

En las gráficas expuestas en la figura 4.2 se observa como la co-digestión de las MS con la gallinaza presenta una peor producción de gas tanto en términos cualitativos como cuantitativos, en comparación con el blanco. Este comportamiento es independiente de la especie de microalga.

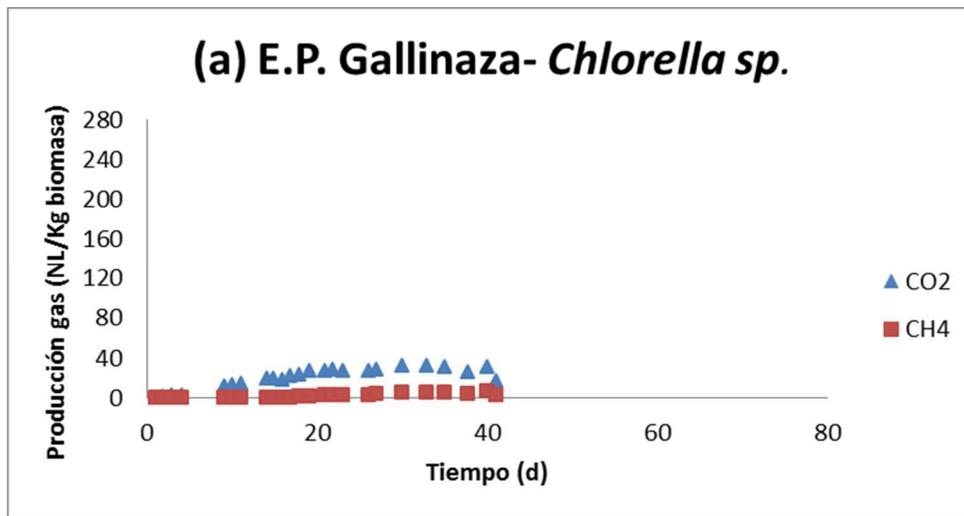


Figura 4.2 (a).-Producción gas (NL/Kg biomasa). Estudio previo Gallinaza-*Chlorella sp.*

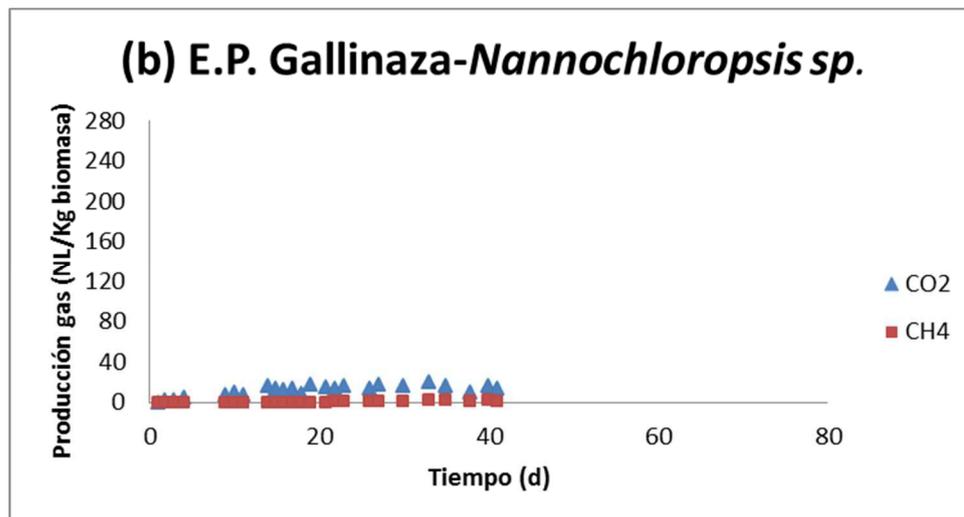


Figura 4.2 (b).-Producción gas (NL/Kg biomasa). Estudio previo Gallinaza-*Nannochloropsis sp.*

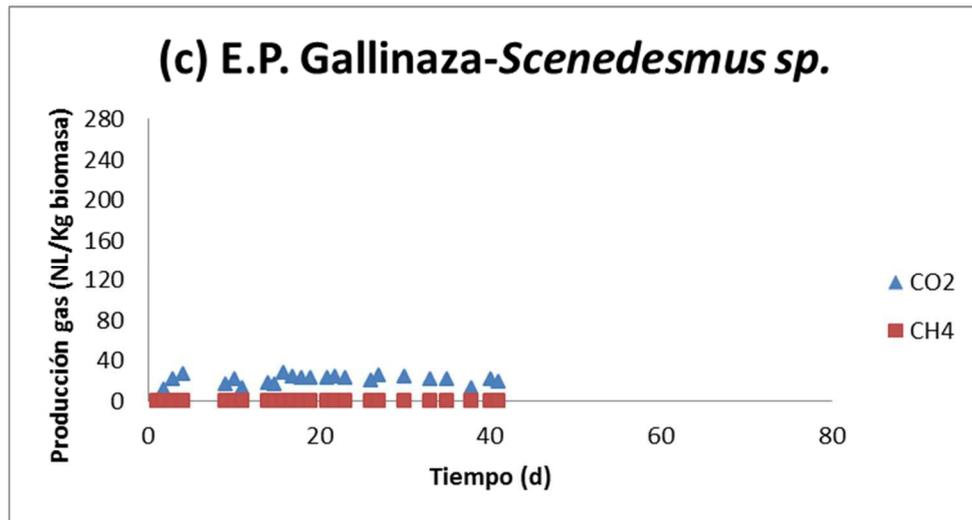


Figura 4.2 (c).-Producción gas (NL/Kg biomasa). Estudio previo Gallinaza-*Scenedesmus sp.*

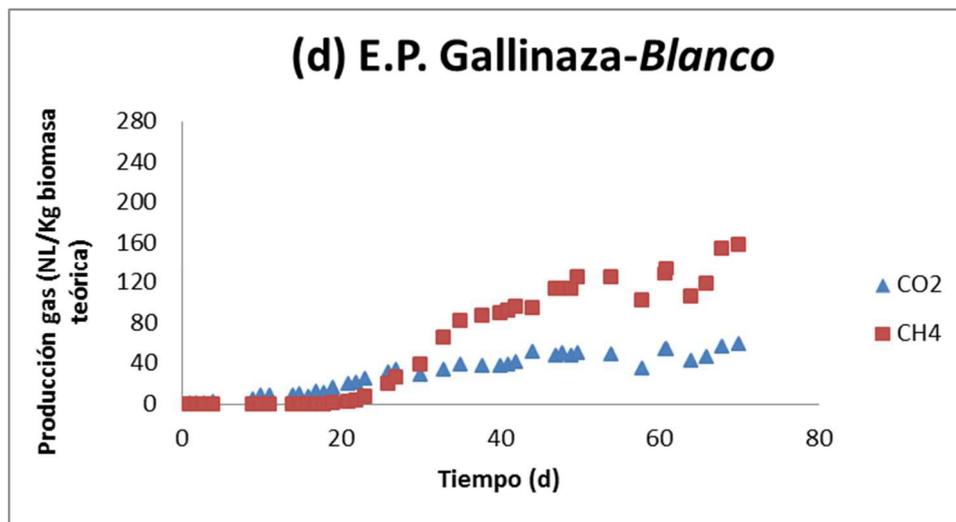


Figura 4.2 (d).-Producción gas (NL/Kg biomasa). Estudio previo Gallinaza-Blanco.

Las co-digestiones produjeron una mezcla de gases, siendo los valores medios finales de %  $\text{CH}_4$  en volumen de un 12,02% en el caso de la co-digestión Gallinaza-C, un 9,32% en el caso de la Gallinaza-N y un 1,03% en el caso de la Gallinaza-S. Como se puede observar para ninguna de las especies se consigue producir biogás, siendo *Scenedesmus sp.* la especie donde la falta de producción de  $\text{CH}_4$  es la más acusada. En el caso del blanco el valor final de producción es de un 71,96% de  $\text{CH}_4$ , es decir, se produjo una mezcla de gases con calidad de biogás.

Comparando la evolución de los blancos de los dos inóculos estudiados (figura 4.1(c) y figura 4.2 (d)) se observa que en el caso de la gallinaza el digester tarda aproximadamente 17 días en comenzar a producir  $\text{CH}_4$  mientras que en el caso del lodo anaerobio la producción de

CH<sub>4</sub> se observa desde el primer día. Este comportamiento se debe a que el lodo anaerobio está preparado para las condiciones de digestión mientras que la gallinaza necesitaría ser aclimatada.

