



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS DE CAMINOS,
CANALES Y PUERTOS



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

Memoria

Trabajo final de máster

Titulación: Máster en Ingeniería Ambiental
Curso: 2015/16

Autor: Beatriz Ruvira Quintana

Tutor: Daniel Aguado García

Cotutor: María Pachés Giner

Valencia, septiembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para agradecer el apoyo y dedicación que he recibido por parte de la gente que ha estado a mi lado durante la realización de este trabajo.

Especialmente, quiero agradecer sinceramente el trabajo y la ayuda incondicional que me han prestado mi tutor, Dr. Daniel Aguado García, y mi cotutora, Dra. María Pachés Giner. Sin ellos este trabajo no habría sido posible.

A todas las personas de los laboratorios del IIAMA y de la ETSE, que me han recibido con los brazos abiertos y me han tendido una mano cuando la he necesitado. Sobre todo quiero darles las gracias a Reme, Nuria y Berta por estar pendientes de mí y haberme ayudado en todo momento.

También agradecer el apoyo de mi familia y amigos, por su constante preocupación por el progreso de este trabajo y por haberme acompañado y ayudado en todos los aspectos de mi vida.

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de todos vosotros/as.

Gracias.

RESUMEN

En la última década se ha incrementado el interés por producir energía a través de la producción de biogás a partir de la digestión anaerobia de las microalgas, ya que se trata de un proceso menos complejo y más directo que la producción de biodiésel. Sin embargo, este proceso no aprovecha toda la materia orgánica de las microalgas si las células tienen una pared celular resistente que permanece intacta, haciendo necesario el uso de pretratamientos para llegar a romperla o dañarla y, así mejorar la producción de biogás.

Uno de los pretratamientos más utilizados es la aplicación de ultrasonidos que consiste en ciclos de rápida compresión y descompresión de las ondas sónicas, que generan microburbujas que son comprimidas hasta su mínimo e implosionan produciendo calor, radicales libres, altas presiones, ondas de choque y, finalmente, rompen la pared celular.

El pretratamiento con ultrasonidos promueve la rotura de la pared celular de las microalgas y la solubilización de la materia orgánica; sin embargo, los resultados dependen de la especie de microalgas y de las condiciones del pretratamiento, especialmente la energía específica aplicada.

En este trabajo estudia la aplicación de ultrasonidos como pretratamiento para romper la pared celular de cuatro especies de microalgas (*Monoraphidium braunii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomonas reinhardtii*) y una muestra real proveniente del fotobiorreactor de la EDAR del Carraixet. El objetivo es aumentar su biodegradabilidad, valorando el efecto conseguido mediante una visualización al microscopio, y cuantificando la producción de biogás tras una digestión anaerobia (en ensayos en discontinuo de laboratorio).

Finalmente se ha modelizado las curvas de producción de metano obtenidas para comprobar si siguen cinéticas de primer o segundo orden y también se ha realizado una valoración energética del pretratamiento, para determinar si el incremento en la producción de biogás (producida por el pretratamiento) compensa el gasto energético del mismo.

RESUM

En l'última dècada s'ha incrementat l'interés per produir energia a través de la producció de biogàs a partir de la digestió anaeròbia de les microalgues, ja que es tracta d'un procés menys complex i més directe que la producció de biodièsel. No obstant això, este procés no aprofita tota la matèria orgànica de les microalgues si les cèl·lules tenen una paret cel·lular resistent que roman intacta, fent necessari l'ús de pretractaments per a arribar a trencar-la o danyar-la i, així millorar la producció de biogàs.

Un dels pretractaments més utilitzats és l'aplicació d'ultrasons que consistix en cicles de ràpida compressió i descompressió de les ones sòniques, que generen microbambolles que són comprimides fins al seu mínim i implosionen produint calor, radicals lliures, altes pressions, ones de xoc i, finalment, trenquen la paret cel·lular.

El pretractament amb ultrasons promou la ruptura de la paret cel·lular de les microalgues i la solubilització de la matèria orgànica; no obstant això, els resultats depenen de l'espècie de microalgues i de les condicions del pretractament, especialment l'energia específica aplicada.

Em este treball s'estudia l'aplicació d'ultrasons com a pretractament per a trencar la paret cel·lular de quatre espècies de microalgues (*Monoraphidium braunii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* i *Chlamydomonas reinhardtii*) i una mostra real provinent del fotobiorreactor de l'EDAR del Carraixet. L'objectiu és augmentar la seua biodegradabilitat, valorant l'efecte aconseguit per mitjà d'una visualització al microscopi, i quantificant la producció de biogàs després d'una digestió anaeròbia (en assajos en discontinu de laboratori).

Finalment s'ha modelitzat les corbes de producció de metà obtingudes per a comprovar si segueixen cinètiques de primer o segon orde i també s'ha realitzat una valoració energètica del pretractament, per a determinar si l'increment en la producció de biogàs (produïda pel pretractament) compensa el gasto energètic del mateix.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ultrasonidos	2
1.2. Microalgas.....	3
1.2.1. Especies	4
1.2.1.1. <i>Scenedesmus obliquus</i>	4
1.2.1.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	5
1.2.1.3. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6
1.2.1.4. <i>Monoraphidium braunii</i>	6
1.3. Proceso de digestión anaerobia	7
1.4. Reducción del sulfato	9
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1. Muestras	11
3.2. Desarrollo de los experimentos	11
3.2.1. Condiciones de sonicación.....	12
3.2.2. Obtención de metano	13
3.3. Métodos analíticos	13
3.3.1. Sólidos suspendidos	13
3.3.2. DQO total y DQO soluble	13
3.3.3. Nitrógeno total y nitrógeno total soluble	13
3.3.4. Amonio.....	14
3.3.5. Fósforo total	15
3.3.6. Fosfatos	15
3.3.7. Sulfatos.....	15
3.4. Método de concentración de microalgas	15
3.5. Sonificador.....	16
3.6. Sytox.....	16

3.7.	Producción de metano	19
4.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	21
4.1.	Experimento 1: <i>Monoraphidium braunii</i>	21
4.1.1.	Caracterización de la biomasa algal.....	21
4.1.2.	Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo.....	22
4.1.3.	Ensayos de digestión anaerobia en batch	23
4.1.4.	Balance de DQO	24
4.1.4.1.	Producción de metano	24
4.1.4.2.	Reducción del sulfato	29
4.1.5.	Potencial de biometanización y biodegradabilidad	30
4.1.6.	Rendimiento energético	32
4.2.	Experimento 2: <i>Scenedesmus obliquus</i>	33
4.2.1.	Caracterización de la biomasa algal.....	33
4.2.2.	Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo.....	34
4.2.3.	Ensayos de digestión anaerobia en batch	35
4.2.4.	Balance de DQO	37
4.2.4.1.	Producción de metano	37
4.2.4.2.	Reducción del sulfato.....	41
4.2.4.3.	Balance global de DQO.....	41
4.2.5.	Potencial de biometanización y biodegradabilidad	41
4.2.6.	Rendimiento energético	43
4.3.	Experimento 3: Fotobiorreactor	44
4.3.1.	Caracterización de la biomasa algal.....	44
4.3.2.	Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo.....	45
4.3.3.	Ensayos de digestión anaerobia en batch	46
4.3.4.	Balance de DQO	47

4.3.4.1.	Producción de metano	47
4.3.4.2.	Reducción del sulfato	52
4.3.4.3.	Balance global de DQO.....	52
4.3.5.	Potencial de biometanización y biodegradabilidad	53
4.3.6.	Rendimiento energético	54
4.4.	Experimento 4: <i>Chlorella vulgaris</i>	55
4.4.1.	Caracterización de la biomasa algal.....	55
4.4.2.	Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo.....	56
4.4.3.	Ensayos de digestión anaerobia en batch	57
4.4.4.	Balance de DQO	58
4.4.4.1.	Producción de metano	58
4.4.4.2.	Reducción del sulfato.....	63
4.4.4.3.	Balance global de DQO.....	63
4.4.5.	Potencial de biometanización y biodegradabilidad	63
4.4.6.	Rendimiento energético	65
4.5.	Experimento 5: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	66
4.5.1.	Caracterización de la biomasa algal.....	66
4.5.2.	Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo.....	67
4.5.3.	Ensayos de digestión anaerobia en batch	68
4.5.4.	Balance de DQO	68
4.5.4.1.	Producción de metano	69
4.5.4.2.	Reducción del sulfato.....	73
4.5.4.3.	Balance global de DQO.....	73
4.5.5.	Potencial de biometanización y biodegradabilidad	73
4.5.6.	Rendimiento energético	75
4.6.	Comparación de los experimentos	76
5.	CONCLUSIONES	81

6. FUTUROS TRABAJOS	83
7. BIBLIOGRAFÍA	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. <i>Scenedesmus obliquus</i>	5
Ilustración 2. <i>Chlorella vulgaris</i>	5
Ilustración 3. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6
Ilustración 4. <i>Monoraphidium sp.</i>	7
Ilustración 5. Fotómetro Spectroquant® Pharo 300, Merck	14
Ilustración 6. Analizador multimpamétrico de inyección de flujo SmartChem® 200 (AMS).....	14
Ilustración 7. Centrífuga 5804, Eppendorf	15
Ilustración 8. Sonicador S250D, Branson	16
Ilustración 9. De izquierda a derecha y de arriba a abajo, <i>C. reinhardtii</i> , <i>M. braunii</i> y <i>S. obliquus</i> vistas al microscopio óptico con el tinte de ácidos nucleicos Sytox Green	17
Ilustración 10. Microscopio óptico Leica DM 2500	18
Ilustración 11. Equipo AMPTS II de Bioprocess Control. De izquierda a derecha, unidad de incubación, unidad de fijación de gases y unidad de medida.....	19

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Esquema con las condiciones de sonicación a realizar sobre cada especie de microalgas.....	12
Gráfico 2. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas <i>M. braunii</i> del Experimento 1	25
Gráfico 3. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 1 con cinéticas de primer orden.....	27
Gráfico 4. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 1 con cinéticas de segundo orden	28
Gráfico 5. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas <i>S. obliquus</i> del Experimento 2	37
Gráfico 6. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 2 con cinéticas de primer orden.....	39
Gráfico 7. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 2 con cinéticas de segundo orden	39
Gráfico 8. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas del FBR del Experimento 3.....	48
Gráfico 9. Comparación de la producción de metano producida por fango normal y por rumen durante la digestión anaerobia de las microalgas del FBR del Experimento 3	48
Gráfico 10. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 3 con cinéticas de primer orden.....	50
Gráfico 11. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 3 con cinéticas de segundo orden	51
Gráfico 12. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas <i>C. vulgaris</i> del Experimento 4.....	59
Gráfico 13. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 4 con cinéticas de primer orden.....	61
Gráfico 14. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 4 con cinéticas de segundo orden	61
Gráfico 15. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas <i>C. reinhardtii</i> del Experimento 5	69

Gráfico 16. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 5 con cinéticas de primer orden.....	71
Gráfico 17. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 5 con cinéticas de segundo orden.....	71
Gráfico 18. Comparación de la biodegradabilidad de <i>M. braunii</i> y <i>S. obliquus</i> frente a la energía aplicada en el pretratamiento	77
Gráfico 19. Comparación de la biodegradabilidad de las algas del fotobiorreactor, <i>C. vulgaris</i> y <i>C. reinhardtii</i> frente a la energía aplicada en el pretratamiento.....	77
Gráfico 20. Comparación de la viabilidad de <i>M. braunii</i> y <i>S. obliquus</i> frente a la energía aplicada en el pretratamiento	79
Gráfico 21. Comparación de la viabilidad de las algas del fotobiorreactor, <i>C. vulgaris</i> y <i>C. reinhardtii</i> frente a la energía aplicada en el pretratamiento	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización inicial de las microalgas <i>M. braunii</i> del Experimento 1	22
Tabla 2. Caracterización tras la sonicación de las microalgas <i>M. braunii</i> y el inóculo del Experimento 1	23
Tabla 3. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 1	23
Tabla 4. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 1	24
Tabla 5. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 1	26
Tabla 6. Valores de los parámetros cinéticos y el error de la modelización en cinéticas de primer y segundo orden para las microalgas del Experimento 1	29
Tabla 7. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas <i>M. braunii</i> del Experimento 1	30
Tabla 8. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas <i>M. braunii</i> del Experimento 1	31
Tabla 9. Balance energético realizado para el Experimento 1	33
Tabla 10. Caracterización inicial de las microalgas <i>S. obliquus</i> del Experimento 2	34
Tabla 11. Caracterización tras la sonicación de las microalgas <i>S. obliquus</i> y el inóculo del Experimento 2	35
Tabla 12. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 2	35
Tabla 13. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 2	36
Tabla 14. Caracterización de las muestras tras la digestión anaerobia de las microalgas <i>S. obliquus</i> del Experimento 2	36
Tabla 15. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 2	38
Tabla 16. Valores de los parámetros cinéticos y el error de la modelización en cinéticas de primer y segundo orden para las microalgas del Experimento 2	40
Tabla 17. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas <i>S. obliquus</i> del Experimento 2	41
Tabla 18. Balance global de DQO para las microalgas <i>S. obliquus</i> del Experimento 2 ..	41
Tabla 19. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas <i>S. obliquus</i> del Experimento 2	42

Tabla 20. Balance energético realizado para el Experimento 2.....	43
Tabla 21. Caracterización inicial de las microalgas del FBR del Experimento 3.....	44
Tabla 22. Caracterización tras la sonicación de las microalgas del FBR y el inóculo del Experimento 3.....	45
Tabla 23. Caracterización del Rumen para el Experimento 3.....	45
Tabla 24. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 3.....	46
Tabla 25. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 3.....	46
Tabla 26. Caracterización de las muestras tras la digestión anaerobia de las microalgas del FBR del Experimento 3.....	47
Tabla 27. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 3....	49
Tabla 29. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas del FBR del Experimento 3.....	52
Tabla 30. Balance global de DQO para las microalgas del FBR del Experimento 3.....	52
Tabla 31. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas del FBR del Experimento 3.....	53
Tabla 32. Balance energético realizado para el Experimento 3.....	54
Tabla 33. Caracterización inicial de las microalgas <i>C. vulgaris</i> del Experimento 4.....	56
Tabla 34. Caracterización tras la sonicación de las microalgas <i>C. vulgaris</i> y el inóculo del Experimento 4.....	57
Tabla 35. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 4.....	57
Tabla 36. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 4.....	58
Tabla 37. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 4....	60
Tabla 39. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas <i>C. vulgaris</i> del Experimento 4.....	63
Tabla 40. Balance global de DQO para las microalgas <i>C. vulgaris</i> del Experimento 4...	63
Tabla 41. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas <i>C. vulgaris</i> del Experimento 4.....	64
Tabla 42. Balance energético realizado para el Experimento 4.....	65
Tabla 43. Caracterización inicial de las microalgas <i>C. reinhardtii</i> del Experimento 5.....	66

Tabla 44. Caracterización tras la sonicación de las microalgas <i>C. reinhardtii</i> y el inóculo del Experimento 5	67
Tabla 45. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 5	67
Tabla 46. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 5	68
Tabla 47. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 5....	70
Tabla 49. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas <i>C. reinhardtii</i> del Experimento 5	73
Tabla 50. Balance global de DQO para las microalgas <i>C. reinhardtii</i> del Experimento 5.....	73
Tabla 51. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas <i>C. reinhardtii</i> del Experimento 5	74
Tabla 52. Balance energético realizado para el Experimento 5.....	75
Tabla 53. Biodegradabilidad de las distintas especies de microalgas	76
Tabla 54. Cantidad de células no viables de las distintas especies de microalgas.....	78

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha ido haciendo patente el paulatino agotamiento de los combustibles fósiles y la necesidad de avanzar en la viabilidad de nuevas fuentes de energía. Además, también ha aumentado la preocupación por la conservación del medio ambiente y la reducción de los efectos que causa el uso de los combustibles fósiles (*Ras et al., 2011*).

Todo esto ha llevado a la investigación sobre biocombustibles, que son una fuente de energía renovable procedente de la biomasa. Ésta puede proceder por ejemplo de cultivos terrestres como la caña de azúcar o la soja. Sin embargo, se necesitan grandes extensiones de cultivo y altas cantidades de agua para obtener bajas productividades de biomasa (*Ras et al., 2011*).

El siguiente paso en la investigación sobre biocombustibles ha sido la utilización de materias primas a base de algas ya que tienen una alta productividad de biomasa por área y un mayor contenido en lípidos y otros productos de valor (*Frigon et al., 2013*). A pesar de que la investigación está centrada en la producción de biodiésel, ésta ha resultado no ser un proceso energéticamente viable ya que se necesita un control de los nutrientes y la cosecha, la optimización de la extracción de grasas y la digestión anaerobia de las tortas de aceite (*González-Fernández et al., 2012*).

Por ello, recientemente la investigación ha evolucionado hacia la producción de biogás a partir de la digestión anaerobia de las microalgas, ya que se trata de un proceso menos complejo y más directo. Además, la capacidad de las microalgas de crecer en aguas residuales conlleva grandes ventajas ya que, además de depurar las aguas, éstas aportan los nutrientes necesarios para su crecimiento, reduciendo los costes del tratamiento (*González-Fernández et al., 2012*).

Sin embargo, el inconveniente que presenta este proceso es la dependencia del rendimiento obtenido con la composición celular de la especie de microalga utilizada. La compleja estructura y composición de la pared celular frena el proceso de hidrólisis, haciendo necesario el uso de pretratamientos para llegar a romperla o dañarla y, así mejorar la producción de biogás (*Passos et al., 2015*).

Los pretratamientos más utilizados son el térmico (hidrotérmico, térmico y térmico con explosión de vapor), mecánico (ultrasonidos y microondas), químico (reactivos ácidos y básicos) y biológico (enzimático).

1.1. Ultrasonidos

Los ultrasonidos consisten en ciclos de rápida compresión y descompresión de las ondas sónicas. Los ciclos continuos generan cavitación, que es la formación de regiones con vapor líquido dentro de la célula, también llamadas microburbujas. Estas microburbujas son formadas por el movimiento de moléculas líquidas a causa de las ondas acústicas. Dependiendo principalmente de la intensidad de los ultrasonidos, las microburbujas son comprimidas hasta su mínimo e implosionan produciendo calor, radicales libres, altas presiones, ondas de choque y, finalmente, rompen la pared celular.

Los ultrasonidos pueden ser aplicados a bajas frecuencias (< 50 kHz) o a altas frecuencias (> 50 kHz). Las bajas frecuencias favorecen los efectos mecánicos mientras que las altas favorecen la formación de radicales libres. Una vez que se fija la frecuencia, los parámetros controlables que influyen en el pretratamiento son la potencia y el tiempo de exposición. La energía específica aplicada durante el pretratamiento se puede calcular de la siguiente manera:

$$E_S \text{ (MJ/kg SS)} = \frac{P \cdot t}{V_m \cdot SS} \quad (1)$$

Siendo:

- P la potencia aplicada (W)
- t el tiempo de exposición al pretratamiento (s)
- V_m el volumen de muestra al que se aplica el pretratamiento (l)
- SS los sólidos suspendidos de la muestra (kg)

El pretratamiento con ultrasonidos promueve la rotura de la pared celular de las microalgas y la solubilización de la materia orgánica; sin embargo, los resultados dependen de la especie de microalgas y de las condiciones del pretratamiento, especialmente la energía específica aplicada.

De hecho según estudios realizados, el incremento del rendimiento de metano no excede el 20% con energías específicas aplicadas menores de 75 MJ/ kg ST (*Alzate et al., 2012; González-Fernández et al., 2012*). Sin embargo se incrementa en un 80-90% con energías específicas aplicadas de entre 100 y 200 MJ/kg ST (*González-Fernández et al., 2012*).

Aunque los resultados experimentales indican que cuanto más energía específica se aplica mayor es el incremento en el rendimiento de metano, la alta demanda de electricidad para la sonicación puede desequilibrar la energía consumida y producida haciendo que el proceso no sea viable energéticamente (*Passos et al., 2014; Alzate et al., 2012; González-Fernández et al., 2012*).

Para llevar a cabo el pretratamiento se utiliza un sonicador, que es un instrumento electrónico formado por tres componentes principales: la fuente de alimentación, el convertidor y el cuerno (también conocido como sonda).

La fuente de alimentación transforma la corriente alterna en energía eléctrica de alta frecuencia. Proporciona pulsos de energía de alto voltaje a una frecuencia determinada que transmite al convertidor.

El convertidor transforma la energía eléctrica en vibraciones mecánicas. La vibración es amplificada y transmitida a toda la longitud de la sonda, causando cavitación. Incrementando la amplitud, la intensidad de la cavitación dentro de la muestra también se incrementa.

El sonicador puede funcionar de dos modos:

- A pulsos: las vibraciones se transmiten con un ratio de un pulso por segundo. La duración del pulso puede ajustarse de 0.1 a 0.9 por segundo, permitiendo que la muestra sea procesada a alta intensidad pero sin aumentar la temperatura.
- Continuo: la potencia depende de la carga en la superficie de la sonda, por lo que cuanto más viscoso sea el líquido, mayor será la carga y mayor la potencia requerida (*Branson, 2011*).

1.2. Microalgas

Según los ficólogos, un alga es cualquier organismo con clorofila *a* y un tallo no diferenciado en raíces, tallo y hojas. El término microalga hace referencia a las algas microscópicas en sentido estricto y a las bacterias fotosintéticas oxigénicas.

Las microalgas se encuentran por todo el mundo. Se distribuyen principalmente en las aguas, pero también se encuentran en la superficie de todo tipo de suelos. Aunque en general viven libres, un cierto número de microalgas viven en asociación simbiótica con una variedad de otros organismos.

Las microalgas tienen diferentes tipos de organización celular: unicelulares, coloniales o filamentosas. Las células únicas pueden ser subdivididas en no móviles, tipo ameba y células móviles. La organización unicelular a menudo ejemplifica en una sola célula las características morfológicas, citológicas y fisiológicas del grupo. Las colonias se forman por la agregación de productos de la división celular en una masa mucilaginosa, por la

yuxtaposición de células a punto de dividirse o por la agregación de células móviles. Los filamentos son formados por la repetida división transversal de células sin separación de las células hijas (*Round, 1973*).

Las microalgas eucariotas poseen un núcleo rodeado por una membrana que contiene la mayor parte del genoma distribuido en un conjunto de cromosomas y nucleolos. Tienen el citoplasma dividido en compartimentos y en orgánulos con membrana (el aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplasmático, vacuolas, centriolos y plastos) dedicados a funciones específicas.

La pared celular de las microalgas eucariotas está generalmente compuesta por una capa microfibrilar de celulosa que puede estar rodeada por una capa amorfa. La pared celular es secretada por el aparato de Golgi y puede ser silicatada o calcificada e incluso ser fortalecida con placas o escamas. Sin embargo, algunas especies carecen de pared celular.

Las clorofitas, o algas verdes, abarcan un gran número de organismos con una gran variabilidad morfológica. Tienen clorofila *a* y *b* y varios carotenoides, que pueden ser sintetizados y acumulados fuera del cloroplasto bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno u otras situaciones de estrés. La pared celular generalmente contiene celulosa.

Son principalmente de agua dulce, pero un gran número crecen en hábitats marinos, terrestres y subaéreos. Algunas especies se encuentran en asociaciones simbióticas, en su mayoría con líquenes (*Tomaselli, 2004*).

1.2.1. Especies

Las especies de microalgas utilizadas en el desarrollo de este proyecto son las siguientes: *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Monoraphidium braunii*. A continuación, se describen cada una de estas especies en más profundidad, especialmente en lo relativo a su pared celular.

1.2.1.1. *Scenedesmus obliquus*

Esta especie de microalga posee una excelente habilidad para el tratamiento de aguas residuales, captación de CO₂ y producción de biodiesel. Además, contiene altos porcentajes de proteínas y lípidos.

Tiene una de las paredes celulares más resistentes ya que está compuesta por multicapas de celulosa y hemicelulosa por el interior y esporopolenina y politerpenos por el exterior. Además, a veces puede haber depósitos de sílice, quitina y calcio.

Además, la pared celular también contiene altas proporciones de aminoácidos (de los que un 30% son proteínas) y lípidos. La estructura que tiene es trilaminar. Las capas de la pared exterior son resistentes al tratamiento con numerosas enzimas líticas, así como a

tratamientos químicos no oxidativos. En las capas de la pared interior hay celulosa y lípidos insolubles resistentes a la acetólisis, que contribuyen a la rigidez de la pared celular. Otros constituyentes que pueden encontrarse son glucosamina y glucoproteínas (Voigt et al., 2014).



Ilustración 1. *Scenedesmus obliquus*

1.2.1.2. *Chlorella vulgaris*

Esta especie de microalga crece fácilmente y se multiplica muy rápido, resistiendo duras condiciones y contaminación y tiene una gran variedad de componentes de alto valor añadido (Safi et al., 2015).

Tiene la pared celular compuesta predominantemente de hemicelulosa y sacáridos que impiden la liberación de moléculas biológicas intracelulares (Aderemi et al., 2015).