Por tanto se concluye que el lodo anaerobio de depuradora es el inóculo más apropiado para la co-digestión con las microalgas, tanto por los niveles de producción alcanzados como por la calidad del gas producido.

### **4.3.-Producción de gas y sus componentes en la co-digestión de las microalgas y sus residuos.**

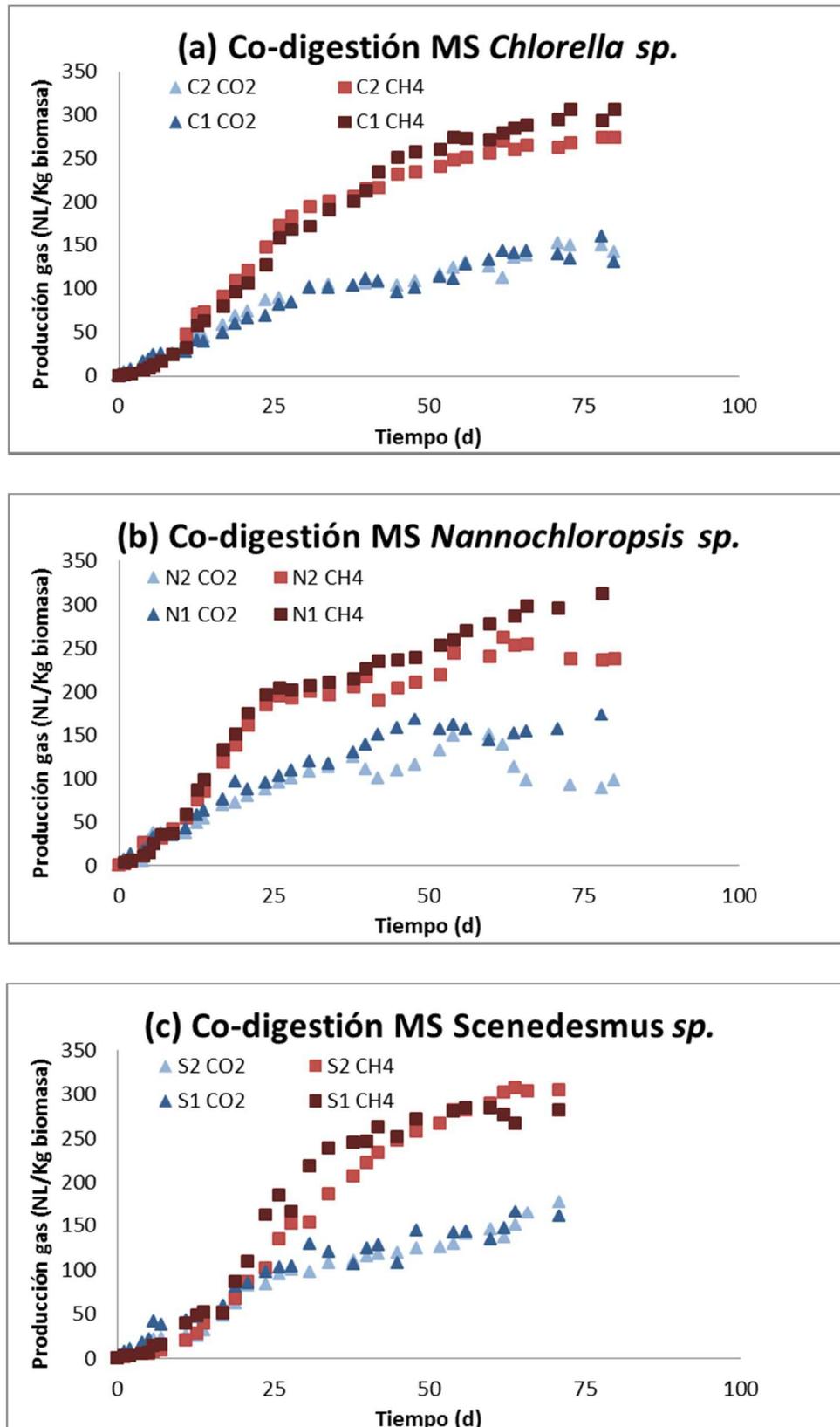
En esta sección se analiza la producción cuantitativa y cualitativa de gas para cada una de las especies de microalgas y sus residuos. Con el objetivo de hacer un estudio comparativo se ha repetido la co-digestión de las MS y el lodo anaerobio, para poder evaluar la reproducibilidad de los experimentos y la co-digestión en el caso de la especie *Nannochloropsis sp.*, ya que no se pudo tener en cuenta en el estudio previo por problemas en el desarrollo del experimento.

Todas las digestiones se han realizado por duplicado. Los resultados están expuestos como datos acumulados de producción.

#### **4.3.1.-Digestores con microalgas sin tratar.**

A continuación se muestran las gráficas (figura 4.3) de las producciones acumuladas de gas en los biodigestores de las MS. Si analizamos las gráficas por especies se observa que la reproducibilidad de los experimentos fue alta a pesar de la naturaleza heterogénea de las muestras.

Como se observa en la figura 4.3 todas las gráficas presentan la misma evolución en la producción de gas comenzando por una etapa de iniciación caracterizada con una velocidad de producción baja, seguida de una etapa de velocidad de producción máxima para, finalmente, llegar a una etapa de estabilización donde la velocidad de producción baja drásticamente hasta hacerse nula. En el caso de la especie *Chlorella sp.* las curvas resultantes tienen una forma más suavizada que para el resto de especies.



**Figura 4.3.-** Producción de gas (NL/Kg biomasa) en la co-digestión de las MS con lodo anaerobio siendo: (a) MS-*Chlorella sp.*, (b) MS- *Nannochloropsis sp.*, (c) MS-*Scenedesmus sp.*

En todos los casos el gas que se produjo tenía calidad de biogás (>50%CH<sub>4</sub>).

Por otra parte los niveles de producción total alcanzados fueron similares para todas las especies estudiadas, siendo *Scenedesmus sp.* la especie que presenta mayor producción total de gas (436,05 NL/kg de MS), teniendo en cuenta el valor medio de los duplicados. La especie con menor producción fue *Chlorella sp.* (396,61 NL/kg de MS).

#### 4.3.2.-Digestores con residuos del proceso de extracción lipídica.

A continuación se muestran las gráficas de las producciones acumuladas de gas en los biodigestores con residuo del proceso de extracción lipídica (RE).

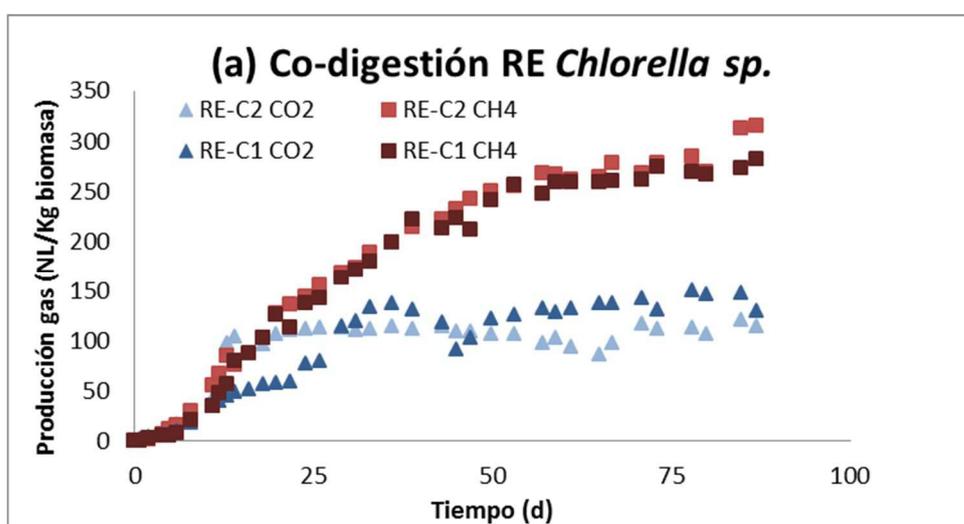


Figura 4.4 (a).-Producción de gas (NL/Kg biomasa). Co-digestión RE-*Chlorella sp.*