Tiene un alto contenido en proteínas que están localizadas en diferentes partes de la célula: representan parte de la pared celular, así como el citoplasma, el cloroplasto y todos los orgánulos dentro de la pared celular.

Durante la maduración, la pared celular incrementa gradualmente su espesor donde se detecta una capa microfibrilar que da rigidez adicional a la pared celular y mejora la resistencia (Safi et al., 2015).

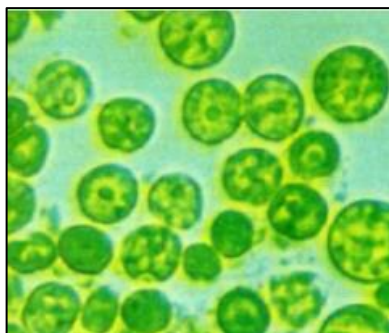


Ilustración 2. *Chlorella vulgaris*

1.2.1.3. *Chlamydomonas reinhardtii*

El género *Chlamydomonas* es capaz de crecer en la oscuridad con una fuente orgánica de carbono mientras mantiene un aparato fotosintético funcional (Merchant et al., 2007).

Este tipo de alga tiene dos flagelos anteriores, un cloroplasto basal que rodea uno o más pirenoides y una pared celular distintiva. Esta especie se distingue por presentar diferencias en el tamaño y la forma de las células, forma y posición del cloroplasto y los pirenoides, la longitud de los flagelos, el número y la posición de las vacuolas y otras características más sutiles visibles a nivel microscópico (Harris E H, 2001).

La pared celular se compone de 5 capas estructuralmente distintas: la capa más interna y la más externa se componen de redes de fibras sueltas formando una cuadrícula cristalina, y un triplete central que consiste en dos capas densas y una capa granular entre ellas (Keskiäho et al., 2007).

A diferencia de las otras especies de microalgas, ésta no contiene celulosa en su composición. Principalmente está compuesta de carbohidratos y una estructura insoluble de glucoproteínas ricas en hidroxiprolina y glucoproteínas ricas en glicina. La estructura insoluble está localizada en las capas interiores mientras que las exteriores están formadas por glucoproteínas caotrópico solubles (Voigt et al., 2014; Domozych et al., 2012; Voigt et al., 1997).



Ilustración 3. *Chlamydomonas reinhardtii*

1.2.1.4. *Monoraphidium braunii*

Esta especie de microalga puede ser encontrada habitualmente en muchos ambientes acuáticos templados y tropicales, especialmente en aquellos con alto contenido en nutrientes.

Se agrupan en células individuales, fusiformes, cilíndricas, más largas que anchas, rectas, curvas o sigmoidal, en ocasiones en espiral, la anchura va disminuyendo gradualmente hacia el vértice, que puede ser cónico o redondeado.

La pared celular es suave y contiene cloroplastos parietales sin pirenoides. Está compuesta en un 47% de azúcares, en un 16% de proteínas, en un 6.1% de ácidos urónicos, un 0.4% se trata de glucosamina y el 31% restante son compuestos desconocidos. La reproducción se lleva a cabo mediante 4 a 8 autoesporas, dispuestas en serie dentro de la célula madre, que son liberadas después de romper su pared celular en dos partes (*Passos et al., 2015; Ramos et al., 2012; Fawley et al., 2005*).



Ilustración 4. Monoraphidium sp.

1.3. Proceso de digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia consiste en una fermentación microbiana en ausencia de oxígeno que produce una mezcla de gases, llamada biogás, y un lodo con los microorganismos que causan la degradación de la materia orgánica.

El biogás producido como resultado del proceso es una mezcla de gases compuesta principalmente por metano (en torno a un 50-70%) y dióxido de carbono (entre un 30-50%). También se pueden encontrar pequeñas concentraciones de otros gases como sulfuro de hidrógeno, amoníaco, nitrógeno o hidrógeno. La composición del gas depende de las materias primas utilizadas y del proceso en sí.

El lodo producido como resultado de la biodegradación de la materia orgánica es una mezcla del influente estabilizado y la biomasa microbiana producida durante el proceso. Como además es un producto más mineralizado, presenta altas concentraciones de nitrógeno amoniacal y poco nitrógeno orgánico.

El proceso de digestión anaerobia puede verse afectado por numerosos factores físicos y químicos, siendo los más importantes los siguientes:

- Composición del sustrato: dependiendo de la composición del sustrato utilizado, tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos, variará el proceso de digestión y la composición del biogás.

- Nutrientes: para el correcto crecimiento de las bacterias, éstas deben disponer de las cantidades adecuadas de nitrógeno y fósforo, así como carbono, azufre y algunas sales minerales.
- Presencia de inhibidores: existen numerosas sustancias que pueden ser perjudiciales para los microorganismos que llevan a cabo el proceso, llegando a inhibirlo. Sin embargo, la toxicidad de una sustancia depende de su concentración y no simplemente de su presencia en el medio.
- Concentración de sólidos: se ha encontrado una relación directamente proporcional entre la cantidad de sólidos suspendidos presentes y la eficiencia del proceso.
- pH: este parámetro no solamente tiene efecto sobre la actividad enzimática de los microorganismos sino también sobre los compuestos del sistema ya que cambia los grupos hidrolizables de las enzimas y altera los compuestos no enzimáticos. Además, la concentración de protones también influye sobre las reacciones químicas, bioquímicas y biológicas que se producen en el medio. Por tanto, el valor óptimo de pH para la digestión anaerobia está alrededor de 7.
- Temperatura: este es el parámetro más influyente en el proceso ya que está relacionado con las velocidades de reacción de cualquier proceso biológico, la composición del biogás debido a la dependencia de la solubilidad de los gases con la temperatura y el daño que puede causar a los microorganismos. Se pueden diferenciar dos rangos de trabajo dependiendo de la temperatura a la que se opere: mesófilo entre 20 y 45°C y termófilo entre 45 y 60°C, cuyas temperaturas óptimas son 35 y 55°C, respectivamente.

A pesar de todos los parámetros que hay que controlar para que el proceso funcione correctamente, la digestión anaerobia lleva asociadas una serie de ventajas frente al proceso de digestión aerobia. Por ejemplo, el consumo de energía es menor ya que no es necesario airear y además se produce biogás que puede ser utilizado para la producción de energía. También se tiene menor producción de fango ya que la materia orgánica se transforma en biogás y, además, este fango es más fácil de estabilizar y deshidratar y puede ser utilizado como fertilizante agrícola.

Sin embargo, si el fango no está inoculado en el arranque, éste puede ser muy lento y el proceso lleva asociado la producción de malos olores por lo que es necesario instalar un sistema de control de olores.

A lo largo del proceso se pueden diferenciar cuatro etapas diferentes:

- **Hidrólisis:** durante esta etapa la materia orgánica suspendida es solubilizada para poder ser utilizada por las bacterias y las moléculas orgánicas de gran tamaño se transforman en otras más simples para que puedan ser transportadas a través de la pared celular. Este proceso se produce gracias a las enzimas que excretan las bacterias hidrolíticas.
- **Acidogénesis:** en esta etapa los productos obtenidos en la etapa de hidrólisis (principalmente aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga) se degradan en ácidos orgánicos de cadena corta; principalmente acético, propiónico y butírico.
- **Acetogénesis:** durante esta etapa los ácidos producidos anteriormente se convierten en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono.
- **Metanogénesis:** el producto resultante de esta etapa es el metano, pero puede llegar a formarse bien mediante el consumo de ácido acético por parte de las bacterias metanogénicas acetoclásticas o bien mediante hidrógeno y dióxido de carbono, que consumen las bacterias hidrogenotróficas (*Obaya Abreu, 2005*).

1.4. Reducción del sulfato

Cuando en el medio anaerobio hay presente una cantidad significativa de sulfatos, es posible que se desarrollen bacterias sulfatorreductoras que transforman esos sulfatos en sulfuro de hidrógeno.

Esto es importante ya que, si la concentración de sulfuros sobrepasa un determinado valor, las bacterias metanogénicas se inhiben. Además, aunque el proceso no llegue a inhibirse, una concentración alta de sulfuros en el biogás hace que éste no pueda ser utilizado y conlleva graves problemas de corrosión en tuberías y equipos (*Obaya Abreu, 2005*).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal que se plantea en este trabajo es estudiar cómo influye la aplicación previa de un pretratamiento con ultrasonidos en la biodegradabilidad anaerobia de distintas especies de microalgas.

Para la consecución del objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos secundarios:

- Comparar la biodegradabilidad anaerobia de distintas especies de microalgas con y sin aplicación de pretratamiento.
- Modelizar con cinéticas de primer y segundo orden los resultados de los ensayos de biodegradabilidad anaerobia realizados.
- Estudiar el efecto de aplicar sobre las muestras distintas potencias y tiempos en el pretratamiento, así como el efecto de la aplicación de diferentes energías.
- Evaluar el efecto del pretratamiento mediante cuantificación visual con microscopio y tinte de ácidos nucleicos Sytox Green.
- Comparar los resultados de cuantificación visual al microscopio con la biodegradabilidad anaerobia.
- Realizar una valoración energética del pretratamiento, comparando la energía que requiere la aplicación del pretratamiento con la energía que se obtiene de la mayor producción de biogás.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Las cepas de microalgas utilizadas para este trabajo han sido *Scenedesmus obliquus* (SAG 276-3a), *Chlorella vulgaris* (SAG 211-12), *Chlamydomonas reinhardtii* (SAG 11-32b) y *Monoraphidium braunii* (SAG 48-87), procedentes de la Colección de Cultivos de algas (SAG) de la Universidad de Göttingen (Alemania). También se ha utilizado una muestra real de planta piloto proveniente del fotobioreactor situado en la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) del Carraixet.

El inóculo de fangos utilizado procede de los fangos del digestor anaerobio de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) del Carraixet.

3.2. Desarrollo de los experimentos

Para comprobar la eficacia del pretratamiento realizado sobre las microalgas y la mejora en su biodegradabilidad, se van a llevar a cabo una serie de experimentos sobre cada una de las cepas de microalgas utilizadas.

Los pasos a seguir son los siguientes:

- En primer lugar se realiza una caracterización inicial de la muestra a estudiar, analizando diversos parámetros como el contenido en sólidos, la demanda química de oxígeno (DQO) y los nutrientes (nitrógeno total y soluble, amonio, fósforo total, fosfatos y sulfatos).

- A continuación, se concentra la muestra mediante una centrífuga para obtener una demanda química de oxígeno de unos 6000 mg/l. Así se asegura que la cantidad de sustrato y de inóculo introducida en el bioproceso sea similar.

- Seguidamente, la muestra se somete al pretratamiento que consiste en una sonicación con unas condiciones determinadas de potencia y tiempo para romper la pared celular de las microalgas y aumentar su biodegradabilidad.

- Después, se realiza una observación al microscopio para comprobar que el pretratamiento ha sido efectivo y la mayoría o la totalidad de las células están dañadas. Para llevar a cabo esta observación se utiliza un tinte de ácidos nucleicos (Sytox Green) que permite diferenciar las células viables de las no viables.

- Tras esto se vuelve a analizar la demanda química de oxígeno para comprobar que se ha llegado a la concentración deseada tras el proceso de concentración.

- Finalmente, la muestra se introduce junto con el inóculo anaerobio en pequeños reactores batch para llevar a cabo un proceso de digestión anaerobio y medir la cantidad de biogás producido.

3.2.1. Condiciones de sonicación

El proceso de sonicación se ve influenciado por dos variables: la potencia y el tiempo aplicados sobre la muestra. Por lo que, para comprobar la influencia de estas variables, se ha sometido la muestra de microalgas procedentes del fotobioreactor a una energía de sonicación de 150 MJ/kg SS variando la potencia y el tiempo.

La energía de sonicación se ha elegido tras la revisión bibliográfica (*Passos et al., 2014 y 2015, González-Fernández et al., 2012*) donde se ha comprobado que se obtiene una mejora de la biodegradabilidad para energías superiores a 100 MJ/kg ST.

Aplicando la ecuación 1, para una energía específica de 150 MJ/kg SS y para tres potencias distintas de 30W, 40W y 50W, se obtienen los tiempos de sonicación que hay que aplicar a las muestras. Combinando la menor potencia con el tiempo más corto y la potencia mayor con el tiempo más largo, se obtienen dos ensayos experimentales adicionales cuya energía es necesario calcular aplicando de nuevo la ecuación 1.

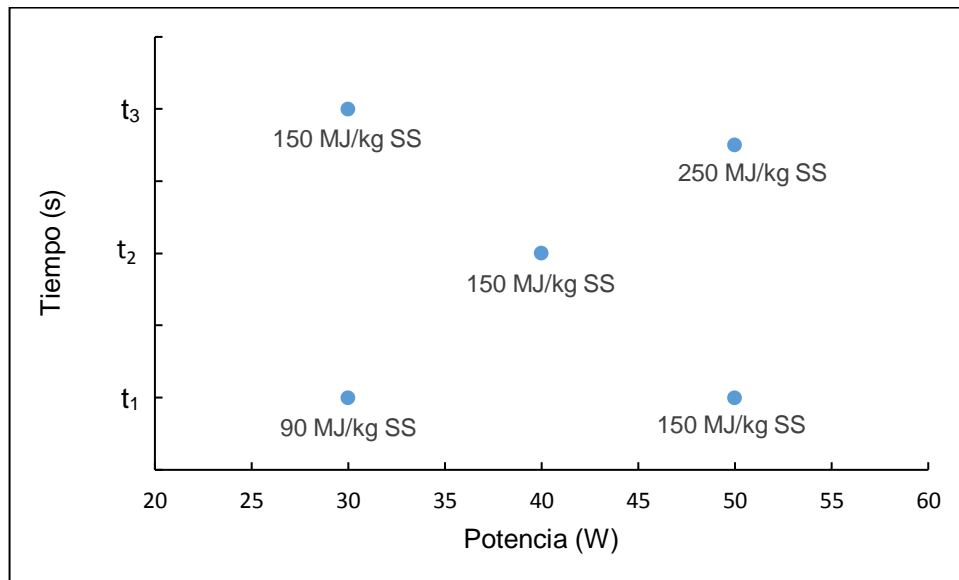


Gráfico 1. Esquema con las condiciones de sonicación a realizar sobre cada especie de microalgas

Como se puede comprobar en el gráfico, dos de los puntos ensayados tienen una energía aplicada distinta ya que también se quiere estudiar la influencia de esta variable sobre la producción de biogás.

3.2.2. Obtención de metano

Con la influencia de las variables sobre el proceso analizada, también se ha estudiado la relación entre la energía aplicada y la cantidad de células con la pared celular rota y, por tanto, el volumen de metano producido. Esto sirve para comprobar si la energía resultante obtenida del biogás producido compensa la energía utilizada en el proceso de sonicación.

3.3. Métodos analíticos

Para la caracterización de las muestras se realiza un análisis inicial de la cantidad de sólidos presentes (sólidos suspendidos SS), la demanda química de oxígeno (DQO) total y soluble, y una serie de nutrientes presentes en la muestra: nitrógeno total y total soluble, amonio, fósforo total, fosfatos y sulfatos.

3.3.1. Sólidos suspendidos

Los sólidos suspendidos (SS) se determinan mediante el método gravimétrico propuesto por el Standard Methods (2540-D). Consiste en medir la diferencia de peso de 25 ml de muestra filtrados con un filtro de tamaño de poro de 0.45 μm , antes y después de permanecer durante 24 horas en una estufa a 105°C para eliminar la humedad.

3.3.2. DQO total y DQO soluble

El procedimiento seguido para la determinación de la DQO total y la DQO soluble es el método de reflujo total propuesto en el Standard Methods (5220-C), cuyo rango de aplicabilidad está comprendido entre 50 y 800 mg/l. Sin embargo, para la DQO soluble, la muestra debe ser filtrada previamente con un filtro de tamaño de poro de 0.45 μm .

Se utiliza un oxidante fuerte como el dicromato potásico para oxidar toda la materia orgánica presente en la muestra y el sulfato de plata para catalizar la reacción. La muestra se introduce en un baño calefactado a 140°C durante 2 horas para digerir todo el contenido orgánico.

Tras la digestión, se valora la muestra con la sal de Mohr utilizando ferroína como indicador hasta que el color de la muestra vire de verde a marrón. El cambio de color se produce por la reducción del ión dicromato (naranja) a cromo +3 (verde) al oxidar la materia orgánica de la muestra. En presencia de la ferroína, y al añadir sal de Mohr, se va consumiendo el dicromato hasta que se produce un exceso de ión hierro +2 (marrón).

3.3.3. Nitrógeno total y nitrógeno total soluble

Para el análisis de estos parámetros se utiliza un kit de la marca Merck (número 114537) cuyo rango de medida comprende de 5.0 a 15.0 mg/l. El procedimiento es el mismo para ambos parámetros con la excepción que para el nitrógeno total soluble se debe filtrar la muestra con un filtro de 0.45 μm de tamaño de poro.

La técnica consiste en oxidar todo el nitrógeno presente en la muestra a nitratos mediante una digestión ácida a 120°C durante 1 hora. Después se mide la concentración de nitratos con un fotómetro a 338 nm.



Ilustración 5. Fotómetro Spectroquant® Pharo 300, Merck

3.3.4. Amonio

Para el análisis del nitrógeno amoniacal se ha utilizado un analizador automático, Smartchem 200 (Analyzer Medical System), de la empresa Westco Scientific Instruments, cuyo error de medida es menor del 10%.



Ilustración 6. Analizador multiparamétrico de inyección de flujo SmartChem® 200 (AMS)

El rango de medida va de 1 a 7.76 mg/l y la medición se realiza según el método conforme con US EPA 350.1 y Standard Methods 4500-NH₃-G, habiendo filtrado previamente la muestra con un filtro de 0.45 µm.

3.3.5. Fósforo total

Para la cuantificación del fósforo total se realiza una digestión ácida a 150°C durante 2 horas para pasar todo el fósforo presente en la muestra a ortofosfatos. Tras enfriar la muestra se ajusta el pH y se filtra para, finalmente, analizarla con el equipo Smartchem 200 (Analyzer Medical System).

3.3.6. Fosfatos

Para el análisis de los fosfatos también se ha utilizado el analizador automático, Smartchem 200 (Analyzer Medical System).

El rango de medida va de 0 a 3.2 mg/l y la medición se realiza según el método conforme con US EPA 365.1 y Standard Methods 4500-P-F, habiendo filtrado previamente la muestra con un filtro de 0.45 µm.

3.3.7. Sulfatos

Para el análisis de los sulfatos se ha utilizado de nuevo el analizador automático, Smartchem 200 (Analyzer Medical System).

El rango de medida va de 0 a 80 mg/l y la medición se realiza según el método conforme con US EPA 370.2 y Standard Methods 4500-SO₄²⁻-F, habiendo filtrado previamente la muestra con un filtro de 0.45 µm.

3.4. Método de concentración de microalgas

Para llevar a cabo la concentración de las microalgas y obtener un valor de DQO de en torno a 6000 mg/l, se ha utilizado una centrifugación. Este método consiste en aplicar una fuerza rotativa mayor que la fuerza de la gravedad para que las microalgas sedimenten en el fondo del tubo y se puedan separar del sobrenadante.

La centrifugadora que se ha utilizado es la Centrifuge 5804 de la empresa Eppendorf.



Ilustración 7. Centrifuga 5804, Eppendorf

3.5. *Sonicador*

El sonicador utilizado es el modelo S250D de la empresa Branson, cuya potencia máxima de salida es de 200W y la frecuencia utilizada es de 20 kHz.



Ilustración 8. Sonicador S250D, Branson

Para evitar el aumento excesivo de temperatura durante el proceso de sonicación, todas las muestras se han mantenido dentro de un baño con hielo. También se ha asegurado que la punta de la sonda estuviera bien sumergida en el líquido para evitar la formación de espumas. (*Branson, 2011*)

3.6. *Sytox*

Para comprobar cualitativamente la rotura de la pared celular en las distintas especies de microalgas estudiadas se ha utilizado el tinte Sytox Green de ácidos nucleicos (Invitrogen S7020). Este tinte tiene una alta afinidad por los ácidos nucleicos y penetra fácilmente en las células cuya membrana plasmática está dañada, pero no atraviesa las membranas de las células vivas.

Tras una pequeña incubación con el tinte, los ácidos nucleicos de las células dañadas emiten una fluorescencia verde brillante cuando son excitadas a 488 nm con la línea espectral del argón o cualquier otra fuente de 450 - 490 nm. Mientras que aquellas células no dañadas mantienen la coloración roja típica cuando son excitadas a este rango de longitudes de onda.

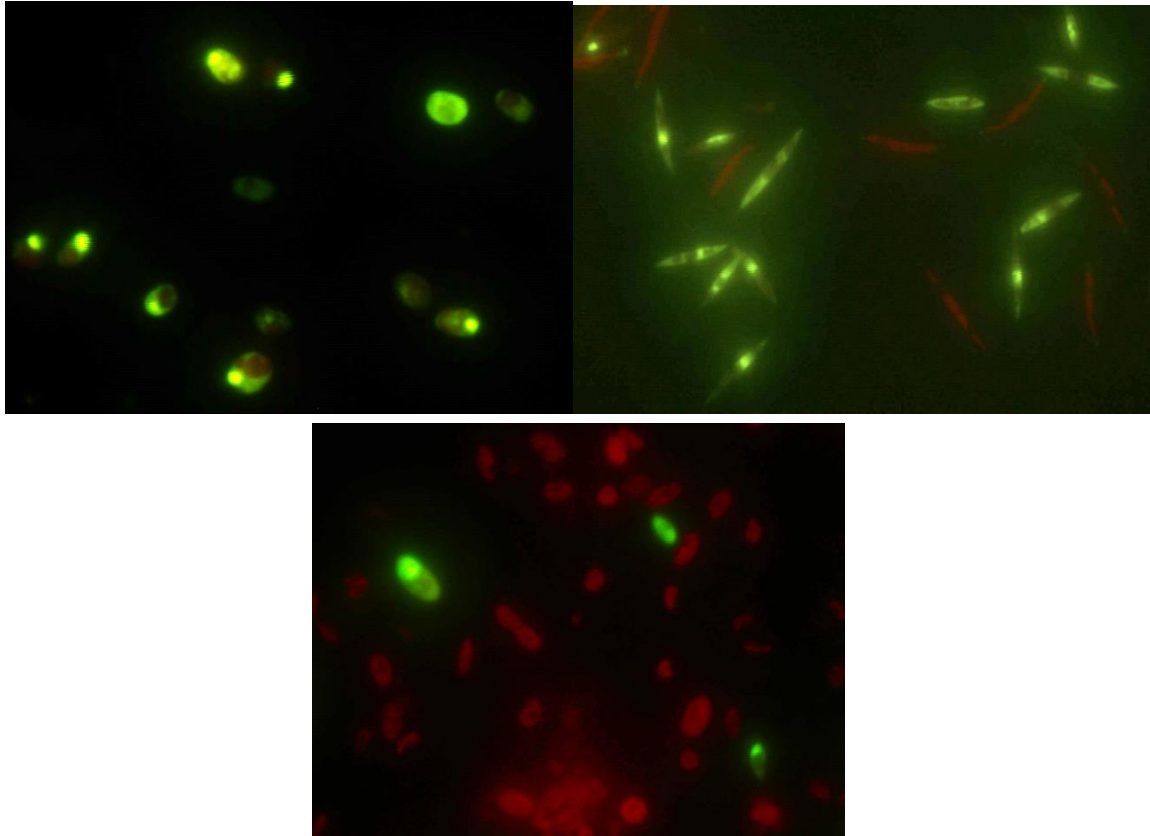


Ilustración 9. De izquierda a derecha y de arriba a abajo, C. reinhardtii, M. braunii y S. obliquus vistas al microscopio óptico con el tinte de ácidos nucleicos Sytox Green

Estas propiedades, combinadas con la mejora de la fluorescencia al enlazarse con ácidos nucleicos, hacen del tinte Sytox Green un indicador simple, e incluso cuantitativo de un solo paso, para usar con microscopios.

Con el método Sytox Green, puesto que el tinte sólo penetra en células con la pared celular dañada, se pueden detectar las células no viables. Sin embargo, en aquellas células con la pared celular intacta el tinte no penetra y presentan autofluorescencia debido a la clorofila, que excitada con una fuente de 450 - 490 nm, presenta una coloración roja. La fluorescencia del Sytox y la autofluorescencia pueden ser utilizadas como marcadores para las células vivas (rojas) y dañadas (verdes) en un único ensayo (Sato *et al.*, 2004).

Algunos factores que pueden influenciar en la tinción son el medio de crecimiento, la densidad celular, la presencia de otros tipos de células...

Para llevar a cabo la tinción de las células de las microalgas, se ha seguido un procedimiento que consiste en la mezcla en un tubo eppendorf de 50 μ l muestra y 0.1 μ l de tinte Sytox Green. Tras un proceso de mezcla y reacción de 5 minutos en completa oscuridad, se pone un poco de muestra sobre una cámara de Thoma y se lleva al microscopio.

El microscopio óptico de epifluorescencia utilizado es el modelo Leica DM 2500 equipado con objetivos de 10X, 40X, 63X y 100X, donde los oculares son 10X consiguiendo un total de 1000 aumentos.



Ilustración 10. Microscopio óptico Leica DM 2500

La fuente de luz utilizada es una lámpara de mercurio. En primer lugar, la luz atraviesa un filtro para seleccionar la longitud de onda adecuada y después incide sobre la muestra, excitando el reactivo y haciendo que emita fotones de una longitud de onda mayor. La luz que emite la muestra llega hasta un segundo filtro cuya longitud de onda seleccionada es la de emisión del reactivo.

La cámara Thoma utilizada tiene una cuadrícula de recuento formada por un cuadro central grande con una superficie de 1 mm². Éste está dividido en 16 cuadrados medianos de 0,0625 mm² y cada uno de estos a su vez, está dividido en 25 cuadrados pequeños. Para realizar los recuentos, se añaden sobre la cuadrícula 10 μ l de muestra y se pone un cubreobjetos sobre ella.

Para la observación al microscopio, se coloca la cámara con la muestra sobre el microscopio. Con el objetivo 10X se centra la cuadrícula mediante el campo claro del microscopio y una vez enfocada, se cambia al objetivo 40X que se coloca sobre cada uno de los cuadros medianos. A continuación, se observa la muestra con epifluorescencia para contar las células viables y las no viables. Este proceso se repite para todos los cuadrados medianos. El método tiene un error del 12% según los cálculos realizados (Roldán, 2015).

3.7. Producción de metano

Para determinar la biodegradabilidad de las muestras y medir la producción de metano se ha realizado un test del potencial de biometanización (BMP). Para ello, se ha utilizado el equipo Automatic Methane Potential Test System II (AMPTS II) de la empresa Bioprocess Control Sweden AB.

Este equipo consta de tres unidades: la unidad de incubación de la muestra, la unidad de fijación del CO₂ y el dispositivo de medida del volumen de metano. La primera unidad consiste en un baño donde se introducen las botellas con las muestras para incubarlas a la temperatura deseada (35°C). Dentro de cada botella hay un pequeño agitador que continuamente va mezclando la muestra.

Cuando se produce biogás, éste pasa a través de la unidad de fijación de gases que consiste en un pequeño bote con sosa para retener las fracciones ácidas del biogás (CO₂ y H₂S) y que solamente llegue el metano a la unidad de medida de flujo de gas húmedo.

Esta unidad trabaja según el principio de desplazamiento líquido y flotabilidad, y es capaz de monitorizar flujos de gas muy bajos. Cada vez que un volumen definido de gas fluye a través del aparato se genera un pulso digital. La unidad utiliza un sistema de adquisición de datos integrado para analizar, mostrar y guardar los datos. Tiene una exactitud del 5% y una precisión del 1% (Bioprocess Control, 2014)



Ilustración 11. Equipo AMPTS II de Bioprocess Control. De izquierda a derecha, unidad de incubación, unidad de fijación de gases y unidad de medida

El test BMP se realiza mediante un ensayo en discontinuo donde el sustrato (microalgas) se mezcla con el inóculo (fango) para biodegradarlo en condiciones anaerobias y medir el volumen de metano generado.

Para conocer el volumen a introducir en las botellas de sustrato y de inóculo, se deben caracterizar previamente, especialmente el valor de DQO. Además, también es importante fijar una relación inóculo/sustrato para poder calcular el volumen a introducir y garantizar que haya más concentración de fango que de microalgas.

Caracterizadas las muestras y fijando la relación inóculo/sustrato, el volumen a introducir de fango y de microalgas se calcula de la siguiente manera:

$$V_S + V_I = 0.4 \text{ l} \quad (2)$$

$$\frac{I}{S} = \frac{V_I \cdot DQO_I}{V_S \cdot DQO_S} \quad (3)$$

Siendo:

- V_S el volumen de sustrato (ml)
- V_I el volumen de inóculo (ml)
- DQO_S la concentración de materia orgánica del sustrato (mg/l)
- DQO_I la concentración de materia orgánica del inóculo (mg/l)

La relación inóculo/sustrato escogida para llevar a cabo los experimentos ha sido de 2 g DQO sustrato/g DQO inóculo. Esto se apoya en que, según los estudios llevados a cabo por *González-Fernández et al., 2009* y *Rasposo et al., 2006* sobre la influencia del ratio inóculo-sustrato, una relación menor de 1 retrasa la producción de metano y no se aprecian diferencias en el volumen de metano producido para relaciones de entre 1 y 3. Al elegir un ratio de 2 g DQO/g DQO se pretende que los volúmenes de sustrato e inóculo a introducir sea similar.

Además, puesto que el fango es capaz de producir metano por sí mismo, es necesario introducir un blanco donde el volumen de sustrato se sustituye por agua. La cantidad de metano producida por el blanco debe restarse al volumen de metano producido en el resto de experimentos, ya que no se debe a la biodegradabilidad de las microalgas.

El tiempo de duración de los ensayos viene determinado por la producción de biogás. Cuando la generación de metano alcance un punto estacionario, se considera que ya no hay más producción y se para el experimento.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este apartado se muestra para cada experimento realizado la caracterización inicial de la biomasa algal, las condiciones de sonicación llevadas a cabo y la caracterización de la biomasa posterior al pretratamiento. Así mismo, se muestran los resultados de la visualización al microscopio, las condiciones establecidas para la digestión anaerobia y la caracterización de las muestras tras el proceso. Finalmente se presenta la gráfica de la evolución de la producción de metano durante el proceso de digestión anaerobia junto con los resultados obtenidos para la biodegradabilidad y el balance energético del proceso.

4.1. Experimento 1: *Monoraphidium braunii*

En este primer experimento se ha utilizado la cepa de microalgas formada por la especie *Monoraphidium braunii* para estudiar su biodegradabilidad y la influencia del método de sonicación sobre la producción de biogás.

4.1.1. Caracterización de la biomasa algal

Para conocer el estado inicial del cultivo de microalgas, se caracteriza la biomasa en términos de DQO, sólidos y nutrientes. Además, esto permite determinar el grado de concentración que deben alcanzar las microalgas y las condiciones de sonicación posteriores.

A continuación se presenta una tabla con la caracterización inicial del cultivo de *Monoraphidium braunii*:

Tabla 1. Caracterización inicial de las microalgas *M. braunii* del Experimento 1

Muestra	Inicio	Unidades
DQO _T	410	mg DQO/l
DQO _{Sol}	72	mg DQO/l
SS	224	mg/l
N _T	8,8	mg N/l
N _{Tsol}	1	mg N/l
NH ₄	0,2	mg N-NH ₄ /l
P _T	5,33	mg P/l
PO ₄	0	mg P-PO ₄ /l
SO ₄	267	mg SO ₄ /l

4.1.2. Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo

El método de concentración utilizado es una centrifugación a una velocidad de 5000 rpm durante un tiempo de 3 minutos. El volumen de concentrado debe ser suficiente para poner las botellas de los ensayos de digestión anaerobia.

El pretratamiento llevado a cabo es una sonicación donde se han probado diferentes energías, así como distintas condiciones de potencia y tiempo para una energía determinada. Así pues, se han llevado a cabo 5 condiciones distintas de sonicación tras las cuales se ha determinado la DQO para cada una de las biomásas y el inóculo utilizado.

En la siguiente tabla se pueden observar los valores de DQO obtenidos.

Tabla 2. Caracterización tras la sonicación de las microalgas *M. braunii* y el inóculo del Experimento 1

Muestra	Inóculo	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS	No sonicado	Unidades
		30W,29min	30W,49min	40W,37min	50W,29min	50W,49min		
DQO _T	23959	11775	4454	5427	5379	7474	11263	mg DQO/l

También se han observado al microscopio cada una de las muestras para comprobar visualmente la eficacia del pretratamiento mediante la utilización del tinte de ácidos nucleicos Sytox Green. Así, se ha hecho un recuento de las células vivas y no viables presentes en las muestras, siendo los resultados obtenidos los siguientes:

Tabla 3. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 1

Muestras	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS
	30W,29min	30W,49min	40W,37min	50W,29min	50W,49min
% células no viables	52.68	59.00	72.49	77.16	93.88

Se puede comprobar que el efecto de la energía aplicada en el pretratamiento es proporcional a la cantidad de células dañadas presentes en las muestras ya que cuanto más energía se aplica (248 MJ/kg SS), más cantidad de células no viables se detectan (93.88%). Además, también se observa que para una misma energía (150 MJ/kg SS) afecta más la aplicación de una mayor potencia que un periodo de tiempo más largo.

4.1.3. Ensayos de digestión anaerobia en batch

El volumen de fango y de microalgas necesario para llevar a cabo el ensayo se ha determinado a partir de las ecuaciones 2 y 3, con una relación inóculo-sustrato de 2 g DQO/g DQO. Así, sustituyendo en las ecuaciones los valores de DQO tanto del fango como de las microalgas se obtienen determinados volúmenes. Sin embargo, finalmente se ha realizado el experimento agrupando los ensayos con DQO similares, y por tanto volúmenes de sustrato parecidos, y se han recalculado las relaciones inóculo-sustrato, obteniéndose los volúmenes y relaciones que se muestran a continuación:

Tabla 4. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 1

Muestra	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS	No sonicado	Blanco 1	Blanco 2
	30W,29 min	30W,49 min	40W,37 min	50W,29 min	50W,49 min			
V _{Sustrato} (l)	0.202	0.275	0.275	0.275	0.202	0.202	-	-
V _{Inóculo} (l)	0.198	0.125	0.125	0.125	0.198	0.198	0.125	0.198
V _{Agua} (l)	-	-	-	-	-	-	0.275	0.202
I/S	2	2.4	2	2.02	3.14	2.09	-	-

Tal y como se muestra en la tabla anterior, para cada uno de los ensayos se han utilizado microalgas sonicadas con diferentes condiciones mientras que en los blancos se ha sustituido el sustrato por agua destilada. Para cada uno de los reactores batch se ha utilizado un volumen final de 0.4 l y un espacio de cabeza de 0.2 l.

A continuación se lleva a cabo la digestión anaerobia de las muestras y la cuantificación de la producción de metano mediante la utilización del equipo Bioprocess. Los ensayos se mantienen hasta que se detiene la producción de metano y tras la finalización, se vuelven a caracterizar las muestras.

4.1.4. Balance de DQO

Se ha realizado un balance de la DQO a los ensayos de digestión anaerobia para comprobar de manera teórica la validez de los datos experimentales obtenidos, mediante la siguiente ecuación:

$$DQO_{Inicial} = DQO_{Final} + DQO_{Metano} + DQO_{BSR} \quad (4)$$

4.1.4.1. Producción de metano

En el gráfico 1 se puede observar la evolución de la producción de metano, medida en ml, llevada a cabo por la degradación de la biomasa algal durante la digestión anaerobia, medido en días. Están representados por colores las diferentes condiciones de sonicación aplicadas a las muestras, además de la muestra sin pretratar y los dos blancos.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

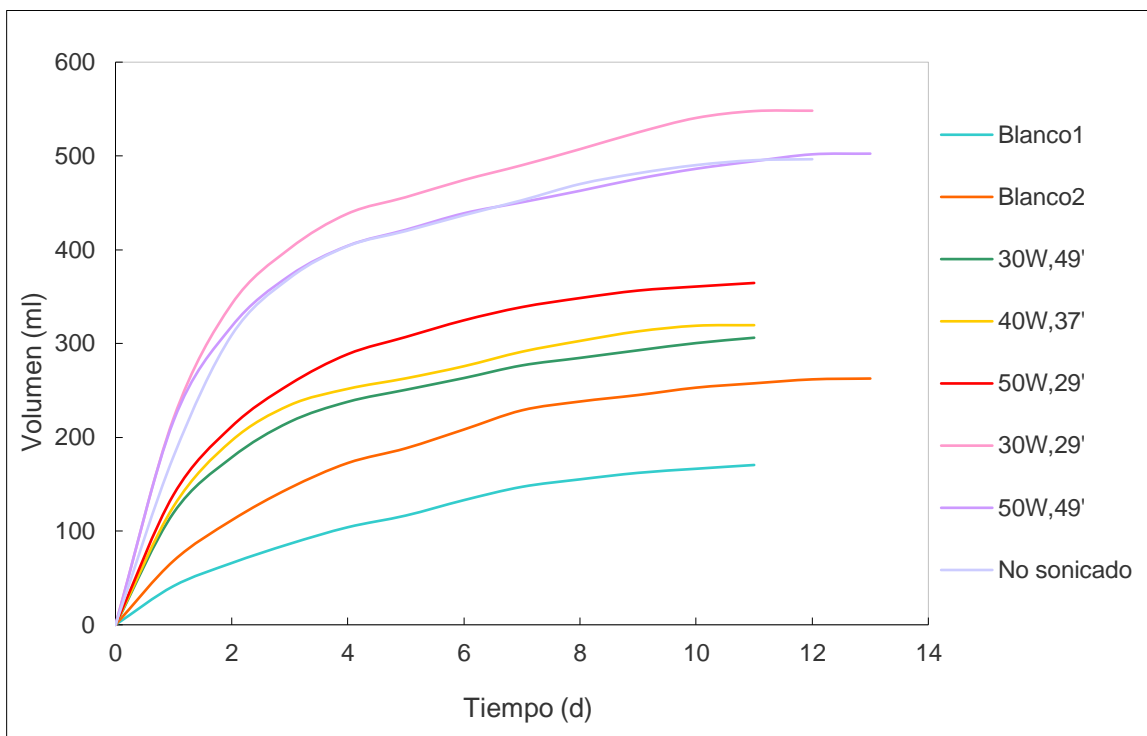


Gráfico 2. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas *M. braunii* del Experimento 1

Como se puede observar en el gráfico, las muestras que más volumen de metano han producido (marrón, verde y gris) son las correspondientes a la menor energía utilizada en el pretratamiento (88 MJ/kg SS, 30W), a la mayor energía utilizada (248 MJ/kg SS, 50W) y a la muestra sin sonicar con valores de 548.2 ml, 502.4 ml y 496.5 ml respectivamente.

Las muestras que menos volumen de metano han producido son las de 150 MJ/kg SS (morado, azul claro y naranja) correspondientes a las potencias de 50W (364.5 ml), 40W (319.5 ml) y 30W (306.1 ml), respectivamente.

Respecto a los blancos, se puede comprobar en el gráfico que ambos han producido algo de metano, 170.4 ml y 262.6 ml respectivamente. Esto se debe a que parte del inóculo también se degrada y produce lo que se llama metano de fondo.

Sin embargo, cabría esperar que la muestra sonicada con la menor energía y la no pretratada produjesen menor cantidad de metano, puesto que sus paredes celulares están menos dañadas y esto dificulta la degradación. A pesar de esto, la gráfica representada es coherente con los valores de la DQO obtenidos antes de la digestión anaerobia (Tabla 2), donde se puede observar que los valores más altos de DQO corresponden a las muestras de menor energía (88 MJ/kg SS, 30W) y a la no sonicada y

por tanto, al haber más materia orgánica en la muestra, puede ser degradada por las bacterias del fango para producir más volumen de metano.

Para calcular la biodegradabilidad de las microalgas, es necesario conocer la producción de metano debido sólo a su degradación, por lo que se necesita restar la producción asociada a los blancos.

Los valores de metano producidos solamente debido a la degradación de las microalgas y la DQO asociada a dicha producción se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 1

Muestra	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS	No sonificado
	30W,29min	30W,49min	40W,37min	50W,29min	50W,49min	
V_{Metano} (ml)	285.6	135.7	149.1	194.1	239.8	233.9
DQO_{Metano} (mgDQO/l)	2040.3	969.4	1065.2	1386.6	1713.1	1671.0

El volumen de metano producido solamente debido a la degradación de las muestras es bastante alto teniendo en cuenta que en aproximadamente 11 días la producción de metano se ha estabilizado.

Las curvas de producción de metano se han modelizado para comprobar si se ajustan a una cinética de primer o de segundo orden, utilizando las siguientes expresiones respectivamente:

$$V = V_{lim} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (5)$$

$$V = V_{lim} - \frac{1}{\frac{1}{V_{lim}} + k \cdot t} \quad (6)$$

Siendo:

- V_{lim} el volumen al que tiende la curva (ml)
- k la constante cinética (d^{-1} para cinéticas de primer orden y $ml^{-1} \cdot d^{-1}$ para cinéticas de segundo orden)

- t el tiempo (d)

Calculando los valores de V_{lim} y la constante cinética para que se ajusten lo máximo posible a los datos experimentales, se obtienen las siguientes gráficas:

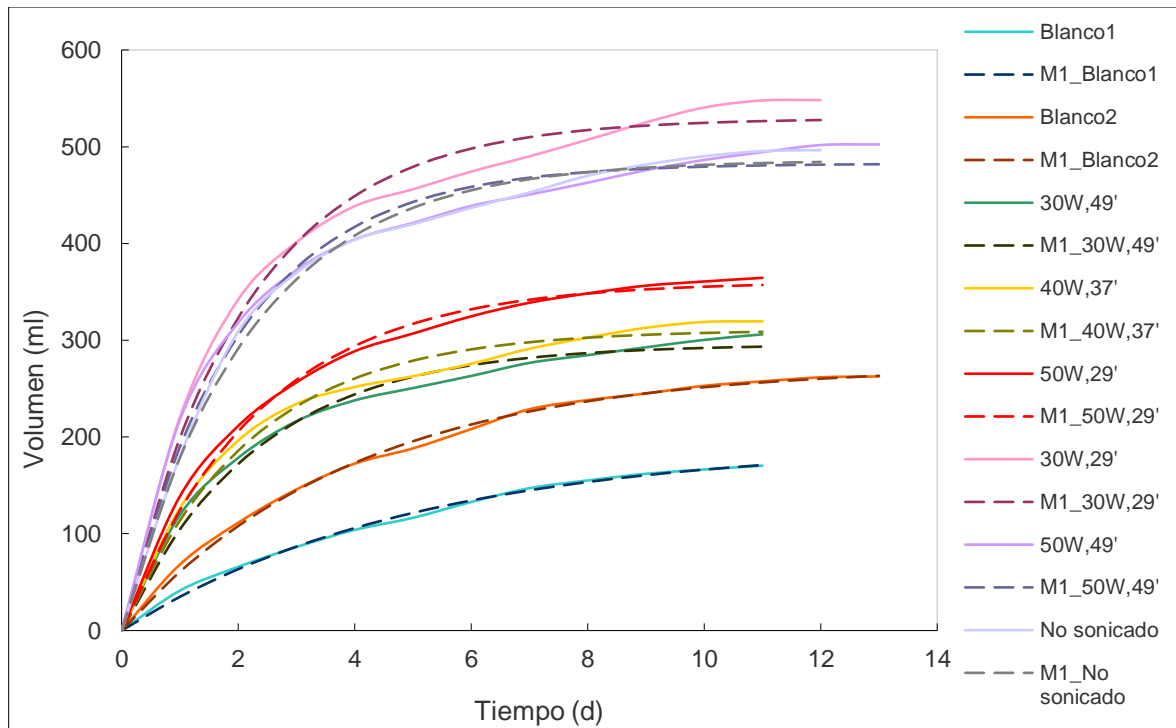


Gráfico 3. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 1 con cinéticas de primer orden

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

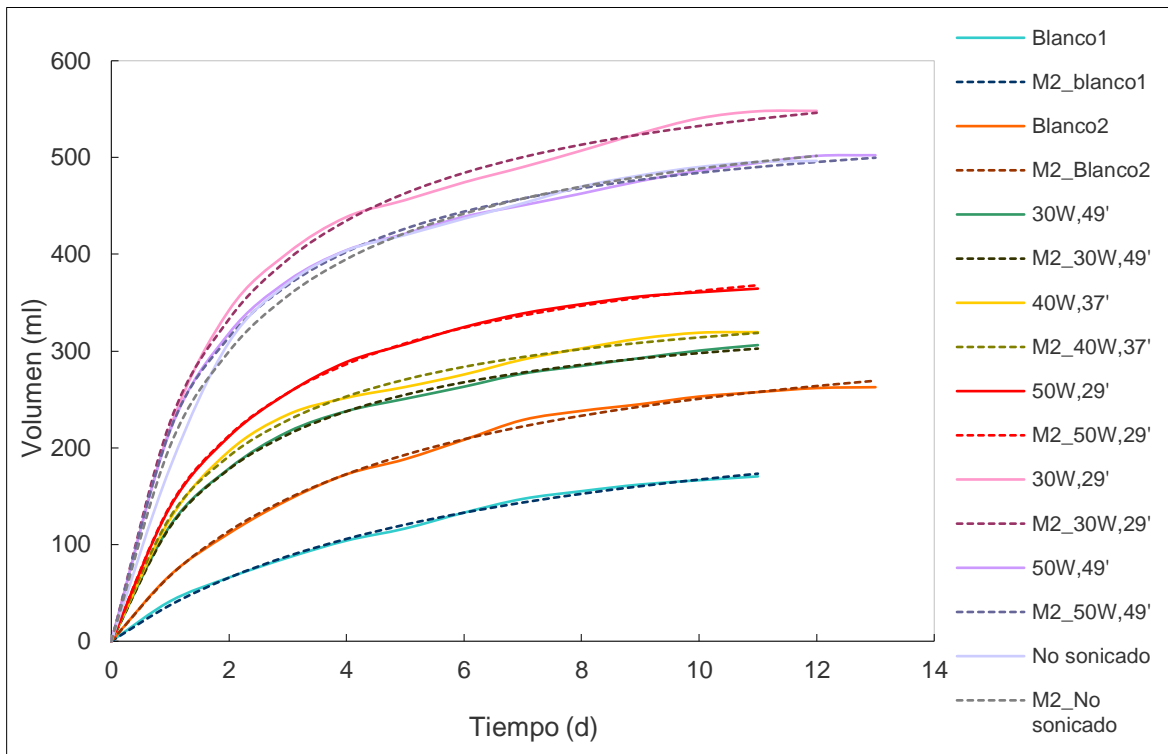


Gráfico 4. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 1 con cinéticas de segundo orden

Como se puede observar en ambos gráficos, las curvas de producción de metano construidas para este experimento se ajustan muy bien tanto a cinéticas de primer orden como de segundo. Por tanto, para conocer cuál es el mejor ajuste obtenido se presenta a continuación una tabla con los parámetros obtenidos para la ecuación cinética así como el error cuadrático medio error obtenido en la modelización.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD
ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

Tabla 6. Valores de los parámetros cinéticos y el error de la modelización en cinéticas de primer y segundo orden para las microalgas del Experimento 1

Algas		V _{Lim_1} (ml)	k ₁ (d ⁻¹)	Error	V _{Lim_2} (ml)	k ₂ (ml ⁻¹ ·d ⁻¹)	Error
88 MJ/kg SS	30W,29min	529.4	0.4707	60.47	626.7	0.00090	24.56
150 MJ/kg SS	30W,49min	295.8	0.4356	28.87	358.4	0.00137	8.38
	40W,37min	310.8	0.4550	34.33	374.2	0.00106	15.53
	50W,29min	360.6	0.4223	23.24	439.6	0.00106	5.63
248 MJ/kg SS	50W,49min	482.7	0.4990	58.88	560.0	0.00114	15.68
No sonificado		486.3	0.4568	39.77	580.1	0.00092	30.10
Blanco1		192.5	0.1998	9.43	272.5	0.00058	8.40
Blanco2		273.8	0.2505	12.63	358.3	0.00065	12.62

Observando los datos del error presentados en el gráfico se puede comprobar que se realiza un mejor ajuste con cinéticas de segundo orden. Además, también se puede observar que en el caso de los blancos (especialmente para el Blanco2) no hay tanta diferencia en el error del ajuste obtenido y por tanto sería posible modelizar las curvas con cinéticas de ambos órdenes.

Para las cinéticas de primer orden se ha obtenido una constante cinética mayor para la muestra de mayor energía (248 MJ/kg SS), mientras que la más pequeña se ha obtenido para el Blanco1. En el caso de la cinética de segundo orden la constante más alta se obtiene para la muestra de 150 MJ/kg SS (potencia de 30W), mientras que la más baja se obtiene también para el Blanco1.

4.1.4.2. Reducción del sulfato

También se ha calculado la DQO consumida por parte de las bacterias sulfatorreductoras durante el proceso de reducción del sulfato.

En la siguiente tabla se muestra la cantidad de sulfato consumida durante la digestión anaerobia y la DQO asociada.

Tabla 7. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas *M. braunii* del Experimento 1

Muestra	SO ₄ (mg SO ₄ /l)	DQO _{BSR} (mg DQO/l)
Microalgas	267	178

4.1.5. Potencial de biometanización y biodegradabilidad

Para el cálculo de estos parámetros es necesario conocer el volumen teórico de producción de metano. Para ello, se parte de los datos de DQO y volumen de sustrato, así como de la siguiente reacción:



Si se tiene en cuenta que 1 kg de DQO contiene 31.25 moles de oxígeno y en base a la reacción anterior, se deduce que se obtienen 15.624 moles de metano por cada kg de DQO. Estos moles de metano ocupan un volumen de 349.95 l en condiciones normales de presión y temperatura.