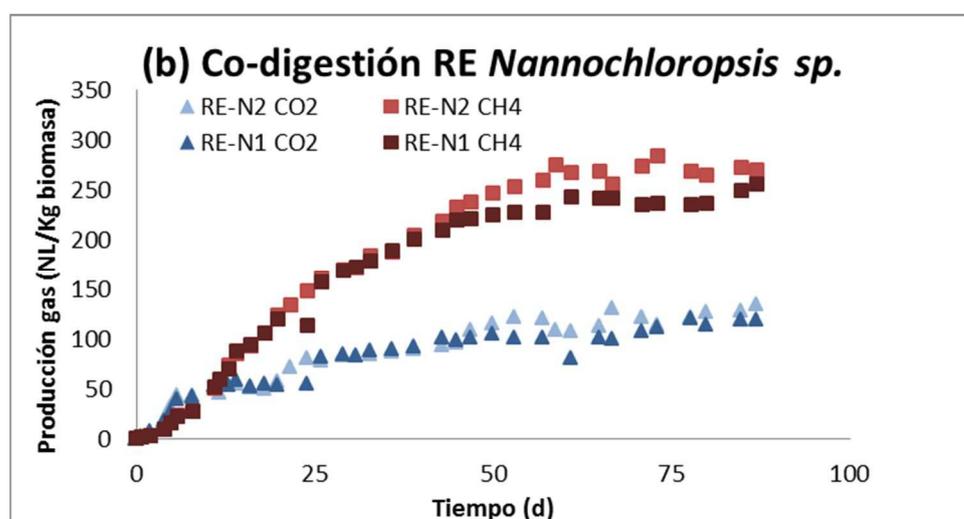
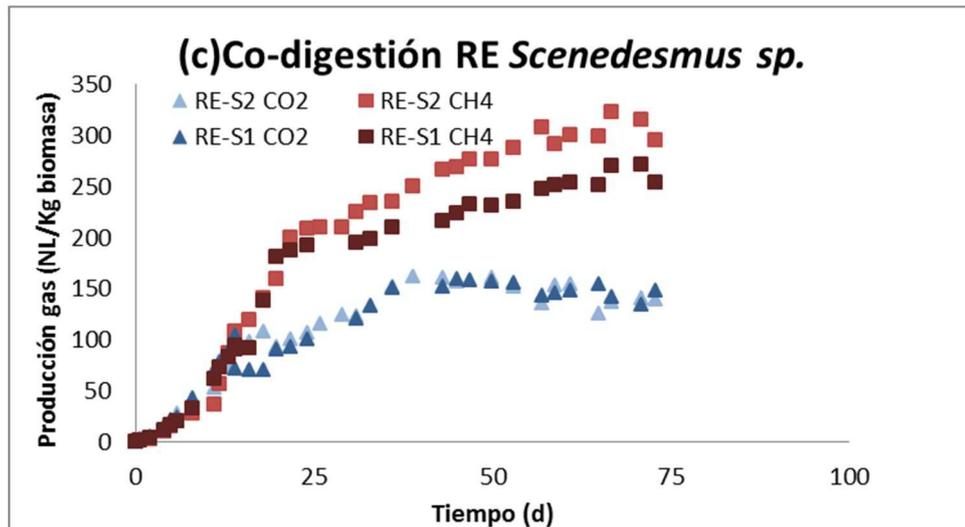


Figura 4.4 (b).-Producción de gas (NL/Kg biomasa). Co-digestión RE-*Nannochloropsis sp.*



**Figura 4.4 (c).**-Producción de gas (NL/Kg biomasa). Co-digestión RE-*Scenedesmus sp.*

Si analizamos las figuras por especies se observa que la reproducibilidad de los experimentos fue alta a pesar de la naturaleza heterogénea de las muestras.

Como se observa en las figuras 4.4 todas las gráficas presentan la misma evolución en la producción de gas igual que ocurría en las MS. Aunque en el caso de los RE la evolución de las curvas es más suave que para las MS.

En todos los casos el gas que se produjo tenía calidad de biogás (>50% CH<sub>4</sub>).

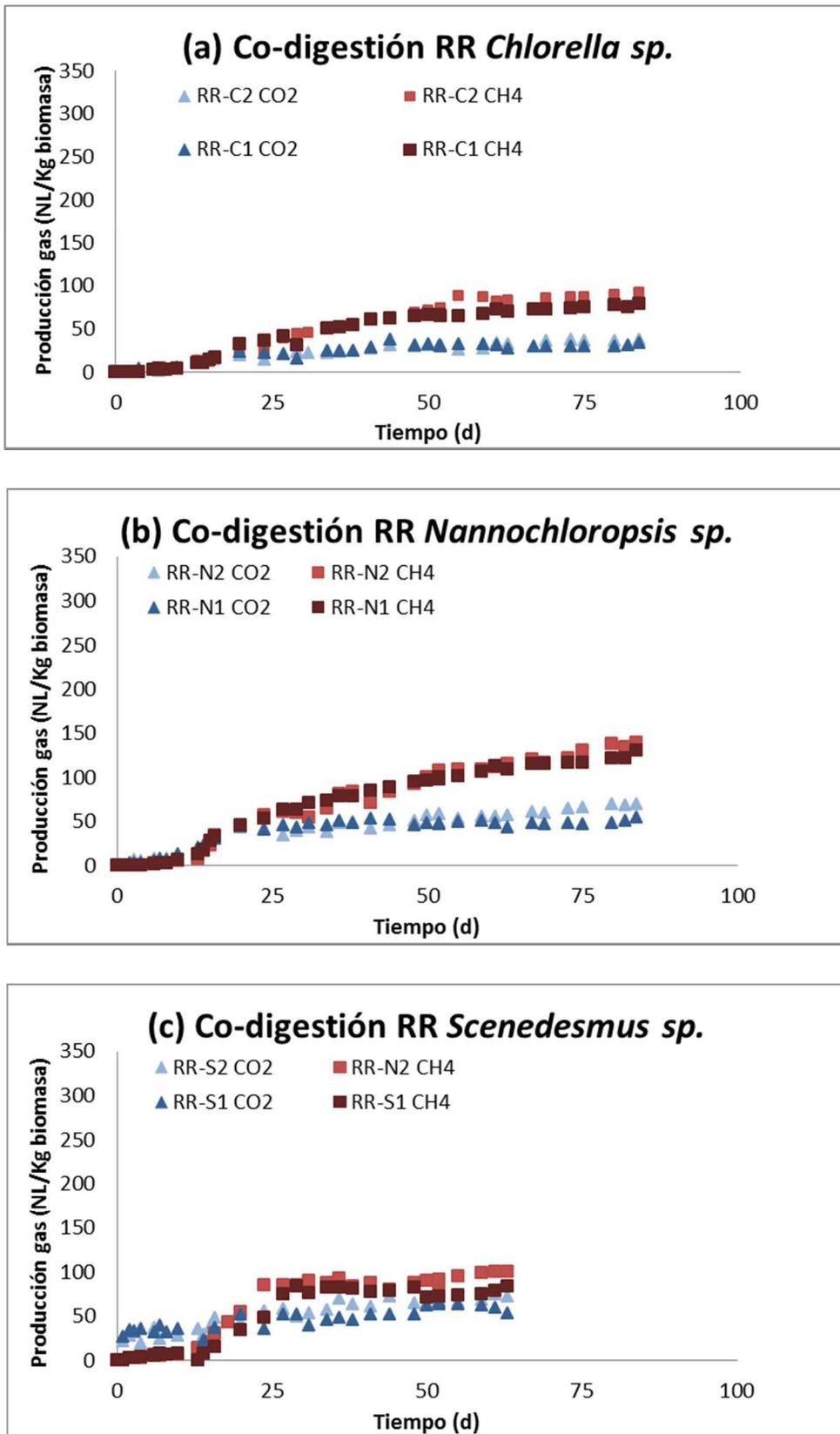
Por otra parte los niveles de producción total alcanzados fueron similares para todos los RE de las especies estudiadas, siendo *Scenedesmus sp.* la especie que presenta mayor producción total de gas (422,62 NL/kg de RE), teniendo en cuenta el valor medio de los duplicados. La especie con menor producción fue *Chlorella sp.* (385,56 NL/kg de RE).

#### 4.3.3.-Digestores con residuos del proceso de reacción *in situ*.

A continuación se muestran las gráficas (figura 4.5) de las producciones acumuladas de gas en los biodigestores con los residuos del proceso de reacción *in situ* (RR).