El Potencial de Biometanización (BMP) se refiere a la cantidad máxima de metano producida durante la digestión anaerobia y se ha calculado mediante la expresión proporcionada en el manual del equipo Bioprocess:

$$BMP (ml/gDQO) = \frac{V_m - V_b \cdot (DQO_I/DQO_S)_m}{(DQO_I)_b} \quad (8)$$

Siendo

- V_m el volumen de metano producido por la muestra sonicada
- V_b el volumen de metano producido por el blanco
- $(DQO_I/DQO_S)_m$ la DQO del inóculo y del sustrato de la muestra sonicada
- $(DQO_I)_b$ la DQO del inóculo del blanco

Además, también es posible calcular la biodegradabilidad de las microalgas a partir de los volúmenes reales de producción de metano obtenidos del equipo Bioprocess y de los valores teóricos de producción de metano calculados. Para el cálculo de la biodegradabilidad sí que se tiene en cuenta el efecto de la DQO consumida por las bacterias sulfatorreductoras.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el cálculo de estos parámetros:

Tabla 8. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas *M. braunii* del Experimento 1

Algas		V real CH ₄ (ml)	V teórico CH ₄ (ml)	Rendimiento (mlCH ₄ /gDQO)	BMP (ml/gDQO)	Biodegradabilidad (%)
88 MJ/kg SS	30W,29min	285.6	793.52	125.95	0.1760	35.99
150 MJ/kg SS	30W,49min	135.7	377.64	125.75	0.2058	35.93
	40W,37min	149.1	471.35	110.70	0.1783	31.63
	50W,29min	194.1	466.42	145.63	0.2104	41.61
248 MJ/kg SS	50W,49min	239.8	489.95	171.28	0.2466	48.94
No sonicado		233.9	757.38	108.07	0.1612	30.88

Como se puede observar en la tabla, todos los valores de volumen real de metano producido son menores que el volumen teórico calculado a partir de la DQO de las muestras, en torno a un 30-48%. En casi todos los casos el rendimiento de producción de metano supera los 100 ml de metano por cada gramo de DQO de la muestra, superando los 170 ml/g DQO.

Respecto al potencial de biometanización, los valores obtenidos varían entre 0.1612 y 0.2466 ml/g DQO, que corresponden a la muestra sin sonicar y a la muestra pretratada con una energía de 248 MJ/kg SS. Para todas las muestras sonicadas se observa que el BMP es superior que para la muestra sin pretratar.

En cuanto a la biodegradabilidad de las muestras, los valores obtenidos están en un rango comprendido entre 30.88% y 48.94%. Para todas las muestras pretratadas previamente se observa que la biodegradabilidad mejora respecto a la muestra sin sonicar.

Observando los resultados obtenidos en cuanto a biodegradabilidad, se puede ver que el uso de la sonicación como pretratamiento sí que favorece la biodegradabilidad de las microalgas ya que todas las muestras han obtenido un porcentaje mayor que la muestra sin pretratar (entre un 5% y un 18%).

También se puede observar que la muestra sonicada utilizando la mayor energía (248 MJ/kg SS) es la que tiene un porcentaje de biodegradabilidad más alto (48.94%).

Los datos obtenidos por *Passos et al.* en 2014 y 2015 en sus trabajos con cultivos de microalgas formados por *Stigeoclonium*, *Monoraphidium* y diversas especies de diatomeas muestran que para energías de sonicación de 26.7 MJ/kg ST y 65 MJ/kg ST se obtiene una biodegradabilidad del 22.8% y 56%, respectivamente. Para la muestra sin pretratar, se obtuvo una biodegradabilidad del 26.5%.

Aunque para las muestras pretratadas la biodegradabilidad no se aproxima a los datos obtenidos en el experimento puesto que las energías utilizadas son más altas y la biodegradabilidad obtenida es menor, sí que se observa cierta similitud para la muestra sin sonicar.

4.1.6. Rendimiento energético

Finalmente, se ha realizado un balance energético del proceso para comprobar la viabilidad de la aplicación del pretratamiento. Para ello se ha calculado la energía producida por el metano generado (E_0) y también la energía consumida en la sonicación (E_i) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$E_0 \text{ (MJ/gDQO)} = \frac{R_m - R_{ns}}{10^6} \cdot \frac{\xi}{10^3} \cdot \eta \quad (9)$$

$$E_i \text{ (MJ/gDQO)} = E_{sm} \cdot \frac{SS_c \cdot 10^{-6}}{DQO_m \cdot 10^{-3}} \quad (10)$$

Siendo:

- R_m , R_{ns} el rendimiento de la muestra sonicada y el de la muestra sin sonicar (ml CH_4 /g DQO)
- ξ el calor específico del metano (35800 kJ/m³)
- η la eficiencia de la conversión de energía (90%)
- E_{sm} la energía utilizada en la sonicación de la muestra (MJ/kg SS)
- SS_c la concentración de sólidos suspendidos de la muestra concentrada
- DQO_m la DQO de la muestra tras la sonicación

Los datos obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 9. Balance energético realizado para el Experimento 1

Muestra	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS
	30W,29min	30W,49min	40W,37min	50W,29min	50W,49min
E_0	0.00058	0.00057	0.00008	0.00121	0.00204
E_i	0.01521	0.06854	0.05626	0.05679	0.06753
E_0/E_i	0.03787	0.00831	0.00150	0.02131	0.03016

Se puede observar que para ninguna de las muestras se obtiene un valor de E_0/E_i por encima de 1, lo que significaría que se produce más energía de la que se consume en el pretratamiento y, por tanto, el proceso sería rentable.

Sin embargo, la muestra con un ratio E_0/E_i más alto es la de 30W, 29 minutos (88 MJ/kg SS), puesto que en la energía producida no hay grandes diferencias entre unas muestras y otras mientras que la energía consumida es mucho menor que en las demás muestras.

Por tanto, para el experimento 1 realizado con la especie *Monoraphidium braunii* se observa que la mayor biodegradabilidad obtenida se da para la muestra sonicada con una energía de 248 MJ/kg SS, correspondiente a una potencia de 50W y un tiempo de 49 minutos.

4.2. Experimento 2: *Scenedesmus obliquus*

En este segundo experimento se ha utilizado la cepa de microalgas formada por la especie *Scenedesmus obliquus* para estudiar también su biodegradabilidad y la influencia del método de sonicación sobre la producción de biogás.

4.2.1. Caracterización de la biomasa algal

Para conocer el estado inicial del cultivo de microalgas, se caracteriza la biomasa en términos de DQO, sólidos y nutrientes. Además, esto permite determinar el grado de concentración que deben alcanzar las microalgas y las condiciones de sonicación posteriores.

A continuación se presenta una tabla con la caracterización inicial del cultivo de *Scenedesmus obliquus*:

Tabla 10. Caracterización inicial de las microalgas *S. obliquus* del Experimento 2

Muestra	Inicio	Unidades
DQO _T	410	mg DQO/l
DQO _{Sol}	57	mg DQO/l
SS	224	mg/l
N _T	18	mg N/l
N _{Tsol}	3.8	mg N/l
NH ₄	4.07	mg N-NH ₄ /l
P _T	-	mg P/l
PO ₄	0.63	mg P-PO ₄ /l
SO ₄	151.24	mg SO ₄ /l

4.2.2. Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo

El método de concentración utilizado es una centrifugación a una velocidad de 5000 rpm durante un tiempo de 3 minutos. El volumen de concentrado debe ser suficiente para poner las botellas de los ensayos de digestión anaerobia.

El pretratamiento llevado a cabo es una sonicación donde se han probado diferentes energías, así como distintas condiciones de potencia y tiempo para una energía determinada. Así pues, se han llevado a cabo 5 condiciones distintas de sonicación tras las cuales se ha determinado la DQO para cada una de las biomásas y el inóculo utilizado.

En la siguiente tabla se pueden observar los valores de DQO obtenidos.

Tabla 11. Caracterización tras la sonicación de las microalgas *S. obliquus* y el inóculo del Experimento 2

Muestra	Inóculo	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			253 MJ/kg SS	No sonificado	Unidades
		30W,26min	30W,44min	40W,33min	50W,26min	50W,44min		
DQO _T	27789	7105	8000	8000	8632	7789	6526	mg DQO/l

También se han observado al microscopio cada una de las muestras para comprobar visualmente la eficacia del pretratamiento mediante la utilización del tinte de ácidos nucleicos Sytox Green. Así, se ha hecho un recuento de las células viables y no viables presentes en las muestras, siendo los resultados obtenidos los siguientes:

Tabla 12. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 2

Muestras	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			253 MJ/kg SS
	30W,26min	30W,44min	40W,33min	50W,26min	50W,44min
% células no viables	8.02	8.47	15.01	14.86	19.41

Al igual que para el experimento anterior, se puede comprobar que el efecto de la energía aplicada en el pretratamiento es proporcional a la cantidad de células dañadas presentes en las muestras. En el caso de esta especie, puesto que su pared celular es más resistente, el porcentaje de células no viables conseguido es mucho menor por lo que sería necesario la aplicación de mayores energías en el pretratamiento para conseguir porcentajes similares a los obtenidos en el Experimento 1.

4.2.3. Ensayos de digestión anaerobia en batch

El volumen de fango y de microalgas necesario para llevar a cabo el ensayo se ha determinado a partir de las ecuaciones 2 y 3, con una relación inóculo-sustrato de 2 g DQO/g DQO. Así, sustituyendo en las ecuaciones los valores de DQO tanto del fango como de las microalgas se obtienen determinados volúmenes. Sin embargo, finalmente se ha realizado el experimento agrupando los ensayos con DQO similares, y por tanto volúmenes de sustrato parecidos, y se han recalculado las relaciones inóculo-sustrato, obteniéndose los volúmenes y relaciones que se muestran a continuación:

Tabla 13. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 2

Muestra	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			253 MJ/kg SS	No sonificado	Blanco
	30W,26 min	30W,44 min	40W,33 min	50W,26 min	50W,44 min		
V _{Sustrato} (l)	0.247	0.247	0.247	0.247	0.247	0.247	-
V _{Inóculo} (l)	0.153	0.153	0.153	0.153	0.153	0.153	0.153
V _{Agua} (l)	-	-	-	-	-	-	0.247
I/S	2.42	2.15	2.15	2	2.21	2.64	-

Tal y como se muestra en la tabla anterior, para cada uno de los ensayos se han utilizado microalgas sonicadas con diferentes condiciones mientras que en los blancos se ha sustituido el sustrato por agua destilada. Para cada uno de los reactores batch se ha utilizado un volumen final de 0.4 l y un espacio de cabeza de 0.2 l.

A continuación se lleva a cabo la digestión anaerobia de las muestras y la cuantificación de la producción de metano mediante la utilización del equipo Bioprocess. Los ensayos se mantienen hasta que se detiene la producción de metano y tras la finalización, se vuelven a caracterizar las muestras.

Tabla 14. Caracterización de las muestras tras la digestión anaerobia de las microalgas *S. obliquus* del Experimento 2

Muestra	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			253 MJ/kg SS	No sonificado	Blanco
	30W,26min	30W,44min	40W,33min	50W,26min	50W,44min		
DQO _T	9414	6310	18827	8379	12724	7552	7034

4.2.4. Balance de DQO

Se ha realizado un balance de la DQO a un ensayo de digestión anaerobia para comprobar de manera teórica la validez de los datos experimentales obtenidos, mediante la ecuación 4. La muestra escogida para realizar el balance de DQO corresponde a la muestra de menor energía (90 MJ/kg SS, correspondiente a 30W, 26 minutos).

4.2.4.1. Producción de metano

En el gráfico 4 se puede observar la evolución de la producción de metano, medida en ml, llevada a cabo por la degradación de la biomasa algal durante la digestión anaerobia, medido en días. Están representados por colores las diferentes condiciones de sonicación aplicadas a las muestras, además de la muestra sin pretratar y el blanco.

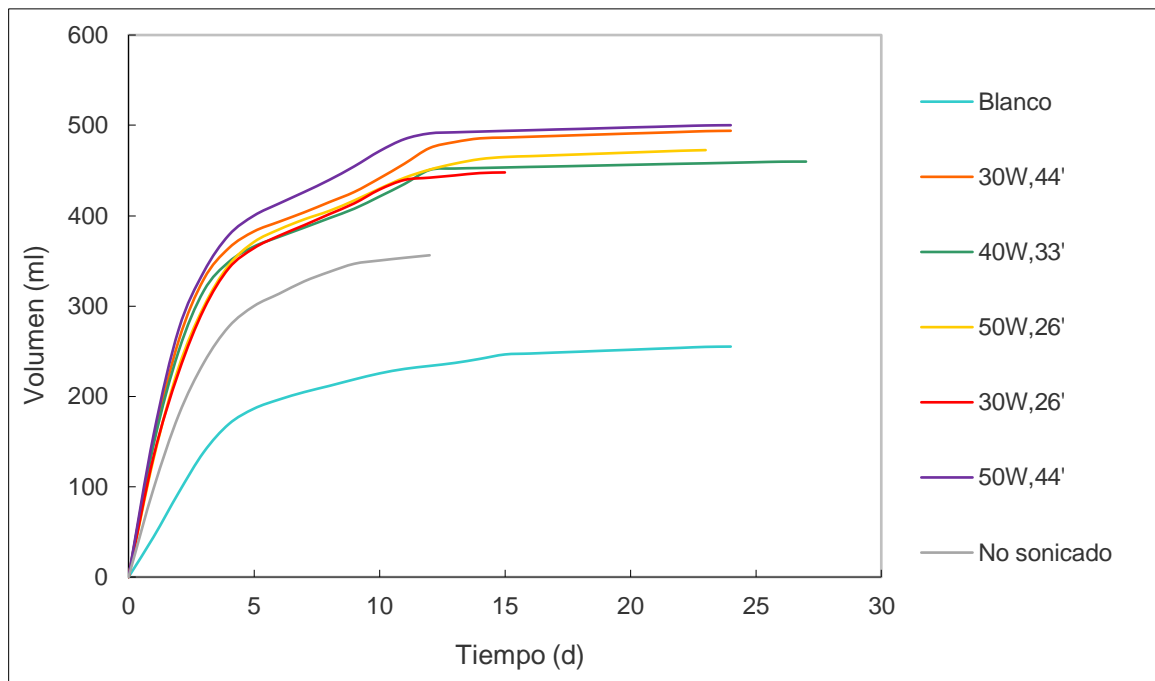


Gráfico 5. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas *S. obliquus* del Experimento 2

Como se puede observar en el gráfico, la cantidad de metano producido por las muestras va acorde a la energía aplicada en el pretratamiento, siendo la muestra que ha producido el mayor volumen la de 50W, 44 minutos (253 MJ/kg SS) seguida de las de energía intermedia de 150 MJ/kg SS (30W, 44 minutos; 40W, 33 minutos; 50W, 26 minutos) y el menor volumen obtenido corresponde a la muestra de 30W, 26 minutos (90 MJ/kg SS). Los volúmenes obtenidos respectivamente son 500.2 ml, 494.0 ml, 472.6 ml, 459.9 ml y 447.9 ml.

Sin embargo, la diferencia de volumen entre las muestras es mínima debido al bajo porcentaje de células no viables conseguido en las muestras y a la poca diferencia obtenida entre ellas (tabla 12).

En cuanto a la muestra sin pretratar se puede comprobar que sí que hay diferencia entre el volumen producido por esta muestra (356.2 ml) y el volumen producido por las sonicadas. Esto se debe a que la pared celular de esta especie de microalga es tan resistente que la aplicación de un pretratamiento mejora notablemente la producción de biogás.

Respecto al blanco, se puede comprobar en el gráfico que ha producido algo de metano y se necesita restar la producción asociada al blanco al volumen producido por el resto de muestras para poder calcular la biodegradabilidad.

Los valores de metano producidos solamente debido a la degradación de las microalgas y la DQO asociada a dicha producción se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 15. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 2

Muestra	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			253 MJ/kg SS	No sonificado
	30W,26min	30W,44min	40W,33min	50W,26min	50W,44min	
V_{Metano} (ml)	192.8	238.9	204.8	217.5	245.1	101.1
DQO_{Metano} (mgDQO)	550.9	682.7	585.2	621.5	700.4	288.9

Los volúmenes de metano producidos por las muestras debido a la degradación de las microalgas son bastante altos, entre 101.1 ml y 245.1 ml. Sin embargo, al contrario que en el experimento anterior, las muestras se han estabilizado en torno al 24º día, por lo que han necesitado más tiempo en producir esa cantidad de metano.

Las curvas de producción de metano se han modelizado para comprobar si se ajustan a una cinética de primer o de segundo orden, utilizando las expresiones 5 y 6. Calculando los valores de V_{lim} y la constante cinética para que se ajusten lo máximo posible a los datos experimentales, se obtienen las siguientes gráficas:

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

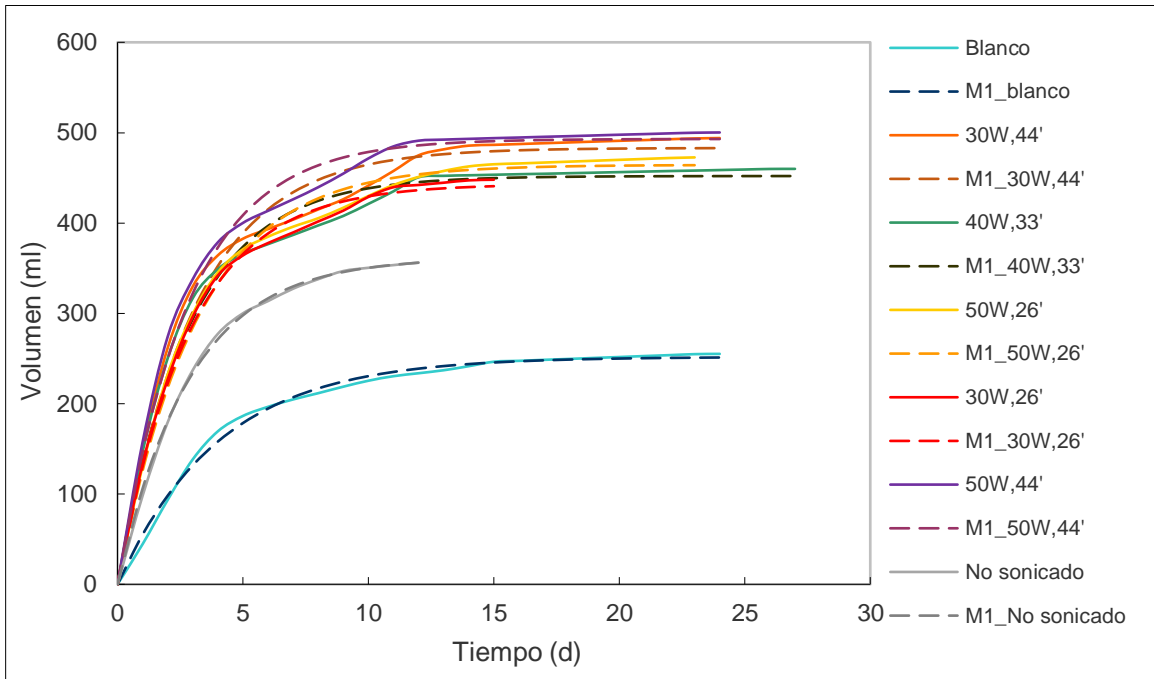


Gráfico 6. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 2 con cinéticas de primer orden

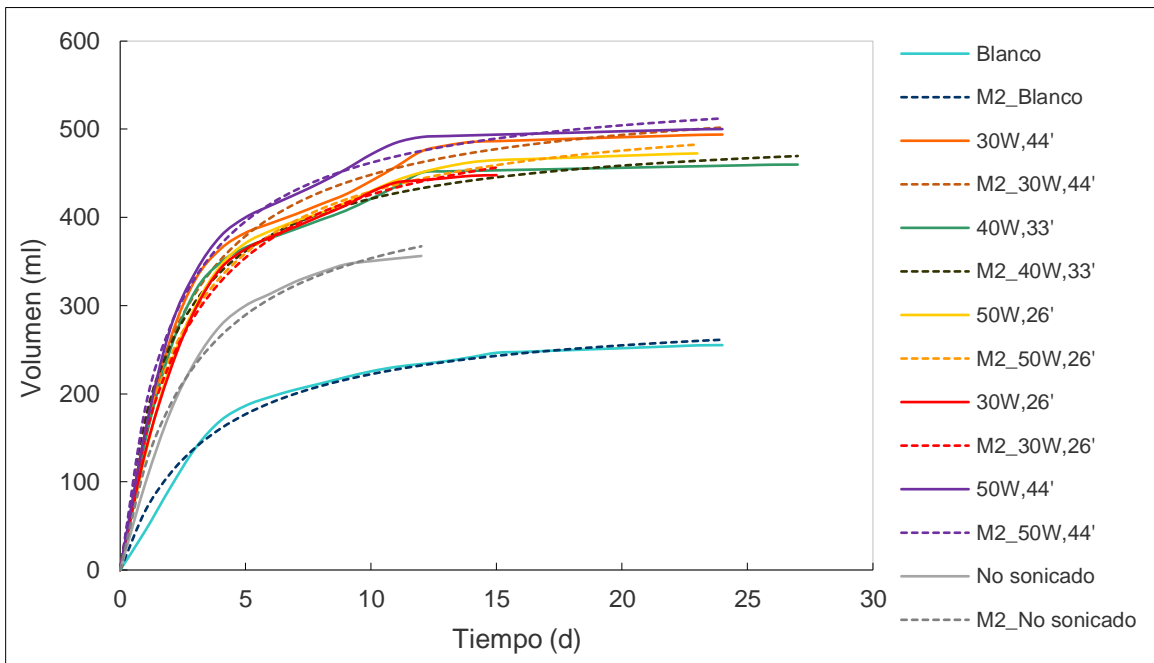


Gráfico 7. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 2 con cinéticas de segundo orden

Como se puede observar en ambos gráficos, las curvas de producción de metano construidas para este experimento se ajustan muy bien tanto a cinéticas de primer orden como de segundo, al igual que para el experimento anterior. Por tanto, para conocer cuál es el mejor ajuste obtenido se presenta a continuación una tabla con los parámetros obtenidos para la ecuación cinética así como el error cuadrático medio obtenido en la modelización.

Tabla 16. Valores de los parámetros cinéticos y el error de la modelización en cinéticas de primer y segundo orden para las microalgas del Experimento 2

Algas		V _{Lim_1} (ml)	k ₁ (d ⁻¹)	Error	V _{Lim_2} (ml)	k ₂ (ml ⁻¹ ·d ⁻¹)	Error
90 MJ/kg SS	30W,26min	443.1	0.3486	32.31	533.5	0.00074	30.54
150 MJ/kg SS	30W,44min	483.1	0.3269	84.23	548.9	0.00084	46.42
	40W,33min	452.0	0.3504	68.06	503.7	0.00101	46.41
	50W,26min	464.3	0.3160	50.83	533.4	0.00077	40.01
253 MJ/kg SS	50W,44min	493.1	0.3531	58.33	555.4	0.00089	46.78
No sonicado		361.6	0.3470	11.55	454.3	0.00077	31.31
Blanco		251.7	0.2471	24.31	298.9	0.00097	34.44

Observando los datos del error presentados en el gráfico se puede comprobar que se realiza un mejor ajuste con cinéticas de segundo orden para las muestras pretratadas mientras que en el caso de la muestra sin sonicar y el blanco el mejor ajuste se consigue con una cinética de primer orden.

Respecto al valor de las constantes cinéticas para la cinética de primer orden se puede observar que el valor más alto obtenido corresponde a la muestra de mayor energía (253 MJ/kg SS), mientras que el valor más pequeño se ha obtenido en el blanco. En el caso de la cinética de segundo orden el valor de la constante cinética mayor se ha obtenido para la muestra de 150 MJ/kg SS (40W de potencia), mientras que el valor más bajo corresponde a la muestra sin pretratar y a la muestra de 150 MJ/kg SS (50W de potencia).

4.2.4.2. Reducción del sulfato

También se ha calculado la DQO consumida por parte de las bacterias sulfatorreductoras durante el proceso de reducción del sulfato.

En la siguiente tabla se muestra la cantidad de sulfato consumida durante la digestión anaerobia y la DQO asociada.

Tabla 17. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas *S. obliquus* del Experimento 2

Muestra		SO ₄ (mg SO ₄ /l)	DQO _{BSR} (mg DQO)
90 MJ/kg SS	30W,26min	123.08	60.73

4.2.4.3. Balance global de DQO

A continuación se muestra una tabla con el resultado del balance de DQO para la muestra escogida. Hay que tener en cuenta que los métodos de análisis llevan asociado un error relativo, que también se presenta en la tabla.

Tabla 18. Balance global de DQO para las microalgas *S. obliquus* del Experimento 2

Muestra		DQO _{Inicial} (mg DQO)	DQO _{Final} (mg DQO)	DQO _{Metano} (mgDQO)	DQO _{BSR} (mg DQO)	% error
90 MJ/kg SS	30W,26min	1866.1	952	550.9	60.73	16.2

4.2.5. Potencial de biometanización y biodegradabilidad

Al igual que para el experimento anterior, se calculan los valores teóricos de producción de metano y el potencial de biometanización a partir de la reacción 7 y de la ecuación 8, así como la biodegradabilidad de las microalgas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el cálculo de estos parámetros.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

Tabla 19. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas *S. obliquus* del Experimento 2

Algas		V real CH ₄ (ml)	V teórico CH ₄ (ml)	Rendimiento (mlCH ₄ /gDQO)	BMP (ml/gDQO)	Biodegradabilidad (%)
90 MJ/kg SS	30W,26min	192.8	587.37	114.87	0.1996	32.82
150 MJ/kg SS	30W,44min	238.9	664.63	125.79	0.2006	35.94
	40W,33min	204.8	664.63	107.83	0.1833	30.81
	50W,26min	217.5	719.16	105.84	0.1760	30.24
253 MJ/kg SS	50W,44min	245.1	646.45	132.68	0.2093	37.91
No sonificado		101.1	537.39	65.84	0.1605	18.81

Observando los volúmenes reales de metano producidos por las muestras y los volúmenes teóricos calculados a partir de la DQO de las muestras se comprueba que el metano producido en la degradación anaerobia es menor del esperado teóricamente, en torno a un 30-37% para las muestras sonicadas y un 18% para la muestra sin pretratar.

Respecto al rendimiento obtenido, se observa que para casi todas las muestras se han producido más de 100 ml de metano por cada gramo de DQO, siendo este rendimiento especialmente inferior (65.84 ml/g DQO) para la muestra sin pretratar.

En cuanto al potencial de biometanización, los valores obtenidos varían entre 0.1605 ml/g DQO y 0.2093 ml/g DQO que corresponden a la muestra sin sonicar y a la muestra pretratada con una energía de 253 MJ/ kg SS (50W, 44 minutos). También se puede observar que el valor del BMP obtenido para todas las muestras sonicadas es bastante similar y ronda en torno a 0.17 y 0.20 ml/g DQO.

Respecto a los valores de biodegradabilidad obtenidos, varían entre el 30.24% y el 37.91% para las muestras pretratadas mientras que se ha obtenido un valor de 18.81% para la muestra sin sonicar.

Por tanto, se puede ver que el uso de la sonicación como pretratamiento sí que favorece la biodegradabilidad de las microalgas ya que todas las muestras han obtenido un porcentaje mayor que la muestra sin pretratar.

También se puede observar que la muestra sonicada utilizando la mayor energía (253 MJ/kg SS) es la que tiene un porcentaje de biodegradabilidad más alto; sin embargo, al contrario que en el experimento anterior, la diferencia entre la biodegradabilidad de unas muestras y otras es muy pequeña. Esto pone de manifiesto la dureza de la pared celular de la especie.

Según *González-Fernández et al., 2012* se obtiene una biodegradabilidad del 43.9% para muestras de *Scenedesmus* sonicadas con una energía de 128.9 MJ/kg ST y un 23.4% de biodegradabilidad para muestras sin pretratar. Aunque los porcentajes de biodegradabilidad para las muestras sonicadas de este experimento son menores que el obtenido en bibliografía, la biodegradabilidad de la muestra sin pretratar sí que es similar al obtenido por *González-Fernández et al.*

4.2.6. Rendimiento energético

Finalmente, se ha realizado un balance energético del proceso para comprobar la viabilidad de la aplicación del pretratamiento. Para ello se ha calculado la energía producida por el metano generado y también la energía consumida en la sonicación mediante las ecuaciones 9 y 10.

Los datos obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 20. Balance energético realizado para el Experimento 2

Muestra	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			253 MJ/kg SS
	30W,26min	30W,44min	40W,33min	50W,26min	50W,44min
E_0	0.00158	0.00193	0.00135	0.00129	0.00215
E_i	0.02320	0.03435	0.03435	0.03183	0.05950
E_0/E_i	0.06809	0.05624	0.03940	0.04049	0.03620

Se puede observar que para ninguna de las muestras se obtiene un valor de E_0/E_i por encima de 1, lo que significa que se el proceso no es rentable puesto que se consume más energía de la que se produce.

Sin embargo, la muestra con un ratio E_0/E_i más alto es la de 30W, 26 minutos que corresponde a la energía más baja utilizada, puesto que en la energía producida no hay grandes diferencias entre unas muestras y otras mientras que la energía consumida es mucho menor que en las demás muestras.

Por tanto, para el experimento 2 realizado con la especie *Scenedesmus obliquus* se observa que la mayor biodegradabilidad se obtiene para la muestra sonicada con una energía de 253 MJ/kg SS, correspondiente a 50W y 44 minutos.

4.3. Experimento 3: Fotobiorreactor

En este tercer experimento se ha utilizado muestra proveniente del fotobiorreactor de la EDAR del Carraixet para estudiar también su biodegradabilidad y la influencia del método de sonicación sobre la producción de biogás. En el momento en que se obtuvo la muestra ésta estaba formada prácticamente en su totalidad por el género *Chlorella*.

4.3.1. Caracterización de la biomasa algal

Para conocer el estado inicial del cultivo de microalgas, se caracteriza la biomasa en términos de DQO, sólidos y nutrientes. Además, esto permite determinar el grado de concentración que deben alcanzar las microalgas y las condiciones de sonicación posteriores.

A continuación se presenta una tabla con la caracterización inicial del cultivo:

Tabla 21. Caracterización inicial de las microalgas del FBR del Experimento 3

Muestra	Inicio	Unidades
DQO _T	452	mg DQO/l
DQO _{Sol}	87	mg DQO/l
SS	240	mg/l
N _T	26.50	mg N/l
N _{Tsol}	17.20	mg N/l
NH ₄	37.89	mg N-NH ₄ /l
P _T	9.80	mg P/l
PO ₄	-	mg P-PO ₄ /l
SO ₄	500.24	mg SO ₄ /l

4.3.2. Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo

El método de concentración utilizado es una centrifugación a una velocidad de 5000 rpm durante un tiempo de 3 minutos. El volumen de concentrado debe ser suficiente para poner las botellas de los ensayos de digestión anaerobia.

El pretratamiento llevado a cabo es una sonicación donde se han probado diferentes energías, así como distintas condiciones de potencia y tiempo para una energía determinada. Así pues, se han llevado a cabo 5 condiciones distintas de sonicación tras las cuales se ha determinado la DQO para cada una de las biomásas y el inóculo utilizado.

En la siguiente tabla se pueden observar los valores de DQO obtenidos.

Tabla 22. Caracterización tras la sonicación de las microalgas del FBR y el inóculo del Experimento 3

Muestra	Inóculo	89 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS	No sonicado	Unidades
		30W,27min	30W,45min	40W,34min	50W,27min	50W,45min		
DQO _T	18310	4345	4552	3828	3983	3414	3879	mg DQO/l

Además, en este experimento también se ha evaluado el efecto que el inóculo tiene en la producción de metano. Para ello se ha utilizado fango anaerobio mezclado con líquido ruminal (rumen) para replicar algunos ensayos y comparar los resultados con los obtenidos al utilizar solamente fango anaerobio.

A continuación se muestra la caracterización del rumen.

Tabla 23. Caracterización del Rumen para el Experimento 3

Muestra	DQO _T	DQO _{Sol}
Rumen	17568	565

También se han observado al microscopio cada una de las muestras para comprobar visualmente la eficacia del pretratamiento mediante la utilización del tinte de ácidos nucleicos Sytox Green. Así, se ha hecho un recuento de las células vivas y no viables presentes en las muestras, siendo los resultados obtenidos los siguientes:

Tabla 24. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 3

Muestras	89 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS	No sonificado
	30W,27min	30W,45min	40W,34min	50W,27min	50W,45min	
% células no viables	83.30	88.59	90.70	88.05	93.90	16.24

Al igual que para el experimento anterior, se puede comprobar que el efecto de la energía aplicada en el pretratamiento es proporcional a la cantidad de células dañadas presentes en las muestras. Puesto que género predominante en el fotobiorreactor es *Chlorella* y ésta tiene una pared celular mucho más débil, se puede observar que los porcentajes de células no viables son mucho más altos que para los dos experimentos anteriores.

4.3.3. Ensayos de digestión anaerobia en batch

El volumen de fango y de microalgas necesario para llevar a cabo el ensayo se ha determinado a partir de las ecuaciones 2 y 3, con una relación inóculo-sustrato de 2 g DQO/gDQO. Así, sustituyendo en las ecuaciones los valores de DQO tanto del fango como de las microalgas se obtienen determinados volúmenes. Sin embargo, finalmente se ha realizado el experimento agrupando los ensayos con DQO similares, y por tanto volúmenes de sustrato parecidos, y se han recalculado las relaciones inóculo-sustrato, obteniéndose los volúmenes y relaciones que se muestran a continuación:

Tabla 25. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 3

Muestra	89 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS	No sonificado	Blanco
	30W,27min	30W,45 min	40W,34 min	50W,27 min	50W,45min		
V _{Sustrato} (l)	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	-
V _{Inóculo} (l)	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133
V _{Agua} (l)	-	-	-	-	-	-	0.267
I/S	2.1	2	2.38	2.29	2.67	2.35	-

Tal y como se muestra en la tabla anterior, para cada uno de los ensayos se han utilizado microalgas sonicadas con diferentes condiciones mientras que en los blancos se ha sustituido el sustrato por agua destilada. Para cada uno de los reactores batch se ha utilizado un volumen final de 0.4 l y un espacio de cabeza de 0.2 l.

Los ensayos realizados con rumen corresponden a la muestra sin pretratar y al blanco, utilizándose como sustrato microalgas y agua respectivamente. Los volúmenes utilizados para estos ensayos son los mismos que se muestran en la tabla 25.

A continuación se lleva a cabo la digestión anaerobia de las muestras y la cuantificación de la producción de metano mediante la utilización del equipo Bioprocess. Los ensayos se mantienen hasta que se detiene la producción de metano y tras la finalización, se vuelven a caracterizar las muestras.

Tabla 26. Caracterización de las muestras tras la digestión anaerobia de las microalgas del FBR del Experimento 3

Muestra	89 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS	No sonificado (Normal)	Blanco (Normal)	No sonificado (Rumen)	Blanco (Rumen)
	30W,27min	30W,45 min	40W,34 min	50W,27 min	50W,45min				
DQO _T	7778	8787	8383	6869	11212	3636	5833	5455	6875

4.3.4. Balance de DQO

Se ha realizado un balance de la DQO a un ensayo de digestión anaerobia para comprobar de manera teórica la validez de los datos experimentales obtenidos, mediante la ecuación 4. La muestra escogida para realizar el balance de DQO corresponde a la muestra de menor energía (89 MJ/kg SS, correspondiente a 30W, 27 minutos).

4.3.4.1. Producción de metano

En los gráficos 7 y 8 se puede observar la evolución de la producción de metano, medida en ml, llevada a cabo por la degradación de la biomasa algal durante la digestión anaerobia, medido en días. Están representados por colores las diferentes condiciones de sonicación aplicadas a las muestras, además de la muestra sin pretratar y el blanco.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

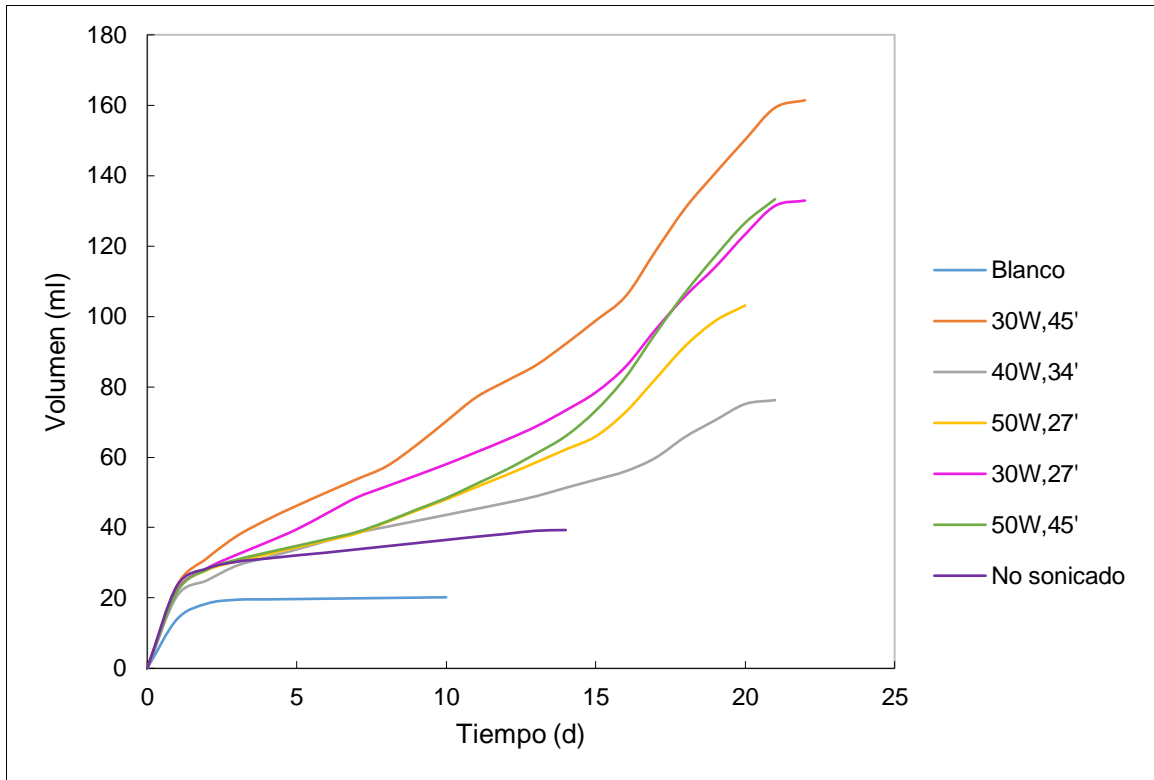


Gráfico 8. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas del FBR del Experimento 3

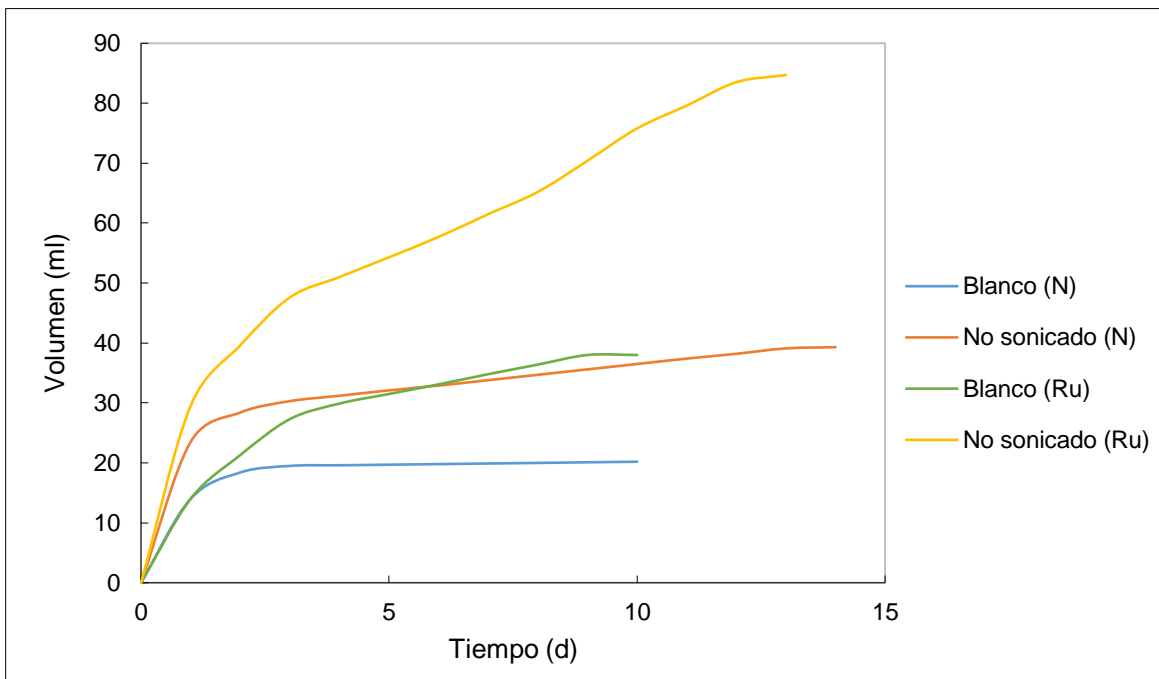


Gráfico 9. Comparación de la producción de metano producida por fango normal y por rumen durante la digestión anaerobia de las microalgas del FBR del Experimento 3

Como se puede observar en el gráfico 3, la muestra que mayor volumen de metano ha producido (161.4 ml) es la de color naranja de 30W, 45 minutos (150 MJ/kg SS) seguida de las dos muestras de mayor y menor energía aplicada (248 MJ/kg SS y 89 MJ/kg SS, respectivamente) que corresponden a las curvas de color verde y rosa y han producido 133.3 ml y 132.9 ml.

Las muestras que menor cantidad de metano han producido (marrón y gris) son las de 150 MJ/kg SS correspondientes a 50W y 40W, con un volumen de metano de 103.1 ml y 76.2 ml. La muestra sin sonicar ha tenido una producción de 39.3 ml de metano mientras que el blanco ha producido un volumen de 19.5 ml.

Se puede observar que hay una notable diferencia entre la producción de metano de las muestras sonicadas y el volumen de metano producido por la muestra sin pretratar, indicando que la aplicación del pretratamiento mejora la producción de metano.

En el gráfico 4 se puede observar que la muestra con rumen ha producido el mayor volumen de metano (84.7 ml). Sin embargo, el blanco correspondiente a esa muestra también tiene un volumen mayor de metano de fondo (38.0 ml) que para el blanco con fango normal (19.5 ml), por lo que solamente con el gráfico no puede asegurarse que el inóculo afecte a la biodegradabilidad.

Respecto a los blancos, se puede comprobar que en ambos gráficos han producido algo de metano y se necesita restar la producción asociada al blanco al volumen producido por el resto de muestras para poder calcular la biodegradabilidad.

Los valores de metano producidos solamente debido a la degradación de las microalgas y la DQO asociada a dicha producción se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 27. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 3

Muestra	89 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS	No sonicado (Normal)	No sonicado (Rumen)
	30W,27min	30W,45min	40W,34min	50W,27min	50W,45min		
V_{Metano} (ml)	113.4	141.9	56.7	83.6	113.8	19.8	46.7
DQO_{Metano} (mgDQO)	324.0	405.5	162.0	238.9	325.2	56.6	133.4

Los valores de metano producido no son muy altos para este experimento ya que se encuentran en un rango de entre 19.8 ml y 141.9 ml durante un tiempo de digestión anaerobia de unos 20 días.

Las curvas de producción de metano se han modelizado para comprobar si se ajustan a una cinética de primer o de segundo orden, utilizando las expresiones 5 y 6. Calculando los valores de V_{lim} y la constante cinética para que se ajusten lo máximo posible a los datos experimentales, se obtienen las siguientes gráficas:

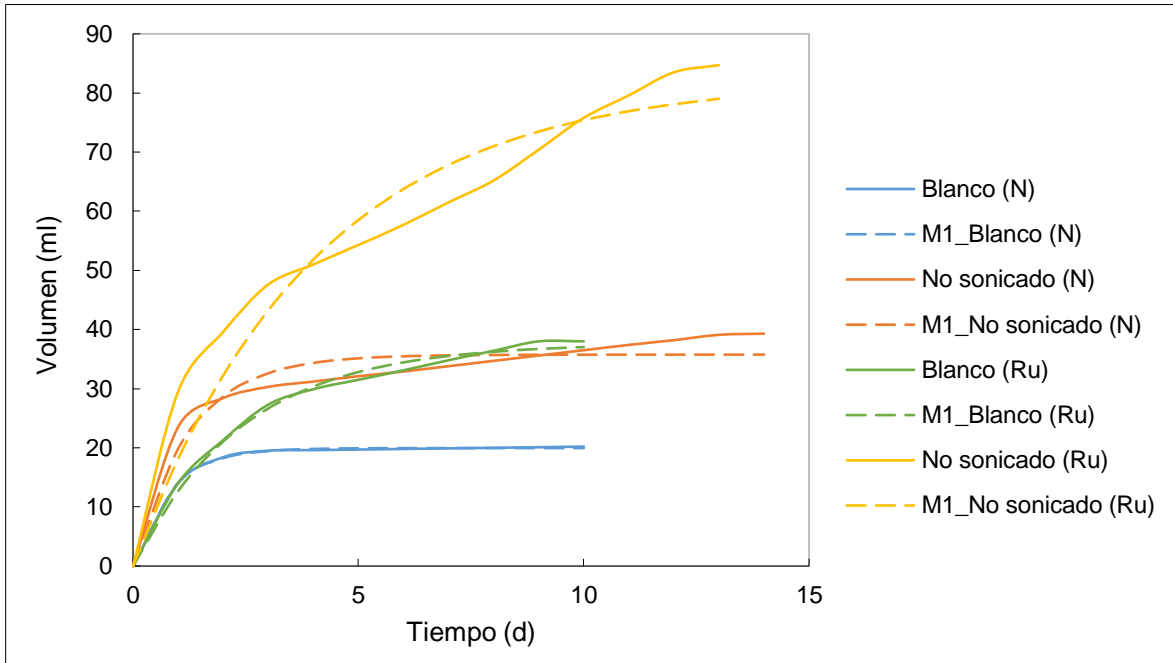


Gráfico 10. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 3 con cinéticas de primer orden

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

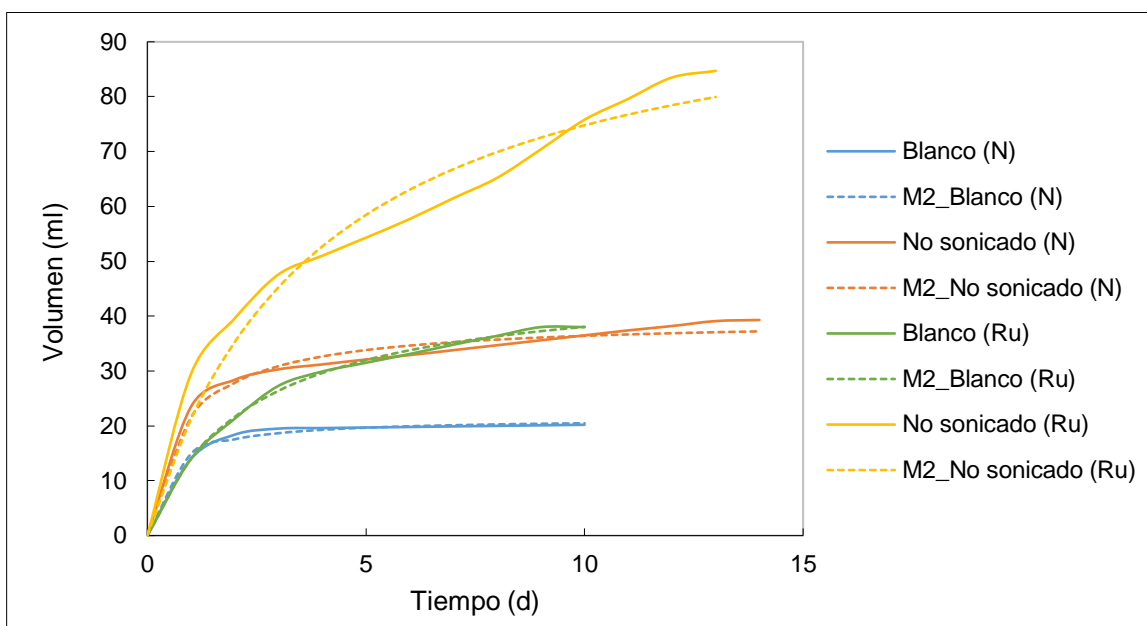


Gráfico 11. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 3 con cinéticas de segundo orden

Como se puede observar en ambos gráficos, las curvas de producción de metano construidas para este experimento no se ajustan tan bien a las cinéticas estudiadas como en los dos experimentos anteriores. Sin embargo, para conocer cuál es el mejor ajuste obtenido se presenta a continuación una tabla con los parámetros obtenidos para la ecuación cinética así como el error cuadrático medio obtenido en la modelización.

Tabla 28. Valores de los parámetros cinéticos y el error de la modelización en cinéticas de primer y segundo orden para las microalgas del Experimento 3

Algas	V_{Lim_1} (ml)	k_1 (d ⁻¹)	Error	V_{Lim_2} (ml)	k_2 (ml ⁻¹ ·d ⁻¹)	Error
No sonicado (N)	35.8	0.8081	9.05	39.4	0.03044	5.17
Blanco (N)	20.0	1.2241	0.48	21.4	0.10781	1.62
No sonicado (Ru)	82.3	0.2485	20.26	103.8	0.00248	15.88
Blanco (Ru)	37.7	0.4099	3.02	46.9	0.00912	1.56

Observando los datos del error presentados en el gráfico se puede comprobar que se realiza un mejor ajuste con cinéticas de segundo orden para todas las muestras excepto para el blanco con fango normal, cuyo mejor ajuste se realiza con una cinética de primer orden.