Si analizamos las figuras por especies se observa que la reproducibilidad de los duplicados fue alta a pesar de la naturaleza heterogénea de las muestras.

En este caso la producción de gas para los RR de la especie *Scenedesmus sp.* se detuvo a los 60 días por lo que se desmontaron los biodigestores antes que los RR de las otras dos especies de microalgas.



**Figura 4.5.-**Producción de gas (NL/Kg biomasa) en la co-digestión de los RR con lodo anaerobio siendo: (a) RR-*Chlorella sp.*, (b) RR-*Nannochloropsis sp.*, (c) RR-*Scenedesmus sp.*

Como se observa en la figura 4.5 todas las gráficas presentan la misma evolución en la producción de gas. En este caso la etapa de velocidad máxima de producción es la más corta comparándola con la de las MS y los RE, por lo que las curvas presentan un tendencia mucho más suavizada para las tres especies estudiadas.

En todos los casos el gas que se produjo tenía calidad de biogás (>50%CH<sub>4</sub>).

Por otra parte los niveles de producción total alcanzados fueron muy inferiores con respecto a las MS y los RE siendo *Nannochloropsis sp.* la especie con mayor producción total con un valor medio de 165,00 NL/kg de RR. La especie que menor producción total de gas presentó fue *Chlorella sp.* (111,49 NL/kg de RR).

En cuanto a la composición del biogás producido son los RR de la especie *Scenedesmus sp.* los que presentan el menor contenido en CH<sub>4</sub> de todos los residuos estudiados (56,82%), siendo su calidad igualmente aceptable.

#### **4.3.4.-Comparativa de los resultados en función de la biomasa empleada en la digestión.**

En un trabajo previo a este Trabajo de Fin de Grado se estudió la digestión anaerobia de las microalgas y sus residuos sin emplear ningún inóculo.

En las condiciones de dicho estudio se observó que la producción de gas se limitó al CO<sub>2</sub>. Por otra parte, las digestiones de los residuos de extracción fueron las que más producción de gas tuvieron, siendo la especie *Scenedesmus sp.* la que mejor resultados de producción de CO<sub>2</sub> proporcionó (56,8 NL/kg residuo). Los resultados de producción total y la composición del gas producido fueron indicativos de inhibición en los digestores.

En la tabla 4.4 se muestran de forma resumida los resultados de producción total y composición de gas obtenidos en las co-digestiones de las microalgas y sus residuos con el lodo anaerobio.

**Tabla 4.4.-Análisis de Sólidos Totales, Fijos y Volátiles al inicio y al finalizar la co-digestión.**

| Muestra | Producción Total de gas (NL/kg de biomasa) | %CH <sub>4</sub> | %CO <sub>2</sub> | PROMEDIO                                   |                  |                  |
|---------|--|------------------|------------------|--|------------------|------------------|
|         |  |                  |                  | Producción Total de gas (NL/kg de biomasa) | %CH <sub>4</sub> | %CO <sub>2</sub> |
| MS-C1   | 407,50                                     | 68,78            | 31,22            | 397,61                                     | 67,63            | 32,37            |
| MS-C2   | 387,71                                     | 66,48            | 33,52            |  |                  |                  |
| RE-C1   | 391,51                                     | 66,06            | 33,94            | 385,56                                     | 69,17            | 30,83            |
| RE-C2   | 379,62                                     | 72,28            | 27,72            |  |                  |                  |
| RR-C1   | 103,50                                     | 70,00            | 30,00            | 111,49                                     | 70,87            | 29,13            |
| RR-C2   | 119,48                                     | 71,74            | 28,26            |  |                  |                  |
| MS-N1   | 448,34                                     | 65,36            | 34,64            | 399,48                                     | 67,87            | 32,15            |
| MS-N2   | 350,63                                     | 70,34            | 29,66            |  |                  |                  |
| RE-N1   | 356,47                                     | 67,62            | 32,38            | 376,43                                     | 68,11            | 31,89            |
| RE-N2   | 396,39                                     | 68,60            | 31,40            |  |                  |                  |
| RR-N1   | 165,00                                     | 70,46            | 29,54            | 175,56                                     | 68,38            | 31,62            |
| RR-N2   | 186,12                                     | 66,30            | 33,70            |  |                  |                  |
| MS-S1   | 427,43                                     | 65,22            | 34,78            | 436,05                                     | 65,86            | 34,15            |
| MS-S2   | 444,68                                     | 66,49            | 33,51            |  |                  |                  |
| RE-S1   | 401,14                                     | 64,03            | 35,97            | 422,62                                     | 66,26            | 33,74            |
| RE-S2   | 444,10                                     | 68,49            | 31,51            |  |                  |                  |
| RR-S1   | 135,57                                     | 56,25            | 43,75            | 147,49                                     | 56,82            | 43,18            |
| RR-S2   | 159,41                                     | 57,39            | 42,61            |  |                  |                  |
| B1      | 196,36                                     | 67,93            | 32,07            | 193,53                                     | 67,46            | 32,54            |
| B2      | 190,71                                     | 67,00            | 33,00            |  |                  |                  |

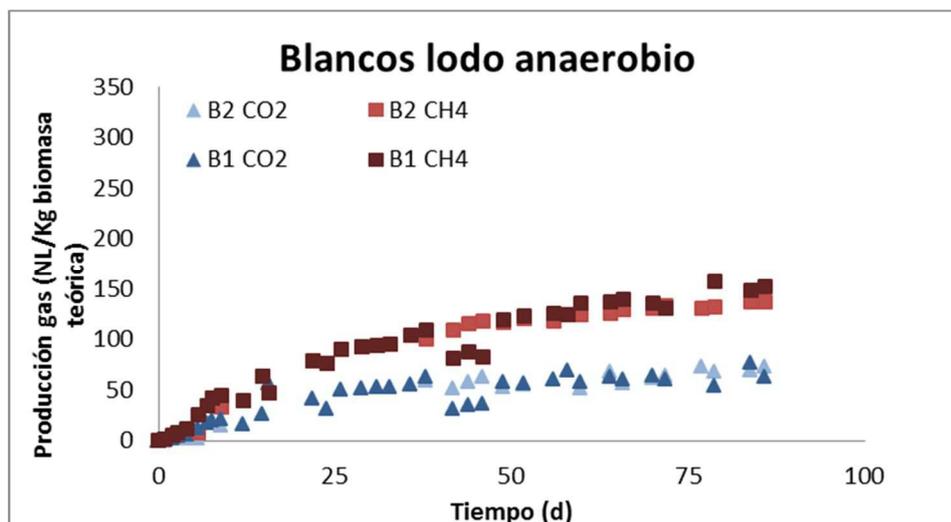
De los resultados expuestos en la tabla 4.4 se concluye que para todas las especies tanto las MS como RE presentan valores de producción total de gas muy similares, siendo los de RE ligeramente inferiores (< 5,00%) para todas las especies estudiadas.

La especie que mayores producciones totales de gas presentó fue *Scenedesmus sp.* para sus MS y sus RE. La especie *Chlorella sp.* es la que menores producciones totales presentó para sus tres residuos.

Por otra parte los RR presentan producciones totales de biogás muy inferiores a las MS y las RE, lo que era de esperar ya que representan un residuo que procede de un proceso de condiciones altamente agresivas. En este caso la especie *Nannochloropsis sp.* fue la que mayor producción presentó (175,56 NL/kg de RR).

La producción de gas total en los blancos del lodo se consideró en términos de NL/kg de biomasa teórica, entendiéndose estas unidades como la producción de gas total dividida por el peso teórico de microalga que le correspondería a esa cantidad de lodo considerando la relación 1:1 (SV de microalga/ SV de inóculo).

Si tenemos en cuenta el comportamiento de los blancos del lodo anaerobio (figura 4.6) vemos como las co-digestiones de las MS y los RE presentan producciones totales de gas muy superiores a las que presenta el lodo de forma aislada (193,53 NL/kg de biomasa teórica). Como sabemos a partir de estudios anteriores, las microalgas y sus residuos digeridos de forma aislada dieron lugar a pequeñas producciones de CO<sub>2</sub>, lo que indica que la co-digestión anaerobia es un proceso beneficioso en el caso de la valorización de los residuos de microalgas.