Respecto a la constante cinética obtenida para la cinética de primer orden se puede observar que el valor mayor se da para el blanco con fango normal, mientras que el valor más pequeño obtenido es para el blanco con rumen. En el caso de la cinética de segundo orden el valor de la constante cinética más alto se obtiene también para el blanco con fango normal mientras que el valor más pequeño se obtiene para la muestra sin sonicar con rumen.

4.3.4.2. Reducción del sulfato

También se ha calculado la DQO consumida por parte de las bacterias sulfatorreductoras durante el proceso de reducción del sulfato.

En la siguiente tabla se muestra la cantidad de sulfato consumida durante la digestión anaerobia y la DQO asociada.

Tabla 29. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas del FBR del Experimento 3

Muestra		SO ₄ (mg SO ₄ /l)	DQO _{BSR} (mg DQO)
89 MJ/kg SS	30W,27min	757.33	404.67

4.3.4.3. Balance global de DQO

A continuación se muestra una tabla con el resultado del balance de DQO para la muestra escogida. Hay que tener en cuenta que los métodos de análisis llevan asociado un error relativo, que también se presenta en la tabla.

Tabla 30. Balance global de DQO para las microalgas del FBR del Experimento 3

Muestra		DQO _{Inicial} (mg DQO)	DQO _{Final} (mg DQO)	DQO _{Metano} (mgDQO)	DQO _{BSR} (mg DQO)	% error
89 MJ/kg SS	30W,27min	1160.1	778	324.0	404.67	29.9

4.3.5. Potencial de biometanización y biodegradabilidad

Al igual que para el experimento anterior, se calculan los valores teóricos de producción de metano y el potencial de biometanización a partir de la reacción 7 y de la ecuación 8, así como la biodegradabilidad de las microalgas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el cálculo de estos parámetros:

Tabla 31. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas del FBR del Experimento 3

Algas		V real CH ₄ (ml)	V teórico CH ₄ (ml)	Rendimiento (mlCH ₄ /gDQO)	BMP (ml/gDQO)	Biodegradabilidad (%)
89 MJ/kg SS	30W,27min	113.4	312.68	126.92	0.1090	36.27
150 MJ/kg SS	30W,45min	141.9	332.03	149.56	0.1274	42.74
	40W,34min	56.7	264.32	75.07	0.0682	21.45
	50W,27min	83.6	278.83	104.92	0.0909	29.98
248 MJ/kg SS	50W,45min	113.8	225.64	176.50	0.1391	50.44
No sonicado (Normal)		19.8	269.16	25.74	0.0317	7.36
No sonicado (Rumen)		46.7	269.16	60.72	0.0696	17.35

Se puede observar en la tabla que los volúmenes reales de metano producidos por las microalgas son menores que los volúmenes teóricos calculados a partir de la DQO de las muestras. En concreto, los volúmenes reales son entre un 7% y un 50% menores que los volúmenes teóricos.

Respecto al rendimiento de la producción de metano, se han obtenido valores de entre 75.07 ml/g DQO y 176.50 ml/g DQO para las muestras pretratadas y valores de 25.74 ml/g DQO y 60.72 ml/g DQO para las muestras sin sonicar utilizando fango normal y rumen, respectivamente.

En cuanto al potencial de biometanización, los valores obtenidos también son menores que para los experimentos anteriores obteniendo valores entre 0.0317 ml/g DQO y 0.1391 ml/g DQO para las muestras sin sonicar con fango normal y la muestra pretratada con una energía de 248 MJ/kg SS, respectivamente.

Respecto a los valores de biodegradabilidad, éstos varían en un amplio rango para las muestras pretratadas (entre 21.45% y 50.44%). Para las muestras sin sonicar los valores obtenidos son más bajos (7.36% y 17.35%), siendo mayor la biodegradabilidad para la muestra digerida anaerobiamente con rumen.

Por tanto, se puede ver que el uso de la sonicación como pretratamiento sí que favorece la biodegradabilidad de las microalgas ya que todas las muestras han obtenido un porcentaje mayor que la muestra sin pretratar.

También se puede observar que la muestra sonicada utilizando la mayor energía (248 MJ/kg SS) es la que tiene un porcentaje de biodegradabilidad más alto. Sin embargo, para el resto de muestras pretratadas no se sigue ningún patrón.

Los resultados obtenidos por *Cho et al., 2013* para un cultivo de *Chlorella* y *Scenedesmus* muestran que se obtiene una biodegradabilidad del 38.9%, 41.3%, 42.6% y 44.6% para muestras sin pretratar y sonicadas a unas energías de 39, 117 y 234 MJ/kg SV, respectivamente. Las energías de 117 y 234 MJ/kg SV son similares a las de 150 y 248 MJ/kg SS probadas en este experimento y los resultados de biodegradabilidad obtenidos se asemejan en ambos casos. Sin embargo, el porcentaje de biodegradabilidad obtenido en este experimento es mucho menor que el proporcionado por la bibliografía.

4.3.6. Rendimiento energético

Finalmente, se ha realizado un balance energético del proceso para comprobar la viabilidad de la aplicación del pretratamiento. Para ello se ha calculado la energía producida por el metano generado y también la energía consumida en la sonicación mediante las ecuaciones 9 y 10.

Los datos obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 32. Balance energético realizado para el Experimento 3

Muestra	89 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			248 MJ/kg SS
	30W,27min	30W,45min	40W,34min	50W,27min	50W,45min
E_0	0.00326	0.00399	0.00159	0.00255	0.00486
E_i	0.03824	0.06152	0.07315	0.07030	0.13561
E_0/E_i	0.08525	0.06485	0.02172	0.03629	0.03582

Se puede observar que para ninguna de las muestras se obtiene un valor de E_o/E_i por encima de 1, lo que significa que se el proceso no es rentable puesto que se consume más energía de la que se produce.

Sin embargo, la muestra con un ratio E_o/E_i más alto es la de 30W, 27 minutos (89 MJ/kg SS) que corresponde a la energía más baja utilizada, puesto que en la energía producida no hay grandes diferencias entre unas muestras y otras mientras que la energía consumida es mucho menor que en las demás muestras.

Por tanto, para el experimento 3 realizado con muestra procedente del fotobiorreactor de la EDAR del Carraixet (formada en su mayoría por el género *Chlorella*) se observa que la mayor biodegradabilidad (50.44%) se obtiene para la muestra sonicada con una energía de 248 MJ/kg SS, correspondiente a una potencia de 50W y un tiempo de 44 minutos. Además, también se observa que se obtiene una mayor biodegradabilidad (17.35%) para la muestra sin sonicar mezclada con fango normal y líquido ruminal.

4.4. Experimento 4: *Chlorella vulgaris*

En este cuarto experimento se ha utilizado la cepa de microalgas formada por la especie *Chlorella vulgaris* para estudiar también su biodegradabilidad y la influencia del método de sonicación sobre la producción de biogás.

4.4.1. Caracterización de la biomasa algal

Para conocer el estado inicial del cultivo de microalgas, se caracteriza la biomasa en términos de DQO, sólidos y nutrientes. Además, esto permite determinar el grado de concentración que deben alcanzar las microalgas y las condiciones de sonicación posteriores.

A continuación se presenta una tabla con la caracterización inicial del cultivo de *Chlorella vulgaris*:

Tabla 33. Caracterización inicial de las microalgas *C. vulgaris* del Experimento 4

Muestra	Inicio	Unidades
DQO _T	235	mg DQO/l
DQO _{Sol}	47	mg DQO/l
SS	240	mg/l
N _T	27.4	mg N/l
N _{Tsol}	23.6	mg N/l
NH ₄	44.26	mg N-NH ₄ /l
P _T	11.55	mg P/l
PO ₄	4.79	mg P-PO ₄ /l
SO ₄	371.98	mg SO ₄ /l

4.4.2. Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo

El método de concentración utilizado es una centrifugación a una velocidad de 5000 rpm durante un tiempo de 3 minutos. El volumen de concentrado debe ser suficiente para poner las botellas de los ensayos de digestión anaerobia.

El pretratamiento llevado a cabo es una sonicación donde se han probado diferentes energías, así como distintas condiciones de potencia y tiempo para una energía determinada. Así pues, se han llevado a cabo 5 condiciones distintas de sonicación tras las cuales se ha determinado la DQO para cada una de las biomásas y el inóculo utilizado.

En la siguiente tabla se pueden observar los valores de DQO obtenidos.

Tabla 34. Caracterización tras la sonicación de las microalgas *C. vulgaris* y el inóculo del Experimento 4

Muestra	Inóculo	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			250 MJ/kg SS	No sonificado	Unidades
		30W,21min	30W,35min	40W,26min	50W,21min	50W,35min		
DQO _T	5294	1500	3750	1450	3350	1557	1349	mg DQO/l

También se han observado al microscopio cada una de las muestras para comprobar visualmente la eficacia del pretratamiento mediante la utilización del tinte de ácidos nucleicos Sytox Green. Así, se ha hecho un recuento de las células vivas y no viables presentes en las muestras, siendo los resultados obtenidos los siguientes:

Tabla 35. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 4

Muestras	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			250 MJ/kg SS	No sonificado
	30W,21min	30W,35min	40W,26min	50W,21min	50W,35min	
% células no viables	24.12	32.30	41.14	51.75	52.93	4.43

Al igual que para el experimento anterior, se puede comprobar que el efecto de la energía aplicada en el pretratamiento es proporcional a la cantidad de células dañadas presentes en las muestras. Además, para la misma energía aplicada (150 MJ/kg SS) se obtiene un mayor porcentaje a medida que aumenta la potencia, siendo predominante este factor sobre el tiempo de sonicación.

4.4.3. Ensayos de digestión anaerobia en batch

El volumen de fango y de microalgas necesario para llevar a cabo el ensayo se ha determinado a partir de las ecuaciones 2 y 3, con una relación inóculo-sustrato de 2 g DQO/g DQO. Así, sustituyendo en las ecuaciones los valores de DQO tanto del fango como de las microalgas se obtienen determinados volúmenes. Sin embargo, finalmente se ha realizado el experimento agrupando los ensayos con DQO similares, y por tanto volúmenes de sustrato parecidos, y se han recalculado las relaciones inóculo-sustrato, obteniéndose los volúmenes y relaciones que se muestran a continuación:

Tabla 36. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 4

Muestra	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			250 MJ/kg SS	No sonificado	Blanco 1	Blanco 2
	30W,21 min	30W,35 min	40W,26 min	50W,21 min	50W,35 min			
V _{Sustrato} (l)	0.252	0.166	0.252	0.166	0.252	0.252	-	-
V _{Inóculo} (l)	0.148	0.234	0.148	0.234	0.148	0.148	0.148	0.234
V _{Agua} (l)	-	-	-	-	-	-	0.252	0.166
I/S	2.07	2	2.14	2.23	2	2.3	-	-

Tal y como se muestra en la tabla anterior, para cada uno de los ensayos se han utilizado microalgas sonicadas con diferentes condiciones mientras que en los blancos se ha sustituido el sustrato por agua destilada. Para cada uno de los reactores batch se ha utilizado un volumen final de 0.4 l y un espacio de cabeza de 0.2 l.

A continuación se lleva a cabo la digestión anaerobia de las muestras y la cuantificación de la producción de metano mediante la utilización del equipo Bioprocess. Los ensayos se mantienen hasta que se detiene la producción de metano.

4.4.4. Balance de DQO

Se ha realizado un balance de la DQO a un ensayo de digestión anaerobia para comprobar de manera teórica la validez de los datos experimentales obtenidos, mediante la ecuación 4. La muestra escogida para realizar el balance de DQO corresponde a la muestra de menor energía (90 MJ/kg SS, correspondiente a 30W, 21 minutos).

4.4.4.1. Producción de metano

En el gráfico 11 se puede observar la evolución de la producción de metano, medida en ml, llevada a cabo por la degradación de la biomasa algal durante la digestión anaerobia, medido en días. Están representados por colores las diferentes condiciones de sonicación aplicadas a las muestras, además de la muestra sin pretratar y los dos blancos.

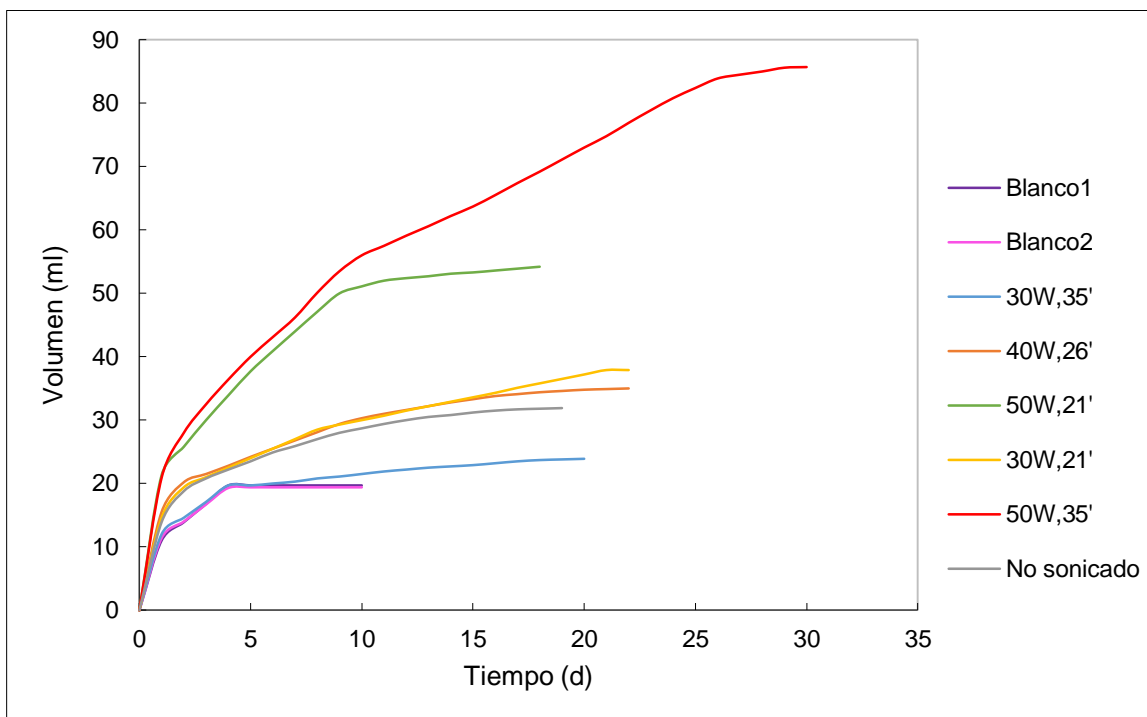


Gráfico 12. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas *C. vulgaris* del Experimento 4

Como se puede observar en el gráfico, la muestra que más volumen de metano ha producido (85.7 ml) es la de mayor energía aplicada en el pretratamiento (250 MJ/kg SS) seguida de la muestra de 50W, 21 minutos que corresponde a la energía intermedia aplicada (150 MJ/kg SS), con un volumen de metano de 54.2 ml. Estas dos muestras se corresponden con aquellas que tienen un porcentaje de células no viables mayor, como puede verse en la tabla 35.

Las muestras que menor volumen de metano han producido (37.9 ml, 35.0 ml, 31.9 ml y 23.9 ml) corresponden a las muestras de menor energía aplicada (90 MJ/kg SS), la muestra de 150 MJ/kg SS con una potencia de 40W, la muestra sin pretratar y la muestra de 150 MJ/kg SS para una potencia de 30W.

Sin embargo, la muestra con la menor energía aplicada (90 MJ/kg SS, color verde) debería ser la que menos volumen de biogás produjese de las muestras pretratadas. También se puede observar en el gráfico que la muestras de 30W, 35 minutos (150 MJ/kg SS) ha producido menos volumen de metano que la muestra sin sonicar teniendo en cuenta que es la que mayor valor de DQO tiene (tabla 34).

Respecto al blanco, se puede comprobar en el gráfico que ha producido algo de metano (19.7 y 19.4 ml) y se necesita restar la producción asociada al blanco al volumen producido por el resto de muestras para poder calcular la biodegradabilidad.

Los valores de metano producidos solamente debido a la degradación de las microalgas y la DQO asociada a dicha producción se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 37. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 4

Muestra	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			250 MJ/kg SS	No sonificado
	30W,21min	30W,35min	40W,26min	50W,21min	50W,35min	
V_{Metano} (ml)	18.2	4.5	15.3	34.8	66	12.2
DQO_{Metano} (mgDQO)	52.0	12.9	43.7	99.4	188.6	34.9

Para este experimento los volúmenes de metano producidos por las muestras son muy bajos, especialmente teniendo en cuenta que el proceso de digestión anaerobia ha durado en torno a 20 días.

El volumen de metano obtenido para el ensayo de 30W, 35 minutos es bastante anómalo por lo que se ha considerado que el experimento no se ha realizado correctamente y por tanto se va a descartar este ensayo para los cálculos posteriores.

Las curvas de producción de metano se han modelizado para comprobar si se ajustan a una cinética de primer o de segundo orden, utilizando las expresiones 5 y 6. Calculando los valores de V_{lim} y la constante cinética para que se ajusten lo máximo posible a los datos experimentales, se obtienen las siguientes gráficas:

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

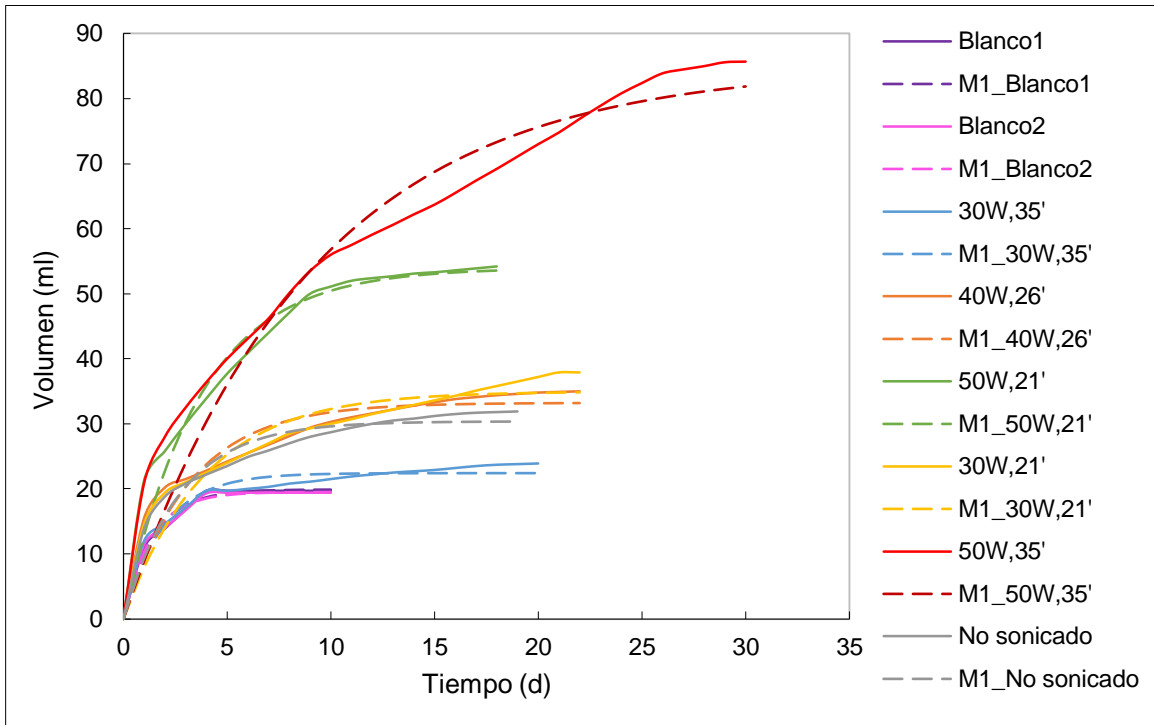


Gráfico 13. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 4 con cinéticas de primer orden

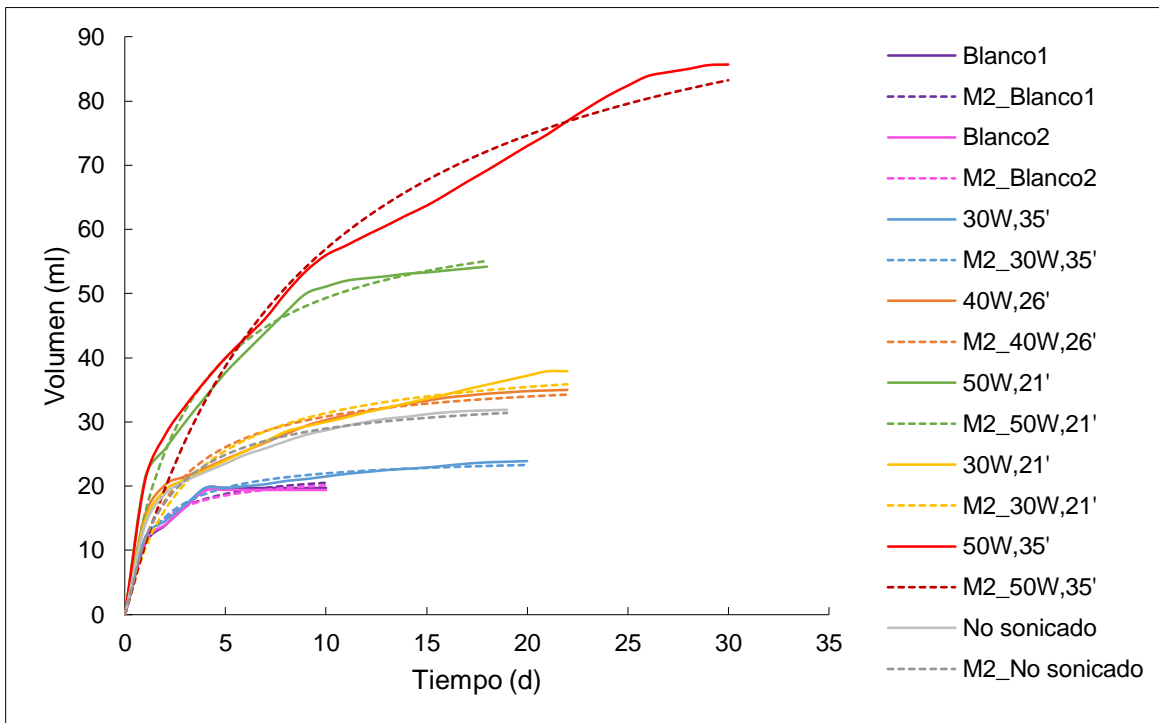


Gráfico 14. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 4 con cinéticas de segundo orden

Como se puede observar en ambos gráficos, las curvas de producción de metano construidas para este experimento parece que se ajustan mejor a cinéticas de segundo orden. Para comprobarlo se presenta a continuación una tabla con los parámetros obtenidos para la ecuación cinética así como el error cuadrático medio obtenido en la modelización.

Tabla 38. Valores de los parámetros cinéticos y el error de la modelización en cinéticas de primer y segundo orden para las microalgas del Experimento 4

Algas		V _{Lim_1} (ml)	k ₁ (d ⁻¹)	Error	V _{Lim_2} (ml)	k ₂ (ml ⁻¹ ·d ⁻¹)	Error
90 MJ/kg SS	30W,21min	35.0	0.2563	12.02	40.7	0.00822	7.83
150 MJ/kg SS	30W,35min	22.4	0.5241	5.09	24.8	0.03176	2.32
	40W,26min	33.2	0.3139	10.72	37.8	0.01182	6.39
	50W,21min	54.0	0.2734	10.20	64.5	0.00503	7.84
250 MJ/kg SS	50W,35min	85.0	0.1104	25.51	108.2	0.00103	19.29
No sonificado		30.4	0.3683	7.73	34.7	0.01470	3.93
Blanco1		19.9	0.7010	1.97	22.6	0.04317	2.49
Blanco2		19.5	0.7466	1.96	22.0	0.04922	2.22

Observando los datos del error presentados en el gráfico se puede comprobar que se realiza un mejor ajuste con cinéticas de segundo orden para todas las muestras excepto para los dos blancos, puesto que se ajustan mejor a una cinética de primer orden.

Observando el valor de las constantes cinéticas se puede comprobar que para la cinética de primer orden el valor mayor obtenido se da en el Blanco2, mientras que el valor más pequeño se obtiene para la muestra de mayor energía (250 MJ/kg SS). Respecto a la cinética de segundo orden se observa que el valor de la constante cinética más alto corresponde también al Blanco2, mientras que el valor menor se obtiene para la muestra de mayor energía (250 MJ/kg SS).

4.4.4.2. Reducción del sulfato

También se ha calculado la DQO consumida por parte de las bacterias sulfatorreductoras durante el proceso de reducción del sulfato.

En la siguiente tabla se muestra la cantidad de sulfato consumida durante la digestión anaerobia y la DQO asociada.

Tabla 39. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas *C. vulgaris* del Experimento 4

Muestra		SO ₄ (mg SO ₄ /l)	DQO _{BSR} (mg DQO)
90 MJ/kg SS	30W,21min	118.53	59.7

4.4.4.3. Balance global de DQO

A continuación se muestra una tabla con el resultado del balance de DQO para la muestra escogida. Hay que tener en cuenta que los métodos de análisis llevan asociado un error relativo, que también se presenta en la tabla.