**Figura 4.6.-**Producción de gas (NL/Kg biomasa teórica) en los blancos del lodo anaerobio.

En el caso de los RR los niveles de producción total de gas fueron inferiores a los obtenidos para el lodo de forma aislada. A pesar de que los resultados de las co-digestiones no implicaron un aumento en la producción total de gas con respecto a los blancos del lodo, sí que resultaron mejores en comparación con el estudio de las digestiones de los RR de forma aislada donde, además de no producirse CH<sub>4</sub>, las producciones totales de gas en ningún caso superaron los 9 NL/kg de RR.

De forma global se puede concluir que el proceso de co-digestión anaerobia es el más adecuado para la valorización de los residuos de microalgas y que, además, el proceso de obtención de biodiésel a partir de microalgas en dos etapas (extracción-reacción) permite

aprovechar el extracto lipídico de las microalgas para la obtención del biodiésel y el máximo aprovechamiento del residuo generado.

La valorización puede realizarse co-digiriendo ambos residuos en biodigestores independientes de forma simultánea y uniendo los gases de salida. Para estudios posteriores se puede ver la posibilidad de realizar la co-digestión conjunta de ambos residuos de procesos de aprovechamiento de microalgas (RE y RR).

#### 4.4.-Análisis de Sólidos Totales, Sólidos Volátiles y Sólidos Fijos.

En esta sección aparecen tabulados los datos obtenidos para el análisis de ST, SV y SF de los digestores al inicio y una vez concluido el proceso de co-digestión anaerobia.

| Tabla 4.5.- Análisis de Sólidos Totales, Fijos y Volátiles al inicio y al finalizar la co-digestión. |                       |       |       |                       |       |       |                               |        |        |
|--|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|-------------------------------|--------|--------|
| Muestra  | Iniciales             |       |       | Finales               |       |       | Reducción (%final vs inicial) |        |        |
|  | ST                    | SV    | SF    | ST                    | SV    | SF    | ST                            | SV     | SF     |
| MS-C1  | 97,09                 | 87,53 | 12,47 | 68,59                 | 77,32 | 22,68 | -29,35                        | -11,66 | 81,86  |
| MS-C2  | 97,09                 | 87,53 | 12,47 | 69,05                 | 74,13 | 25,87 | -28,88                        | -15,31 | 107,43 |
| RE-C1  | 98,64                 | 86,07 | 13,93 | 84,47                 | 75,38 | 24,62 | -14,36                        | -12,42 | 76,74  |
| RE-C2  | 98,64                 | 86,07 | 13,93 | 85,50                 | 69,71 | 30,29 | -13,33                        | -19,01 | 117,44 |
| RR-C1  | 97,09                 | 89,36 | 10,64 | 29,32                 | 53,21 | 46,79 | -69,80                        | -40,46 | 339,80 |
| RR-C2  | 97,09                 | 89,36 | 10,64 | 27,67                 | 56,12 | 43,88 | -71,50                        | -37,20 | 312,38 |
| MS-N1  | 97,5                  | 79,31 | 20,69 | 73,65                 | 64,70 | 35,30 | -24,46                        | -18,42 | 70,62  |
| MS-N2  | 97,5                  | 79,31 | 20,69 | 76,10                 | 65,68 | 34,32 | -21,95                        | -17,18 | 65,86  |
| RE-N1  | 98,09                 | 81,22 | 18,78 | 70,15                 | 64,02 | 35,98 | -28,48                        | -21,18 | 91,58  |
| RE-N2  | 98,09                 | 81,22 | 18,78 | 70,77                 | 64,91 | 35,09 | -27,86                        | -20,09 | 86,87  |
| RR-N1  | 97,35                 | 83,05 | 16,95 | 49,21                 | 55,03 | 44,97 | -49,45                        | -33,74 | 165,33 |
| RR-N2  | 97,35                 | 83,05 | 16,95 | 49,73                 | 52,36 | 47,64 | -48,92                        | -36,96 | 181,09 |
| MS-S1  | 97,67                 | 90,37 | 9,63  | 67,03                 | 79,22 | 20,78 | -31,37                        | -12,34 | 115,83 |
| MS-S2  | 97,67                 | 90,37 | 9,63  | 69,84                 | 74,85 | 25,15 | -28,50                        | -17,17 | 161,13 |
| RE-S1  | 99,24                 | 87,41 | 12,59 | 78,93                 | 54,79 | 45,21 | -20,47                        | -37,31 | 259,06 |
| RE-S2  | 99,24                 | 87,41 | 12,59 | 78,93                 | 54,79 | 45,21 | -20,47                        | -37,31 | 259,06 |
| RR-S1  | 92,01                 | 84,06 | 15,94 | 58,62                 | 69,16 | 30,84 | -36,29                        | -17,72 | 93,46  |
| RR-S2  | 92,01                 | 84,06 | 15,94 | 57,96                 | 66,97 | 33,03 | -37,01                        | -20,33 | 107,23 |
| B1   | 2,00·10 <sup>-2</sup> | 81,88 | 18,12 | 1,16·10 <sup>-2</sup> | 64,40 | 35,60 | -41,05                        | -21,35 | 96,46  |
| B2   | 2,00·10 <sup>-2</sup> | 81,88 | 18,12 | 1,20·10 <sup>-2</sup> | 66,67 | 33,33 | -38,93                        | -18,58 | 83,96  |

Sobre los residuos a digerir cabe destacar el contenido en SV de *Nannochloropsis sp.* (79,31%) que es notablemente inferior al de las otras dos especies que es superior al 90%. Esto se debe fundamentalmente a que, al ser una especie de medio marino, la parte del medio que le queda impregnada durante el proceso de cosechado y secado le aporta un contenido elevado en sales, que en términos de sólidos forman parte de la fracción refractaria o SF.

Con respecto a las especies es *Nannochloropsis sp.* la que da menores valores en contenido en SV después de la co-digestión para todos sus residuos, comparándolos con la otras dos especies. También presenta los mayores valores de reducción de SV tanto para las MS y sus RE, mientras que en el caso de las RR la especie *Chlorella sp.* presenta valores ligeramente superiores.

Analizando los datos obtenidos para los blancos del lodo de depuradora se observa que es un residuo no estabilizado ya que presenta un dato importante de reducción de SV (media de 19,97% de reducción de SV). Esto confirma que el lodo tiene actividad fermentativa durante el experimento.

Se puede considerar que un lodo digerido se caracteriza por un contenido de 55-65% en SV suspendidos (tabla 1.5), niveles finales que para este estudio se alcanzaron en la mayoría de los digestores. En este sentido hay que destacar la especie *Chlorella sp.*, ya que tanto sus MS como sus RE presentan la más baja biodegradabilidad, así como las MS de la especie *Scenedesmus sp.*

Algunos autores apuntan a que la complejidad de la pared celular es un factor que influye altamente en el comportamiento de una especie frente al proceso de digestión (Sialve et al., 2009), junto con la composición macromolecular de las especies. La pared celular está compuesta principalmente por compuestos con baja biodegradabilidad y/o biodisponibilidad como la celulosa y la hemicelulosa, por lo que la materia orgánica retenida en el citoplasma no es fácilmente accesible para las bacterias anaerobias, reduciendo la velocidad de la etapa de hidrólisis (Carrère et al., 2010; Carlsson et al., 2012; De la Rubia et al., 2013; Hendriks and Zeeman, 2009; Monlau et al., 2013). En este estudio se confirma esta teoría ya que *Chlorella sp.* es la especie con la pared celular más resistente de las tres, seguida por *Scenedesmus sp.*

Con respecto a la fracción refractaria al ser uno de los dos componentes de los ST y, al haber una reducción de los SV en todos los casos se observó, como era de esperar, un aumento en los SF en todos los casos, ya que se habla en términos porcentuales.

#### 4.5.-Análisis del pH y conductividad

A continuación se muestran los datos tabulados del pH (tabla 4.6). Estos datos se tomaron al iniciar y al finalizar el proceso de co-digestión.

| <b>Tabla 4.6.- Análisis del pH al iniciar y finalizar la digestión.</b> |                     |                   |
|---|---------------------|-------------------|
| <b>Muestra</b>  | <b>pH Iniciales</b> | <b>pH Finales</b> |
| <b>MS-C1</b>  | 7,98                | 7,59              |
| <b>MS-C2</b>  | 8,04                | 7,90              |
| <b>RE-C1</b>  | 7,97                | 7,67              |
| <b>RE-C2</b>  | 8,19                | 7,88              |
| <b>RR-C1</b>  | 7,96                | 7,56              |
| <b>RR-C2</b>  | 8,13                | 7,59              |
| <b>MS-N1</b>  | 7,98                | 7,67              |
| <b>MS-N2</b>  | 8,19                | 7,55              |
| <b>RE-N1</b>  | 8,35                | 7,65              |
| <b>RE-N2</b>  | 8,02                | 7,74              |
| <b>RR-N1</b>  | 7,95                | 7,54              |
| <b>RR-N2</b>  | 7,99                | 7,06              |
| <b>MS-S1</b>  | 7,76                | 7,49              |
| <b>MS-S2</b>  | 8,00                | 7,47              |
| <b>RE-S1</b>  | 8,06                | 7,45              |
| <b>RE-S2</b>  | 8,13                | 7,51              |
| <b>RR-S1</b>  | 7,95                | 7,13              |
| <b>RR-S2</b>  | 8,03                | 7,12              |
| <b>B1</b>   | 7,24                | 7,97              |
| <b>B2</b>   | 7,32                | 8,08              |

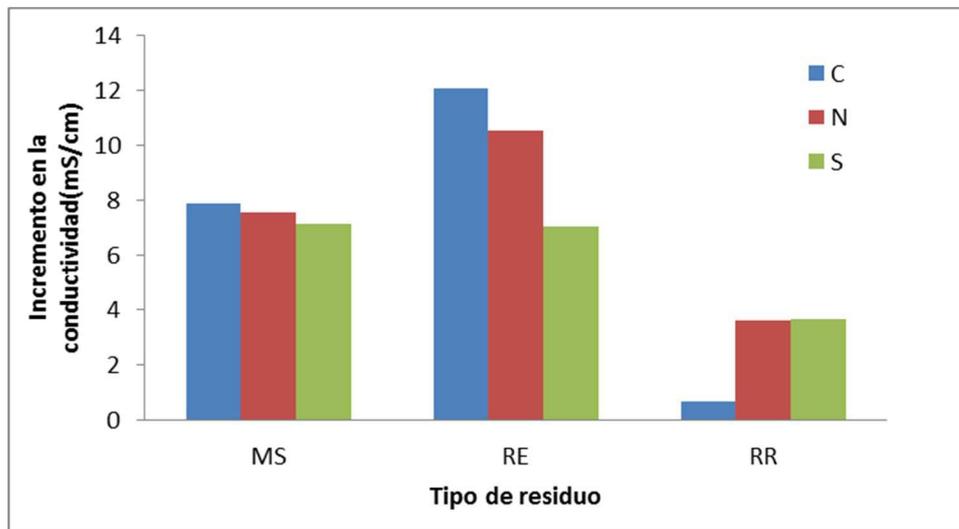
Como se observa en la tabla anterior los valores de pH presentaron una ligera reducción después del proceso de co-digestión anaerobia, aunque se mantuvieron entorno a los valores iniciales (7,50-8,50). La actividad microbiana no se vio afectada en ningún momento por el pH del medio, al no llegar a un valor ácido de inhibición ( $\leq 4,00$ ) en ningún caso, lo que hace aún más valioso este proceso, al eliminar esta variable. Este comportamiento es independiente de la especie de microalga y del tipo de residuo.

En otros estudios previos de la digestión anaerobia de las microalgas y sus residuos de forma aislada se observó un acusado descenso del pH en todos los digestores, lo que produjo el cese de la producción de gas. En esos estudios se hicieron reajustes de pH a los valores iniciales, siendo *Scenedesmus sp.* la única especie sensible al reajuste.

A continuación se muestran los datos tabulados de conductividad (tabla 4.7). Estos datos se tomaron al iniciar y al finalizar el proceso de co-digestión.

| <b>Tabla 4.7.- Análisis de la conductividad al iniciar y finalizar la digestión.</b> |                                      |                                      |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Muestra</b>   | <b>Conductividad Inicial (mS/cm)</b> | <b>Conductividad Finales (mS/cm)</b> |
| MS-C1  | 6,56                                 | 14,76                                |
| MS-C2  | 6,60                                 | 14,18                                |
| RE-C1  | 6,69                                 | 17,44                                |
| RE-C2  | 6,70                                 | 20,03                                |
| RR-C1  | 14,53                                | 13,17                                |
| RR-C2  | 10,42                                | 13,20                                |
| MS-N1  | 8,23                                 | 15,91                                |
| MS-N2  | 8,45                                 | 15,92                                |
| RE-N1  | 6,35                                 | 17,07                                |
| RE-N2  | 6,44                                 | 16,8                                 |
| RR-N1  | 10,10                                | 13,97                                |
| RR-N2  | 10,02                                | 13,35                                |
| MS-S1  | 6,30                                 | 13,58                                |
| MS-S2  | 6,41                                 | 13,41                                |
| RE-S1  | 6,29                                 | 13,08                                |
| RE-S2  | 6,15                                 | 13,46                                |
| RR-S1  | 10,00                                | 14,02                                |
| RR-S2  | 10,09                                | 13,42                                |
| B1   | 6,18                                 | 8,85                                 |
| B2   | 6,24                                 | 8,57                                 |

En la figura 4.7 se observa que el valor final de la conductividad aumenta con respecto al inicial en todos los casos estudiados.



**Figura 4.7.-** Incremento en la conductividad (mS/cm) en los digestores.

La especie *Chlorella sp.* es la que genera mayor incremento en la conductividad, seguida de *Nannochloropsis sp.* y siendo la de menor incremento *Scenedesmus sp.* para los casos de las MS y RE. Este comportamiento se invierte en el caso de las RR.

El estudio en profundidad de esta variable se deja abierto para el desarrollo de otros trabajos de investigación.

## **5.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**



## 5.1.-Conclusiones.

Como resultado de esta investigación y en concordancia con el análisis bibliográfico que presentó la co-digestión anaerobia como el proceso potencialmente más adecuado para la valorización de residuos de microalgas, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. En cuanto a la elección del inóculo más apropiado para la co-digestión anaerobia de los residuos de microalgas:
  - a. El lodo anaerobio de depuradora se mostró como el inóculo más apropiado para la co-digestiones de los residuos de microalgas.
  - b. En las co-digestiones de las MS con el lodo anaerobio de depuradora las producciones totales de gas fueron mayores que en el caso del blanco del lodo anaerobio de depuradora, alcanzando la calidad del biogás en todos los casos.
  - c. En las co-digestiones de las MS con gallinaza las producciones totales de gas fueron notablemente inferiores a las del blanco de la gallinaza, no alcanzando la calidad de biogás en ninguno de los casos.
  - d. El comportamiento de los blancos mostró como el lodo anaerobio de depuradora es un inóculo ya preparado para las condiciones de digestión, mientras que la gallinaza necesita ser aclimatada para comenzar a producir biogás.
2. De la co-digestión anaerobia de las MS:
  - a. En todos los casos la producción total de gas alcanzó la calidad de biogás (>50% CH<sub>4</sub>).
  - b. Todas las co-digestiones presentaron la misma evolución en la producción acumulada de gas, con etapas de iniciación, de velocidad de producción máxima y de estabilización.
  - c. La especie que presentó mayor producción total de gas fue *Scenedesmus sp.* (436,05 NL/Kg de MS).

d. La especie que presentó menor producción total de gas fue *Chlorella sp.* (396,61 NL/kg de MS), con unas curvas de producción total acumulada más suavizadas.

3. De la co-digestión anaerobia de las RE:

a. En todos los casos la producción total de gas alcanzó la calidad de biogás (<50% CH<sub>4</sub>).

b. Los niveles de producción total de gas alcanzados fueron muy similares a los alcanzados en las co-digestiones de las MS.

c. Todas las co-digestiones presentaron la misma evolución en la producción acumulada de gas, presentando una evolución mucho más suave que para las MS para las tres especies estudiadas.

d. La especie que presentó mayor producción total de gas fue *Scenedesmus sp.* (422,66 NL/kg de RE).

e. La especie que presentó menor producción total de gas fue *Chlorella sp.* (385,56 NL/kg de MS).

4. De la co-digestión anaerobia de las RR:

a. En todos los casos la producción total de gas alcanzó la calidad de biogás (>50% CH<sub>4</sub>).

b. Los niveles de producción total alcanzados fueron muy inferiores a los obtenidos en las co-digestiones de las MS y los RE.

c. Para el caso de los RR la evolución de las curvas presentan una etapa producción máxima notablemente menos pronunciada que en el caso de las MS y RE.

d. La especie que mayor producción total de gas presentó fue *Nannochloropsis sp.* (165 NL/ Kg de RR).

e. La especie que menor producción total de gas presentó fue *Chlorella sp.* (111,49 NL/kg de RR).