Tabla 40. Balance global de DQO para las microalgas *C. vulgaris* del Experimento 4

Muestra		DQO _{Inicial} (mg DQO)	DQO _{Final} (mg DQO)	DQO _{Metano} (mgDQO)	DQO _{BSR} (mg DQO)	% error
90 MJ/kg SS	30W,21min	378.0	314.8	52.0	59.7	12.83

4.4.5. Potencial de biometanización y biodegradabilidad

Al igual que para el experimento anterior, se calculan los valores teóricos de producción de metano y el potencial de biometanización a partir de la reacción 7 y de la ecuación 8, así como la biodegradabilidad de las microalgas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el cálculo de estos parámetros:

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

Tabla 41. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas *C. vulgaris* del Experimento 4

Algas		V real CH ₄ (ml)	V teórico CH ₄ (ml)	Rendimiento (mlCH ₄ /gDQO)	BMP (ml/gDQO)	Biodegradabilidad (%)
90 MJ/kg SS	30W,21min	18.2	66.64	95.58	0.0810	27.31
150 MJ/kg SS	40W,26min	15.3	62.23	86.04	0.0758	24.59
	50W,21min	34.8	150.95	80.68	0.0771	23.05
250 MJ/kg SS	50W,35min	66	71.67	322.28	0.1999	92.09
No sonicado		12.2	53.37	80.00	0.0724	22.86

En la tabla se puede observar que para todas las muestras el volumen real de metano producido es menor que el volumen teórico calculado a partir de la DQO de la muestra. En concreto, los volúmenes reales corresponden en torno a un 25% del volumen teórico mientras que la muestra de 250 MJ/kg SS ha producido en torno a un 92% del volumen teórico calculado.

Respecto al rendimiento, excepto para la muestra sonicada aplicando la mayor energía (322.28 ml metano/g DQO) todas las demás muestras tienen un rendimiento inferior a 100 ml de metano por cada gramo de DQO, en un rango de entre 80.00 y 95.58 ml metano/g DQO.

En cuanto al potencial de biometanización, para casi todas las muestras se han obtenido valores similares entre 0.07 y 0.08 ml/g DQO. Sin embargo, para la muestra de mayor energía aplicada en la sonicación (250 MJ/kg SS) tiene un valor de 0.1999 ml/g DQO.

Observando los resultados obtenidos en cuanto a biodegradabilidad, se puede comprobar que los resultados obtenidos no siguen ningún patrón determinado. La muestra de mayor energía aplicada (250 MJ/kg SS) tiene un porcentaje de biodegradabilidad cercano al 100% puesto que el volumen real de metano producido es muy cercano al teórico. Para el resto de muestras se ha obtenido un porcentaje de biodegradabilidad similar (entre 22.86% y 27.31%) y no parece que el pretratamiento tenga un efecto visible sobre la mejora de este parámetro.

Para este experimento también se han comparado los datos de biodegradabilidad obtenidos con los resultados de *Cho et al., 2013* para una biomasa compuesta por *Chlorella* y *Scenedesmus*. En sus experimentos obtuvieron una biodegradabilidad del

38.9% para la muestra sin sonicar y un 42.6% y 44.6% para muestras sonicadas a 117 y 234 MJ/kg SV. Como se puede comprobar con los datos presentados en la tabla 41, los porcentajes de biodegradabilidad obtenidos no son semejantes a los conseguidos por *Cho et al.*

4.4.6. Rendimiento energético

Finalmente, se ha realizado un balance energético del proceso para comprobar la viabilidad de la aplicación del pretratamiento. Para ello se ha calculado la energía producida por el metano generado y también la energía consumida en la sonicación mediante las ecuaciones 9 y 10.

Los datos obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 42. Balance energético realizado para el Experimento 4

Muestra	90 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS		250 MJ/kg SS
	30W,21min	40W,26min	50W,21min	50W,35min
E_0	0.00050	0.00019	0.00002	0.00781
E_i	0.09900	0.17069	0.07388	0.26492
E_0/E_i	0.00507	0.00114	0.00030	0.02947

Se puede observar que para ninguna de las muestras se obtiene un valor de E_0/E_i por encima de 1, lo que significa que se el proceso no es rentable puesto que se consume más energía de la que se produce.

Sin embargo, la muestra con un ratio E_0/E_i más alto es la de 50W, 35 minutos (250 MJ/kg SS) que corresponde a la energía más alta utilizada, puesto que a pesar de que es la que más energía consume también ha sido la que más energía ha producido ya que, como se puede ver en la tabla 37, es la que más volumen de metano ha producido.

Por tanto, para el experimento 4 realizado con la especie *Chlorella vulgaris* se observa que se obtiene una mayor biodegradabilidad (92.09%) para la muestra sonicada con una energía de 250 MJ/kg SS, correspondiente a una potencia de 50W y un tiempo de 35 minutos. Además, para esta muestra también se obtiene el mejor rendimiento energético (0.02947).

4.5. Experimento 5: *Chlamydomonas reinhardtii*

En este cuarto experimento se ha utilizado la cepa de microalgas formada por la especie *Chlamydomonas reinhardtii* para estudiar también su biodegradabilidad y la influencia del método de sonicación sobre la producción de biogás.

4.5.1. Caracterización de la biomasa algal

Para conocer el estado inicial del cultivo de microalgas, se caracteriza la biomasa en términos de DQO, sólidos y nutrientes. Además, esto permite determinar el grado de concentración que deben alcanzar las microalgas y las condiciones de sonicación posteriores.

A continuación se presenta una tabla con la caracterización inicial del cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*:

Tabla 43. Caracterización inicial de las microalgas *C. reinhardtii* del Experimento 5

Muestra	Inicio	Unidades
DQO _T	308	mg DQO/l
DQO _{Sol}	76	mg DQO/l
SS	220	mg/l
N _T	21.7	mg N/l
N _{Tsol}	15.4	mg N/l
NH ₄	29.31	mg N-NH ₄ /l
P _T	-	mg P/l
PO ₄	3.48	mg P-PO ₄ /l
SO ₄	425.35	mg SO ₄ /l

4.5.2. Concentración, sonicación y caracterización de la biomasa algal y del inóculo

El método de concentración utilizado es una centrifugación a una velocidad de 5000 rpm durante un tiempo de 3 minutos. El volumen de concentrado debe ser suficiente para poner las botellas de los ensayos de digestión anaerobia.

El pretratamiento llevado a cabo es una sonicación donde se han probado diferentes energías, así como distintas condiciones de potencia y tiempo para una energía determinada. Así pues, se han llevado a cabo 5 condiciones distintas de sonicación tras las cuales se ha determinado la DQO para cada una de las biomásas y el inóculo utilizado.

En la siguiente tabla se pueden observar los valores de DQO obtenidos.

Tabla 44. Caracterización tras la sonicación de las microalgas *C. reinhardtii* y el inóculo del Experimento 5

Muestra	Inóculo	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			249 MJ/kg SS	No sonicado	Unidades
		30W,23min	30W,39min	40W,29min	50W,23min	50W,39min		
DQO _T	12552	1812	1560	1813	1510	2468	1250	mg DQO/l

También se han observado al microscopio cada una de las muestras para comprobar visualmente la eficacia del pretratamiento mediante la utilización del tinte de ácidos nucleicos Sytox Green. Así, se ha hecho un recuento de las células vivas y no viables presentes en las muestras, siendo los resultados obtenidos los siguientes:

Tabla 45. Recuento de células no viables tras la sonicación presentes en las muestras del Experimento 5

Muestras	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			249 MJ/kg SS	No sonicado
	30W,23min	30W,39min	40W,29min	50W,23min	50W,39min	
% células no viables	45.21	50.00	53.95	55.77	71.96	28.50

Al igual que para el resto de experimentos, se puede comprobar que el efecto de la energía aplicada en el pretratamiento es proporcional a la cantidad de células dañadas presentes en las muestras y que la aplicación del pretratamiento mejora considerablemente el porcentaje obtenido.

4.5.3. Ensayos de digestión anaerobia en batch

El volumen de fango y de microalgas necesario para llevar a cabo el ensayo se ha determinado a partir de las ecuaciones 2 y 3 con una relación inóculo-sustrato de 2 g DQO/g DQO. Así, sustituyendo en las ecuaciones los valores de DQO tanto del fango como de las microalgas se obtienen determinados volúmenes. Sin embargo, finalmente se ha realizado el experimento agrupando los ensayos con DQO similares, y por tanto volúmenes de sustrato parecidos, y se han recalculado las relaciones inóculo-sustrato, obteniéndose los volúmenes y relaciones que se muestran a continuación:

Tabla 46. Volúmenes de inóculo y sustrato en los ensayos del Experimento 5

Muestra	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			249 MJ/kg SS	No sonificado	Blanco
	30W,23min	30W,39 min	40W,29 min	50W,23 min	50W,39min		
V _{Sustrato} (l)	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	-
V _{Inóculo} (l)	0.122	0.122	0.122	0.122	0.122	0.122	0.122
V _{Agua} (l)	-	-	-	-	-	-	0.278
I/S	3	3.5	2.7	3.6	2	4.4	-

Tal y como se muestra en la tabla anterior, para cada uno de los ensayos se han utilizado microalgas sonicadas con diferentes condiciones mientras que en los blancos se ha sustituido el sustrato por agua destilada. Para cada uno de los reactores batch se ha utilizado un volumen final de 0.4 l y un espacio de cabeza de 0.2 l.

A continuación se lleva a cabo la digestión anaerobia de las muestras y la cuantificación de la producción de metano mediante la utilización del equipo Bioprocess. Los ensayos se mantienen hasta que se detiene la producción de metano.

4.5.4. Balance de DQO

Se ha realizado un balance de la DQO a un ensayo de digestión anaerobia para comprobar de manera teórica la validez de los datos experimentales obtenidos, mediante la ecuación 4. La muestra escogida para realizar el balance de DQO corresponde a la muestra de menor energía (88 MJ/kg SS, correspondiente a 30W, 23 minutos).

4.5.4.1. Producción de metano

En el gráfico 14 se puede observar la evolución de la producción de metano, medida en ml, llevada a cabo por la degradación de la biomasa algal durante la digestión anaerobia, medido en días. Están representados por colores las diferentes condiciones de sonicación aplicadas a las muestras, además de la muestra sin pretratar y el blanco.

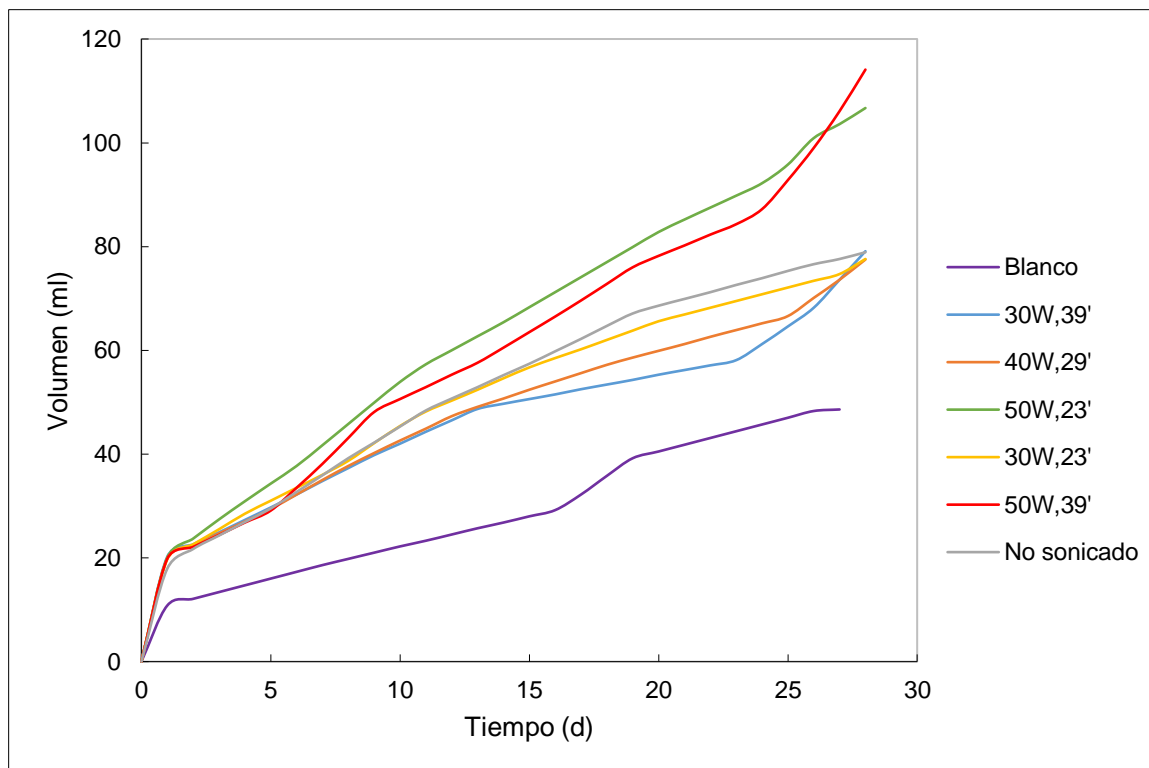


Gráfico 15. Producción de metano producida durante la digestión anaerobia de las microalgas *C. reinhardtii* del Experimento 5

Como se puede observar en el gráfico, las muestras que más volumen de metano han producido son la de mayor energía aplicada en el pretratamiento (50W, 39 minutos) con un volumen de 114.1 ml seguida de la muestra de energía intermedia (150 MJ/kg SS) correspondiente a la muestra de 50W, 23 minutos, con un volumen de 106.7 ml. Estas dos muestras se corresponden con aquellas que tienen un porcentaje de células no viables mayor, como puede verse en la tabla 45.

El resto de muestras (la de 30W, 39 minutos; la muestra sin pretratar; la de 30W, 23 minutos y la de 40W, 29 minutos) han producido una cantidad de metano similar, siendo estos valores de 79.1 ml, 78.9 ml, 77.6 ml y 77.5 ml, respectivamente.

Respecto al blanco, se puede comprobar en el gráfico que ha producido algo de metano y se necesita restar la producción asociada al blanco al volumen producido por el resto de muestras para poder calcular la biodegradabilidad.

Los valores de metano producidos solamente debido a la degradación de las microalgas y la DQO asociada a dicha producción se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 47. Volumen de metano producido y su DQO asociada para el Experimento 5

Muestra	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			249 MJ/kg SS	No sonificado
	30W,23min	30W,39min	40W,29min	50W,23min	50W,39min	
V_{Metano} (ml)	29	30.5	28.9	58.1	65.5	30.3
DQO_{Metano} (mgDQO)	82.9	87.2	82.6	166.0	187.2	86.6

Para este experimento los volúmenes de metano producidos por las muestras son bajos, especialmente teniendo en cuenta que el proceso de digestión anaerobia ha durado 28 días.

Las curvas de producción de metano se han modelizado para comprobar si se ajustan a una cinética de primer o de segundo orden, utilizando las expresiones 5 y 6. Calculando los valores de V_{lim} y la constante cinética para que se ajusten lo máximo posible a los datos experimentales, se obtienen las siguientes gráficas:

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

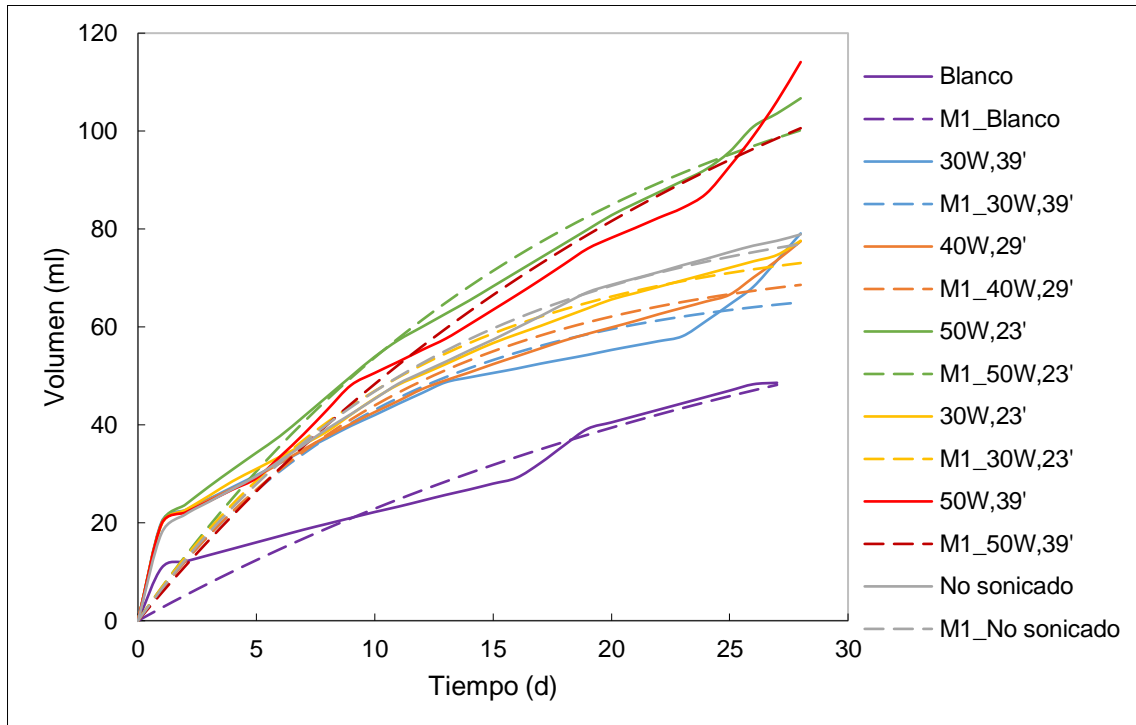


Gráfico 16. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 5 con cinéticas de primer orden

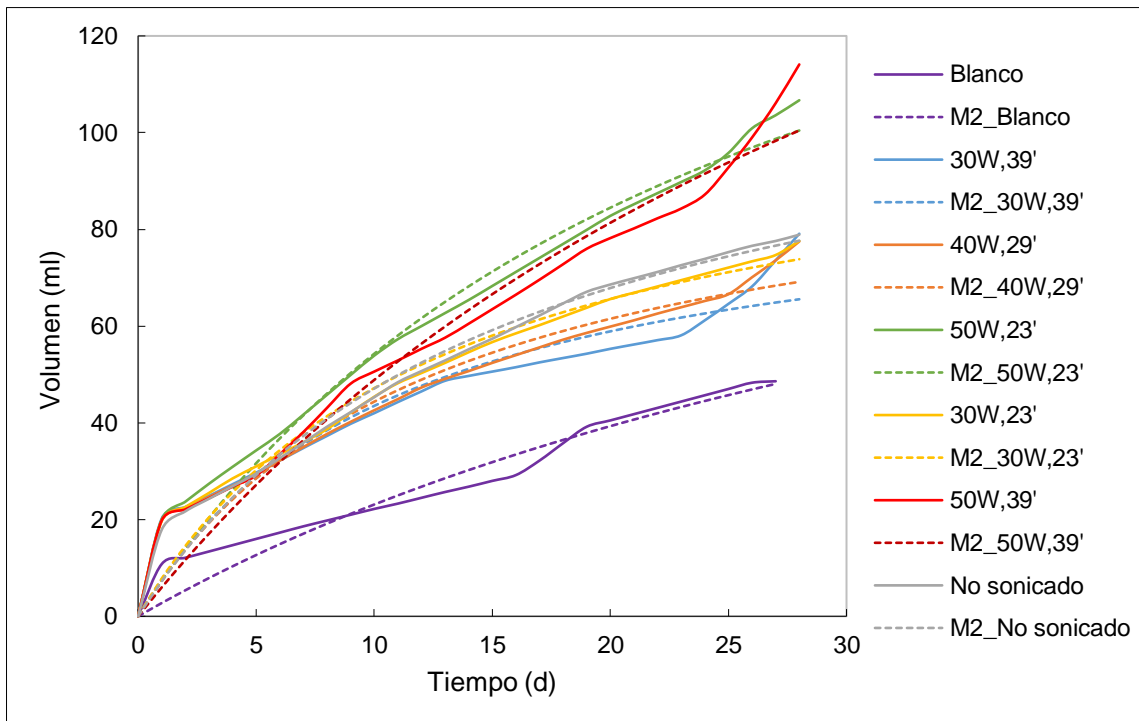


Gráfico 17. Modelización de las curvas de producción de metano para el Experimento 5 con cinéticas de segundo orden

Como se puede observar en ambos gráficos, las curvas de producción de metano construidas para este experimento parece que se ajustan mejor a cinéticas de segundo orden. Para comprobarlo se presenta a continuación una tabla con los parámetros obtenidos para la ecuación cinética así como el error cuadrático medio obtenido en la modelización.

Tabla 48. Valores de los parámetros cinéticos y el error de la modelización en cinéticas de primer y segundo orden para las microalgas del Experimento 5

Algas		V _{Lim_1} (ml)	k ₁ (d ⁻¹)	Error	V _{Lim_2} (ml)	k ₂ (ml ⁻¹ ·d ⁻¹)	Error
88 MJ/kg SS	30W,23min	79.7	0.0889	20.13	107.6	0.00073	17.30
150 MJ/kg SS	30W,39min	69.8	0.0959	28.94	91.2	0.00100	25.66
	40W,29min	74.9	0.0884	23.52	100.2	0.00079	20.48
	50W,23min	128.1	0.0544	23.81	190.4	0.00021	21.84
249 MJ/kg SS	50W,39min	155.2	0.0373	29.39	242.8	0.00010	28.38
No sonicado		86.9	0.0775	17.71	121.5	0.00052	15.65
Blanco		82.4	0.0325	16.43	131.6	0.00016	16.15

Observando los datos del error presentados en el gráfico se puede comprobar que se realiza un mejor ajuste con cinéticas de segundo orden para todas las muestras.

Aun así, la modelización para este experimento no se ajusta tan bien como para los anteriores experimentos puesto que la forma de las curvas obtenida no sigue una tendencia parabólica.

Observando los valores de las constantes cinéticas obtenidos para la cinética de primer orden se observa que el valor más alto corresponde a la muestra de 150 MJ/kg SS (potencia de 30W), mientras que el valor más pequeño se obtiene para el Blanco. En cuanto a la cinética de segundo orden puede observarse que el valor de la constante cinética más alto corresponde también a la muestra de 150 MJ/kg SS (potencia de 30W), mientras que el valor más pequeño se obtiene para la muestra de mayor energía (249 MJ/kg SS).

4.5.4.2. Reducción del sulfato

También se ha calculado la DQO consumida por parte de las bacterias sulfatorreductoras durante el proceso de reducción del sulfato.

En la siguiente tabla se muestra la cantidad de sulfato consumida durante la digestión anaerobia y la DQO asociada.

Tabla 49. Concentración de sulfato y su DQO asociada para las microalgas *C. reinhardtii* del Experimento 5

Muestra		SO ₄ (mg SO ₄ /l)	DQO _{BSR} (mg DQO)
88 MJ/kg SS	30W,21min	197.26	109.5

4.5.4.3. Balance global de DQO

A continuación se muestra una tabla con el resultado del balance de DQO para la muestra escogida. Hay que tener en cuenta que los métodos de análisis llevan asociado un error relativo, que también se presenta en la tabla.

Tabla 50. Balance global de DQO para las microalgas *C. reinhardtii* del Experimento 5

Muestra		DQO _{Inicial} (mg DQO)	DQO _{Final} (mg DQO)	DQO _{Metano} (mgDQO)	DQO _{BSR} (mg DQO)	% error
88 MJ/kg SS	30W,23min	503.7	230.8	82.9	109.5	15.99

4.5.5. Potencial de biometanización y biodegradabilidad

Al igual que para el experimento anterior, se calculan los valores teóricos de producción de metano y el potencial de biometanización a partir de la reacción 7 y de la ecuación 8, así como la biodegradabilidad de las microalgas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el cálculo de estos parámetros:

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD
ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

Tabla 51. Producción de metano, rendimiento, BMP y biodegradabilidad de las microalgas C. reinhardtii del Experimento 5

Algas		V real CH ₄ (ml)	V teórico CH ₄ (ml)	Rendimiento (mlCH ₄ /gDQO)	BMP (ml/gDQO)	Biodegradabilidad (%)
88 MJ/kg SS	30W,23min	29	93.38	108.68	0.1246	31.05
150 MJ/kg SS	30W,39min	30.5	68.94	154.83	0.1480	44.24
	40W,29min	28.9	93.47	108.20	0.1118	30.92
	50W,23min	58.1	64.05	317.45	0.2183	90.71
249 MJ/kg SS	50W,39min	65.5	157.09	145.91	0.1291	41.69
No sonicado		30.3	38.79	273.38	0.1844	78.12

Se puede observar en la tabla que todos los volúmenes reales de metano producidos son menores que los volúmenes teóricos calculados a partir de la DQO de las muestras. En general, para casi todas las muestras, el volumen real es entre un 30% y un 44% menor que el volumen teórico pero para las muestras de 150 MJ/kg SS de 50W y la muestra sin sonicar, el volumen real es en torno a un 90% y un 78% menor, respectivamente, del volumen teórico.