- f. La especie *Scenedesmus sp.* presentó el menor contenido en CH<sub>4</sub> de todos los residuos estudiados en este trabajo (56,82 %).
5. En la comparativa de los resultados en función de la biomasa:
- Para todas las especies tanto las MS como los RE presentaron producciones totales de gas muy similares, siendo los RE ligeramente inferiores. Esta diferencia no superó el 5,00% en ningún caso.
  - Las co-digestiones de las MS y los RE presentaron producciones totales de gas muy superiores a las del lodo anaerobio de forma aislada (193,53 NL/kg de biomasa teórica) para todas las especies.
  - Las co-digestiones de los RR presentaron producciones totales de gas inferiores a las del lodo anaerobio de forma aislada.
  - La co-digestión anaerobia de los residuos generados en el proceso de obtención de biodiésel a partir de microalgas en dos etapas (extracción-reacción) permite aprovechar el extracto lipídico de las microalgas para la obtención de biodiésel y el máximo aprovechamiento del residuo sólido generado.
6. Del contenido en sólidos después de la co-digestiones:
- La especie *Nannochloropsis sp.* es la que presentó el menor contenido en SV después de la co-digestión para todos sus residuos.
  - La especie *Nannochloropsis sp.* mostró los mayores de reducción de SV tanto para las MS como para sus RE. En el caso de los RR es la especie *Chlorella sp.* la que presentó los mayores valores de SV.
  - El lodo anaerobio de depuradora que se empleó como inóculo se mostró como un residuo no estabilizado al presentar una reducción de SV de un 19,97%, lo que confirmó su actividad fermentativa después del experimento.
  - De los niveles de SV al final de la co-digestión se dedujo que las MS y los RE de *Chlorella sp.* presentaron la más baja biodegradabilidad, así

como las MS de la especie *Scenedesmus sp.*, comportamiento debido a la estructura de la pared celular en ambos casos.

7. En cuanto al análisis del pH y la conductividad después de las co-digestiones:
  - a. En todos los casos estudiados los valores finales de pH presentaron una ligera reducción con respecto a los iniciales.
  - b. La actividad microbiana no se vio afectada en ningún caso por el pH del medio.
  - c. La estabilidad del pH durante el proceso se mostró como una ventaja de la co-digestión anaerobia frente a la digestión anaerobia de las microalgas y sus residuos, donde el pH descendió drásticamente en todos los casos.
  - d. En todos los casos estudiados los valores finales de conductividad fueron superiores a los iniciales.
  - e. La especie *Chlorella sp.* fue la que generó mayor incremento en la conductividad seguida de *Nannochloropsis sp.* y *Scenedesmus sp.* para las MS y los RE. En el caso de los RR se invirtió el orden.

Como conclusión global podemos decir que el proceso de aprovechamiento de las microalgas en dos etapas (extracción-reacción) genera un residuo sólido (RE) altamente valorizable vía co-digestión anaerobia inoculando lodo anaerobio de depuradora, lo que permite aprovechar la fracción lipídica extraída de las microalgas para otros procesos. El lodo anaerobio de depuradora como inóculo en el proceso de co-digestión anaerobia de los residuos de microalgas, facilita la producción de biogás si se compara con el proceso de digestión anaerobia, que solo produce CO<sub>2</sub> en menor cantidad. De las especies estudiadas, *Scenedesmus sp.* es la que mejor resultado de producción total de biogás proporcionó (436,05 NL/Kg de biomasa) seguida muy de cerca de sus residuos de extracción (422,62 NL/kg de biomasa).

## 5.1.-Conclusions.

As a result of this research and in accordance with the bibliographic analysis that showed anaerobic co-digestion as the best process to make microalgae residues valuable, the following conclusions have been reached:

1. Regarding the choice of the inoculum for the anaerobic co-digestion of waste from microalgae:
  - a. Anaerobic sewage sludge showed as the inoculum that is most appropriate for the co-digestions of waste of microalgae.
  - b. In the co-digestions of the MS with anaerobic sewage sludge, the gas mass productions were greater than in the case of the white of the anaerobic sewage sludge, achieving the quality of biogas in all cases.
  - c. In the co-digestions of the MS with chicken manure, the gas mass productions were significantly inferior to the white of the chicken manure, not achieving the quality of biogas in none of the cases.
  - d. The behavior of whites showed how anaerobic sewage sludge is an inoculum already prepared for the conditions of digestion, while the chicken manure need to be acclimatized to begin producing biogas.
2. Regarding MS anaerobic co-digestion:
  - a. For all cases the total gas production reached the quality of biogas (<50% CH<sub>4</sub>).
  - b. All co-digestion process presented the same evolution in the gas accumulated production, with stages of initiation, speed of maximum production and stabilization.
  - c. The species who presented greater total gas production was *Scenedesmus sp.* (436,05 NL / kg of MS).

- d. The species who presented lower total gas production was *Chlorella sp.* (396,61 NL/kg of MS), with accumulated total production curves smoother.

3. Regarding RE anaerobic co-digestion:

- a. For all cases the total gas production reached the quality of biogas (<50% CH<sub>4</sub>).
- b. The total gas production levels were very similar to those achieved in the co-digestion of the MS.
- c. All co-digestions process presented the same evolution for the cumulative gas production, presenting a much smoother evolution than for the MS for the three species studied.
- d. The species that presented greater total gas production was *Scenedesmus sp.* (422,66 NL / kg of RE).
- e. The species that presented lower total gas production was *Chlorella sp.* (385,56 NL/kg of MS).

4. Regarding RR anaerobic co-digestion:

- a. For all cases the total gas production reached the quality of biogas (>50% CH<sub>4</sub>).
- b. The total production levels were much lower than those obtained in the co-digestion of the MS and the RE.
- c. For the case of the RR the evolution of the curves presented a maximum production stage significantly less pronounciation that in the case of the MS and RE.
- d. The specie that presented greater total gas production was *Nannochloropsis sp.* (165NL / RR Kg of RR).
- e. The specie that presented by lower total gas production was *Chlorella sp.* (111,49 NL / kg of RR).

- f. The specie *Scenedesmus sp.* presented the lower content in CH<sub>4</sub> from all the waste studied in this work (56,82%).

5. In the comparison of the results depending on the biomass:

- a. For all species, both the MS and the RE presented total gas yields very similar, being slightly lower for RE. This difference does not exceed the 5.00% in any case.
- b. The co-digestion of the MS and the RE presented total gas yields much higher than the anaerobic sludge in isolation (193,53 NL/kg theoretical biomass) for all species
- c. The co-digestion of RR presented lower total gas production than the total gas productions of the anaerobic sludge isolated.
- d. The anaerobic co-digestion of waste generated in the process of obtaining biodiesel from microalgae in two stages (extraction-reaction) allowed taking advantage of the lipid extract of microalgae for obtaining biodiesel and maximum use of the solid waste generated.

6. Solids content after the co-digestion processes:

- a. The specie *Nannochloropsis sp.* presented lower content in SV after the co-digestion for all its wastes.
- b. The specie *Nannochloropsis sp.* showed the largest SV reduction for the MS and their RE. In the case of the RR is the *Chlorella sp.* specie which presented the highest values of SV.
- c. The anaerobic sewage sludge used as inoculum was shown as a residue not stabilized presenting a SV reduction of 19.97%, which confirmed its fermentative activity after the experiment.
- d. From the levels of SV at the end of the co-digestion is deduced that the MS and the RE of *Chlorella sp.* presented the lowest biodegradability, as well as the MS of the specie *Scenedesmus sp.* This behavior is due to the structure of the cell wall in both cases.

7. As regards the analysis of pH and conductivity after the co-digestions:
- a. In all cases studied the final value of pH presented a light reduction with regard to the initial.
  - b. The microbial activity was not affected in any case by the pH of the medium.
  - c. Stability of the pH during the process is showed as an advantage of the anaerobic co-digestion against anaerobic digestion of microalgae and their wastes, where the pH decreased dramatically in all cases.
  - d. For all the cases studied the final conductivity values were higher than the initial.
  - e. The specie *Chlorella sp.* generated the greater increase in conductivity followed by *Nannochloropsis sp.* and *Scenedesmus sp.* for the MS and RE. The order was reversed in the case of the RR.

As global conclusion can be said that the process in two stages (extraction-reaction) generates a residue solid (RE) highly reusable via anaerobic co-digestion inoculating anaerobic sludge of wastes, which allows to take advantage of the lipidic fraction extracted of the microalgae for others processes. The anaerobic sewage sludge as inoculum in the process of anaerobic co-digestion of microalgae wastes, facilitates the production of biogas if compared to the anaerobic digestion process, which only produces CO<sub>2</sub> in lesser amounts. From the species studied, *Scenedesmus sp.* gives the best result of total biogas production (436,05 NL/kg of biomass) followed closely by its extraction wastes (422,62 NL/kg of biomass).

## 5.2.-Recomendaciones.

Una vez concluido esta investigación, se recomienda:

1. Estudiar la mezcla de residuos de microalgas (RE y RR) como biomasa de partida.
2. Estudiar la influencia de otros parámetros como la conductividad, la temperatura, la cantidad de agua en el medio, no añadir nutrientes, etc.

3. Analizar la fracción líquida resultante después del proceso de co-digestión anaerobia.
4. Estudiar la gallinaza como inóculo después de aclimatarla a las condiciones de co-digestión.

## **5.2.-Recommendations.**

Once this research had concluded, it is recommended:

1. Study the mixture of microalgae (RE and RR) wastes as for starting biomass.
2. Study the influence of other parameters on the anaerobic process as conductivity, temperature, amount of water in the culture medium, not addition of any nutrients, etc.
3. Analyze the liquid fraction once anaerobic co-digestion has finished
4. Study the manure as inoculum after acclimate it to the conditions of co-digestion.



## 6.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



APHA (American Public Health Association). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington: [s.n.], 1992.

Balat M. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol. *Applied Energy*. 2011; 86: 22793-2282.

Bajpai D., Tyagi V.K. Biodiesel: source, production, composition, properties and its benefits. *Journal of Oleo Science* 2006; 55: 487-502.

Bergamo C., Di Mònaco R., Ratusznei S., Rodrigues J., Zaiat M., Foresti, E. Effects of temperature at different organic loading levels on the performance of a fluidized-bed anaerobic sequencing batch bioreactor. *Chemical Engineering and Processing* 2009; 48 (3): 789-796.

Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010; 14: 557-577.

BP. British Petroleum. Statistical Review of World Energy [en línea]. Junio 2015, [fecha de consulta: 2 de Septiembre de 2016]. Disponible en: <<http://www.bp.com/en/global/corporate/aboutbp/energyeconomics/statisticalreview-of-world-energy.html>>.

Carlsson M., Lagerkvist A., Morgan-Sagastume F. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: a review. *Waste Management* 2012; 32: 1634-1650.

Carrillo L., Resumen y biogás. Universidad Nacional de Salta Republica de Salta- Argentina 2003.

Carrère, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D.J., Delgenes, J.P., Steyer, J.P., Ferrer, I. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: a review. *Journal of Hazardous Materials* 2010; 183: 1-15.

Chen Y., Cheng J.J., Creamer K.S.. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology* 2008; 99: 4044-64.

Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 2007; 25: 294-306.

Connaughton S., Collins G., O'Flaherty V. Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18°C. *Water Research* 2006; 40: 1009-1007.

De la Rubia M.A., Fernández-Cegrí V., Raposo F., Borja R. Anaerobic digestion of sunflower oil cake: a current overview. *Water Science and Technology* 2013; 67: 410-417

Demirbas A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conversion Management* 2008; 49:125-130.

Droop M.R. 25 years of algal growth kinetics. *Botanica Marina* 1983; 26: 99-112.

Elser J.J., Fagan W.F., Denno R.F., Dobberfuhl D.R., Folarin A., Huberty A., et al. Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature* 2000; 408: 578-80.

Enright A., McGrath V., Gill D., Collins G., O'Flaherty V. Effect of seed sludge and operation conditions on performance and archaeal community structure of low-temperature anaerobic solvent-degrading bioreactors. *Systematic and Applied Microbiology* 2009; 32 (1): 65-79.

García Peña E.I., Parameswaran P., Kang D.W., Canul-Chan M., Krajmalnik-Brown R. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: Process and microbial ecology. *Bioresource Technology* 2011; 102: 9447-9455.

Greenwell H.C., Laurens L.M., Shields R.J., Lovitt R.W Flynn K.J. Placing microalgae on the biofuels priority list a review of the technological challenge. *Journal of the Royal Society Interface* 2009; 7: (46): 703–726.

Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 2009; 100: 10-18.

Hilbert J., Manual para la producción de biogás. Instituto de Ingeniería rural I.N.T.A. Castelar- Argentina 2004.

Leadbeater B.S.C. The 'Droop equation'-Michael Droop and the legacy of the 'cell-quota model' of phytoplankton growth. *Protist* 2006; 157(3): 345-58.

López S., Planta de tratamiento anaerobio de residuos avícolas en una granja en el TM de San Juan de la Rambla, Proyecto Fin de Carrera, Universidad de La Laguna 2008.

MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente [en línea ].[Fecha de consulta 2 de Septiembre de 2016]. Disponible en: <<http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora/#para0>>.

McHugh S., Carton M., Collins G., O'Flaherty V. Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewater at 16°-37°C. *FEMS Microbial. Ecology* 2004; 48: 369-378.

Medidor de pH.com. Funcionamiento, cuidado y calibrado del medidor del ph. [en línea][Fecha de consulta 7 de Enero 2016]. Disponible en: <<http://www.medidordeph.com /funcionamiento-cuidado-calibrado-medidor-ph>>.

Met Office. What is climate change[ en línea] [Fecha de consulta 6 febrero 216].Dicember 2015.Disponible en: <<http://www.metofficegoe.uk /climate-guide/climate-change>>.

Metcalf and Eddy. Procesos biológicos unitarios; Digestión anaerobia del fango; Procesos de tratamientos anaerobios de cultivos en suspensión. En: Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, Vertido y Reutilización. Ed. McGraw-Hill, Boston 1995, ISBN: 84-481-1607-0.

Monlau F., Barakat A., Trably E., Dumas C., Steyer J.P., Carrere H. Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Critical Review in Environmental and Science Technologies* 2013; 43 (3): 260-322.

Morgan-Sagastume F., Allen D.G. Activated sludge deflocculation under temperature upshifts from 30 to 45°C. *Water Research* 2005; 39: 1061-1074.

Nadarajaha N., Allen D.G., Fulthorpe R. Effects of transient temperature conditions on the divergence of activated sludge bacterial community structure and function. *Water Research* 2007; 41: 2563-2571.

Nigam P.S., Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* 2010; 37 (1): 52-68.

Olsson L., Shabimam M.A., Nehrenheim E.; Thorin E. Co-digestion of cultivated microalgae and sewage sludge from municipal waste water treatment. ICAE 2013.

Organización Meteorológica Mundial. Las concentraciones de gases de efecto invernadero vuelven a batir un récord [en línea] 2015. [Fecha de consulta 7 de enero 2016]. Disponible en: <<http://www.aemet.es/es/noticias/11/ommrecordgases>>.

Oropeza G., Lodos residuales: estabilización y manejo. *Caos conciencia* 2006 1: 51-58.

Quirumed. Conductímetro de laboratorio [en línea]. Disponible en: <<http://www.quirumed.com/es/conductimetro-de-laboratorio>>.

Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L. y Molina-Grima, E. 2009. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*. 27(4): 398-408.

Rodrigo A., Obtención de biogás mediante fermentación anaerobia de residuos alimentarios, Madrid 2005.

Rodríguez V., Valorización de la gallinaza: planta de compostaje en bioreactor. Proyecto Fin De Carrera, Universidad de Oviedo 1999.

Sialve B., Bernet N., Bernard O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances* 2009; 27: 409-416.

Singh S.P., Singh D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010; 14: 200-216.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. Cromatografía de gases. En: *Principios de Análisis Instrumental*. Ed. McGraw Hill/Interamericana de España, Madrid 2001, ISBN 84-481-2775-7

Tauseef S.M.; Abbasi T.; Abbasi S.A. Energy recovery from wastewaters with high-rate anaerobic digestors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2013; 19: 704-741.

Wang M., Sahu A.K., Rusten B., Park C. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. And waste activated sludge. *Bioresource Technology* 2013; 142: 585-590.