En cuanto al rendimiento se puede observar que todas las muestras tienen un rendimiento mayor de 100 ml/g DQO, estando los valores comprendidos entre 108.20 ml/g DQO y 317.45 ml/g DQO.

Respecto al potencial de biometanización se han obtenido valores en torno a 0.11 ml/g DQO y 0.21 ml/g DQO, que corresponden a las muestras de 150 MJ/kg SS para 40W y para 50W, respectivamente.

Observando los resultados obtenidos en cuanto a biodegradabilidad, se puede comprobar que la mayor biodegradabilidad se ha obtenido para la muestra de 150 MJ/kg DQO con una potencia de 50W, con un valor del 90.71%. Sin embargo, el resto de muestras han obtenido una biodegradabilidad menor que para la muestra sin sonicar, cuyo valor es del 78.12%.

Sin embargo los datos obtenidos son poco coherentes puesto que aunque para esta especie, al tener una pared celular blanda, el pretratamiento no produjese una mejora notable en la biodegradabilidad, los valores obtenidos para las muestras sonicadas deberían ser un poco superiores al valor de la muestra sin pretratar.

Según los trabajos realizados por *Mussnug et al., 2010* y *Mahdy et al. 2014* sobre la especie *Chlamydomonas reinhardtii*, la biodegradabilidad de la especie para muestras sin pretratar es de un 73% y un 75%, respectivamente. Por tanto, el valor obtenido para la muestra sin sonicar (78.12%) va acorde a los datos conseguidos en otros estudios.

Esto hace pensar que los datos obtenidos en la biodegradabilidad de las microalgas en este experimento para las muestras de menor y mayor energía y las muestras de 150 MJ/kg SS (potencia de 30W y 40W) hayan sufrido algún problema durante el proceso, probablemente debido a que la DQO de las muestras era muy baja.

4.5.6. Rendimiento energético

Finalmente, se ha realizado un balance energético del proceso para comprobar la viabilidad de la aplicación del pretratamiento. Para ello se ha calculado la energía producida por el metano generado y también la energía consumida en la sonicación mediante las ecuaciones 9 y 10.

Los datos obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 52. Balance energético realizado para el Experimento 5

Muestra	88 MJ/kg SS	150 MJ/kg SS			249 MJ/kg SS
	30W,23min	30W,39min	40W,29min	50W,23min	50W,39min
E_o	-0.00531	-0.00382	-0.00532	0.00142	-0.00411
E_i	0.11574	0.22911	0.19719	0.23674	0.24046
E_o/E_i	-0.04585	-0.01667	-0.02699	0.00600	-0.01708

Se puede observar que para ninguna de las muestras se obtiene un valor de E_o/E_i por encima de 1, lo que significa que se el proceso no es rentable puesto que se consume más energía de la que se produce.

Sin embargo, excepto la muestra de 50W, 23 minutos, todas las demás tienen una producción de energía negativa puesto que su rendimiento en la producción de metano en inferior al de la muestra sin sonicar.

Por tanto, para el experimento 5 realizado con la especie *Chlamydomonas reinhardtii* se observa que se obtiene una mayor biodegradabilidad (90.71%) para la muestra sonicada con una energía de 248 MJ/kg SS, correspondiente a una potencia de 50W y un tiempo de 39 minutos.

4.6. Comparación de los experimentos

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos respecto a viabilidad y biodegradabilidad para cada uno de los experimentos realizados con el fin de compararlos mejor.

Tabla 53. Biodegradabilidad de las distintas especies de microalgas

Condiciones sonicación		<i>Monoraphidium braunii</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Fotobiorreactor	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Baja energía		35.99	32.82	36.27	27.31	31.05
150 MJ/kg SS	30W	35.93	35.94	42.74	-	44.24
	40W	31.63	30.81	21.45	24.59	30.92
	50W	41.61	30.24	29.98	23.05	90.71
Alta energía		48.94	37.91	50.44	92.09	41.68
No sonicado		30.88	18.81	7.36	22.86	78.12

Se puede observar en la tabla que para todas las especies de microalgas estudiadas excepto *Chlamydomonas reinhardtii* se ha obtenido una biodegradabilidad superior en las muestras pretratadas con ultrasonidos respecto a la muestra sin pretratar.

También es posible apreciar que la biodegradabilidad mejora a medida que se va aumentando la energía aplicada en el pretratamiento, consiguiéndose las biodegradabilidades más altas para las muestras sonicadas a la mayor energía (aproximadamente 250 MJ/kg SS).

Para apreciar los datos de una manera más clara y visual se presentan las siguientes gráficas:

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

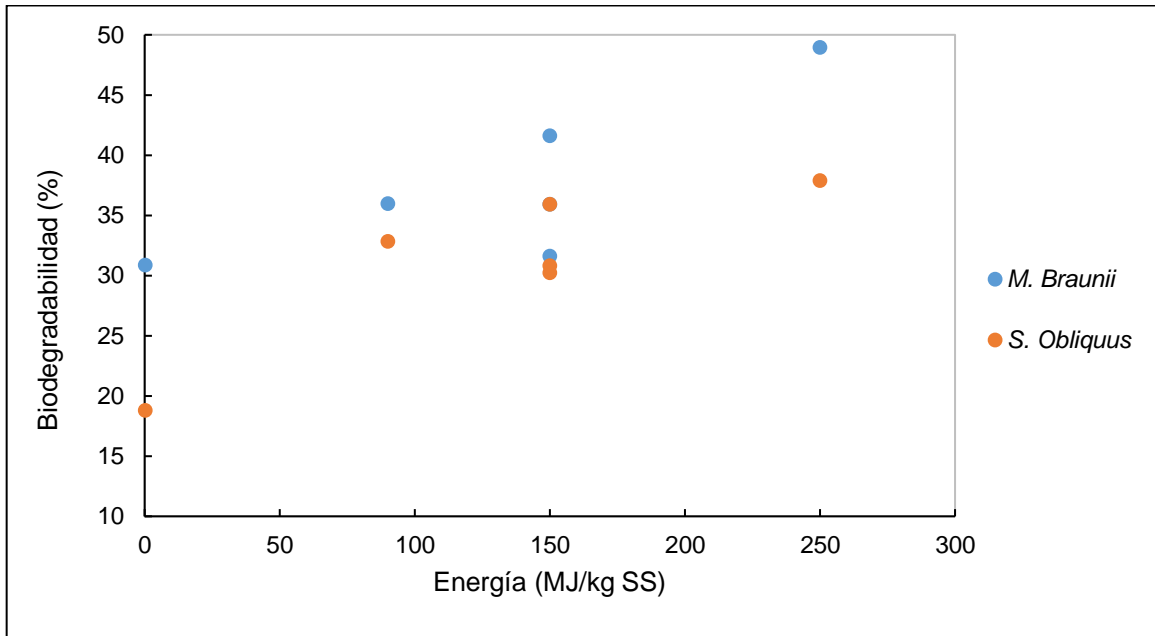


Gráfico 18. Comparación de la biodegradabilidad de *M. braunii* y *S. obliquus* frente a la energía aplicada en el pretratamiento

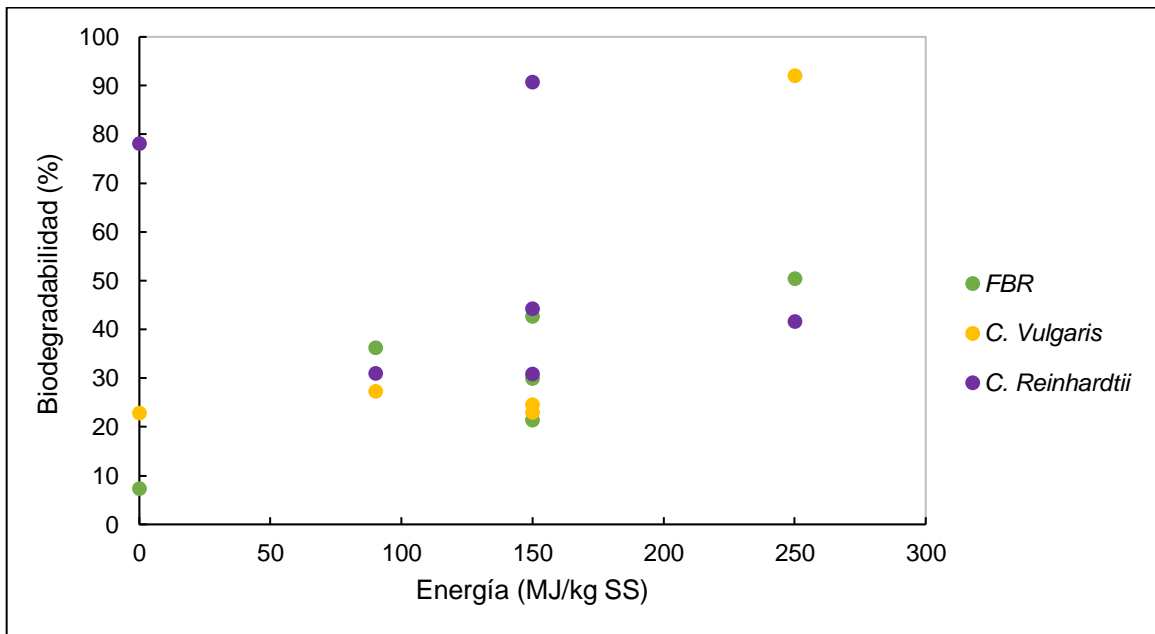


Gráfico 19. Comparación de la biodegradabilidad de las algas del fotobiorreactor, *C. vulgaris* y *C. reinhardtii* frente a la energía aplicada en el pretratamiento

Observando los gráficos se puede comprobar de manera visual lo que se ha comentado anteriormente acerca de la mejora de la biodegradabilidad tras el pretratamiento así como el efecto de la energía en el parámetro.

Respecto a los resultados obtenidos para la viabilidad de las especies de microalgas estudiadas, a continuación se presenta una tabla con los resultados obtenidos

Tabla 54. Cantidad de células no viables de las distintas especies de microalgas

Condiciones sonicación		<i>Monoraphidium braunii</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Fotobiorreactor	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Baja energía		52.68	8.02	83.3	24.12	45.21
150 MJ/kg SS	30W	59	8.47	88.59	32.30	50.00
	40W	72.49	15.01	90.7	41.14	53.95
	50W	77.16	14.86	88.05	51.75	55.77
Alta energía		93.88	19.41	93.9	52.93	71.96
No sonicado		-	-	16.24	4.43	28.50

Se puede observar en la tabla que al aplicar el pretratamiento se aumenta considerablemente la cantidad de células dañadas presentes en la muestra para todas las especies de microalgas estudiadas.

Además, también es posible comprobar que el porcentaje de células no viables aumenta a medida que también lo hace la energía aplicada en el pretratamiento, así como el efecto que tiene la pared celular en el rendimiento del pretratamiento ya que para la especie *Scenedesmus obliquus* se obtienen cantidades de células no viables menores debido a la dureza de su pared celular.

A continuación se presentan unos gráficos para comprobar visualmente el efecto de la energía sobre la viabilidad de las microalgas.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS SOBRE LA BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS

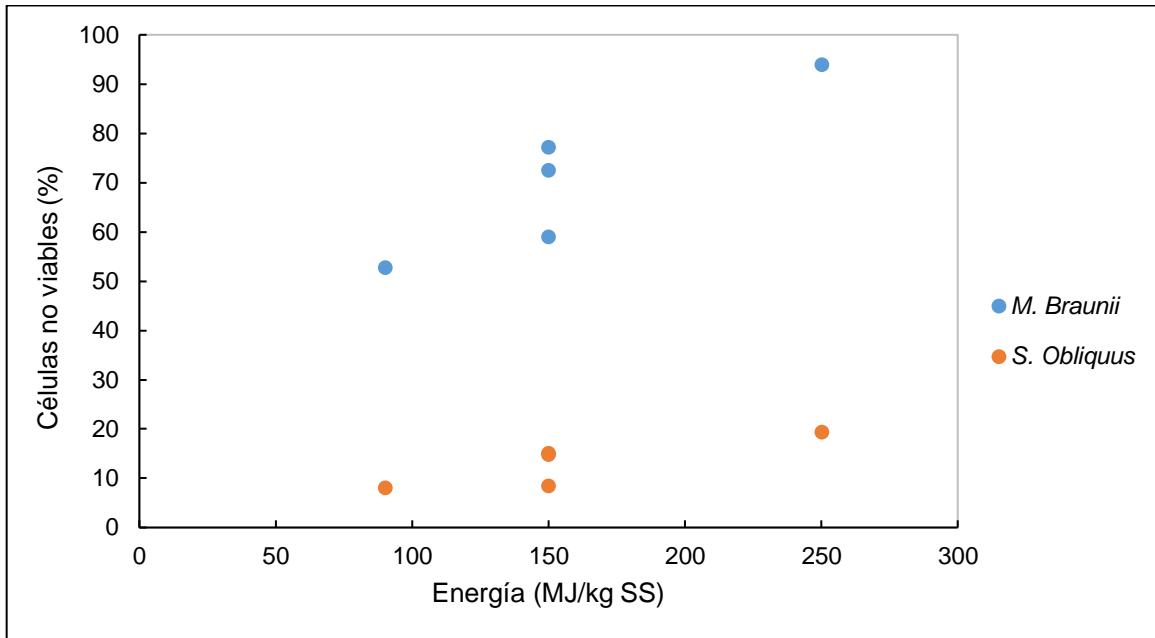


Gráfico 20. Comparación de la viabilidad de *M. braunii* y *S. obliquus* frente a la energía aplicada en el pretratamiento

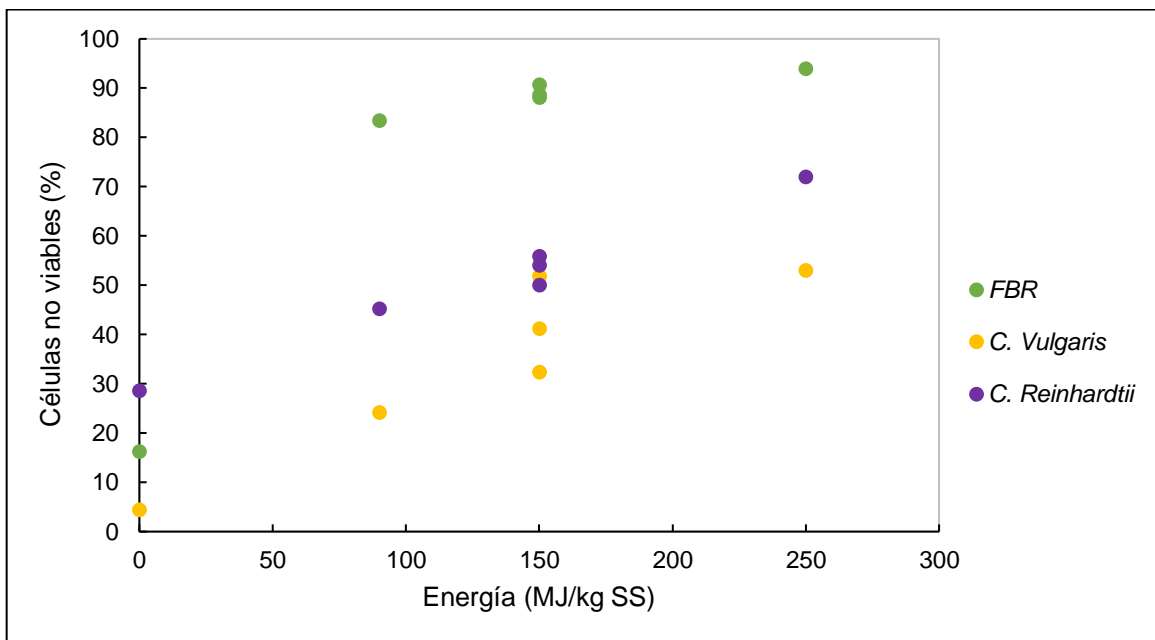


Gráfico 21. Comparación de la viabilidad de las algas del fotobiorreactor, *C. vulgaris* y *C. reinhardtii* frente a la energía aplicada en el pretratamiento

Observando ambos gráficos se puede comprobar lo establecido anteriormente en cuanto a la influencia del pretratamiento sobre la cantidad de células dañadas presentes en las muestras y al efecto que tiene la energía sobre este parámetro.

Además, también es fácil observar que de las especies puras estudiadas la pared celular de *Monoraphidium braunii* es mucho más blanda, y por tanto se rompe más fácilmente, que las del resto de las especies ya que los porcentajes de células dañadas obtenidos son más altos.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se ha llegado con la realización del presente trabajo son las que se muestran a continuación:

- La biodegradabilidad anaerobia de distintas especies de microalgas se ha visto mejorada tras la aplicación de un pretratamiento con ultrasonidos. En tres de las especies puras (*M. braunii*, *S. obliquus* y *C. vulgaris*) y en la muestra del fotobiorreactor la biodegradabilidad de las microalgas para las mejores condiciones de sonicación aumenta un 48.94%, 37.91%, 92.09% y 50.44%, respectivamente, tras la sonicación con respecto a la biodegradabilidad de la muestra sin pretratar, que tiene un valor de 30.88%, 18.81%, 24.73% y 7.36% para cada una de las especies.

La biodegradabilidad anaerobia de las distintas especies de microalgas ensayadas varía en función de la especie, tanto con la aplicación del pretratamiento como sin sonicar, ya que depende de la composición de su pared celular. La especie *Scenedesmus obliquus* tiene la pared celular más resistente por lo que la biodegradabilidad obtenida para esa especie es, en general, menor que para las otras especies ensayadas. La especie que más biodegradabilidad muestra es *Monoraphidium braunii*.

- Las curvas de producción de metano se ajustan muy bien, en general, a cinéticas de segundo orden para los experimentos realizados y las microalgas estudiadas en este trabajo. Sin embargo, para algunas de las muestras (especialmente los blancos) en ocasiones el mejor ajuste se realiza con una cinética de primer orden. De todas las constantes cinéticas calculadas para los diferentes experimentos se obtiene que el valor más alto, tanto para la cinética de primer orden como para la de segundo, corresponde al Blanco con fango normal del experimento realizado con microalgas del fotobiorreactor. Sin embargo, los valores más bajos obtenidos corresponden a la muestra pretratada con la mayor energía (249 MJ/kg SS) y al Blanco del experimento realizado con *Chlamydomonas reinhardtii*.

En general, las constantes cinéticas para los blancos y las muestras sin pretratar son menores que para las demás muestras del mismo experimento y, por tanto, la velocidad de producción de metano para estas muestras es menor que para las muestras pretratadas.

Para el experimento con la muestra de microalgas proveniente del fotobiorreactor se ha podido comparar la cinética para muestras con fango normal y muestras con rumen. Las constantes cinéticas para las muestras con fango normal son mayores que para las muestras con rumen, por lo que éstas últimas tienen una velocidad de producción de metano menor.

- La aplicación de distintas potencias y tiempos para una misma energía (150 MJ/kg SS) en el pretratamiento no tiene un efecto claro sobre la biodegradabilidad de las microalgas y, por tanto, no se puede asegurar que alguno de los dos factores influya más que el otro. Sin embargo, la aplicación de distintas energías en el pretratamiento con ultrasonidos sí que tiene un efecto notable puesto que a medida que aumenta la energía aplicada mejora la biodegradabilidad de las microalgas.
- La cuantificación visual con microscopio y tinte de ácidos nucleicos Sytox Green es un método rápido y eficaz para comprobar la efectividad del pretratamiento. La cantidad de células dañadas (muertas) presentes en las muestras es proporcional a la energía aplicada en el pretratamiento y, por tanto, a medida que aumenta la energía aplicada también lo hace el porcentaje de células no viables. El pretratamiento afecta de manera distinta a las especies estudiadas y está relacionado con la composición de la pared celular. La especie *Scenedesmus obliquus* tiene la pared celular más resistente y eso se ve reflejado en que el porcentaje de células no viables obtenido tras el pretratamiento (37.91% para las mejores condiciones de sonicación obtenidas) es mucho menor que para el resto de las especies (48.94% para *M. braunii*, 92.09% para *C. vulgaris*).
- No se ha encontrado una relación entre la cantidad de células dañadas presentes en las muestras tras el pretratamiento y la biodegradabilidad obtenida durante el proceso de digestión anaerobia. Esto puede ser debido a que haya otros factores que también influyen sobre el proceso de digestión anaerobia, como por ejemplo las características del inóculo utilizado ya que pueden ir variando de un experimento a otro.
- Con las condiciones de sonicación estudiadas en este trabajo y las especies de microalgas utilizadas, el pretratamiento con ultrasonidos no parece ser la opción más viable desde el punto de vista energético puesto que la energía consumida en la sonicación es mucho mayor que la energía obtenida del metano producido durante la digestión anaerobia de las microalgas.

6. FUTUROS TRABAJOS

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, sería recomendable continuar realizando ensayos experimentales con nuevas especies de microalgas para estudiar cómo afecta el pretratamiento a la biodegradabilidad de dichas especies. Además, también sería interesante realizar experimentos para cultivos mixtos y así estudiar también cómo se ve afectada la biodegradabilidad cuando hay distintas especies presentes en la muestra.

También sería recomendable seguir investigando con otras energías un poco más bajas para comprobar si se puede seguir consiguiendo un alto rendimiento de producción de metano pero con un menor gasto energético, ya que se reduciría la energía aplicada en el pretratamiento. Así se podría comprobar si puede llegar a ser viable energéticamente la utilización de los ultrasonidos como pretratamiento para aumentar la biodegradabilidad de las microalgas.

Además, se podría probar la aplicación de otros pretratamientos para comprobar si se consigue mejorar la producción de metano, y por tanto aumentar la biodegradabilidad de las microalgas. De estos nuevos pretratamientos probados se debería realizar un balance energético para estudiar si conllevan un menor gasto energético y se puede encontrar un pretratamiento que sea viable energéticamente.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aderemi, A., Hunter, C., Pahl, O., Shu, X. (2015). *Optimization of cell disruption in Raphidocelis Subcapitata and Chlorella Vulgaris for biomarker evaluation*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. Vol. 6, p. 481-484.

Alzate, M. E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira S. I. (2012). *Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment*. Bioresource Technology. Vol. 123, p. 488-494.

APHA (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19th edition. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington DC, USA.

Bioprocess Control (2014). *AMPTS II: Operation and maintenance manual*.

Branson Ultrasonics Corporation (2011). *250 - 450 Sonifier Analog Cell Disruptor User's Manual*.

Cho, S., Park, S., Seon, J., Yu, J., Lee, T. (2013). *Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production*. Bioresource Technology. Vol. 143, p. 330-336.

Domozych, D. S., Ciancia, M., Fangel, J. U., Mikkelsen, M. D., Ulvskov, P., Willats, W. G. T. (2012). *The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity*. Plant Science. Vol. 3, p. 1-7.

Fawley, M. W., Dean, M. L., Dimmer, S. K., Fawley, K. P. (2005). *Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta)*. J. Phycol. Vol. 42, p. 142-154.

Frigon, J-C., Matteau-Lebrun, F., Abdou, R. H., McGinn, P. J., O'Leary, S. J.B., Guiot, S. R. (2013). *Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion*. Applied Energy. Vol. 108, p. 100-107.

González-Fernández, C., García-Encina, P. A. (2009). *Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry*. Biomass and bioenergy. Vol. 33, p. 1065-1069.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P. (2012). *Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of Scenedesmus biomass on methane production*. Bioresource Technology. Vol. 110, p. 610-616.

Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas as a model organism*. Plant Physiology. Vol. 52, p. 363-406.

Keskiaho, K., Hieta, R., Sormunen, R., Myllyharjua, J. (2007). *Chlamydomonas Reinhardtii*

has multiple prolyl 4-hydroxylases, one of which is essential for proper cell wall assembly. The Plant Cell. Vol. 19, p. 256-269.

Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C. (2014). *Enhanced methane production of Chlorella vulgaris and Chlamydomonas reinhardtii by hydrolytic enzymes addition.* Energy Conversion and Management. Vol. 85, p. 551-557

Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S. M., Grimwood, J., Schmutz, J., Chlamydomonas Annotation Team, JGI Annotation Team, Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S., Grossman, A. R. (2007). *The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions.* Science. Vol. 318, p. 245-251.

Molecular probes, Inc. Invitrogen detection technologies (2006). *SYTOX® Green Nucleic Acid Stain.*

Mussgnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O. (2010). *Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept.* Journal of Biotechnology. Vol. 150, p. 51-56.

Obaya Abreu, M. C., Lorenzo Acosta, Y. (2005). *La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I.* Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Vol. 39, p. 35-48.

Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., Ferrer, I. (2014). *Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review.* Bioresource Technology. Vol. 172, p. 403-412.

Passos, F., Carretero, J., Ferrer, I. (2015). *Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound.* Chemical Engineering Journal. Vol. 279, p. 667-672.

Ramos, G., Bicudo, C., Góes-Neto, A., Moura, C. (2012). *Monoraphidium and Ankistrodesmus (Chlorophyceae, Chlorophyta) from Pantanal dos Marimbus, Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil.* Hoehnea. Vol. 39, p. 421-434.

Ras, M., Lardon, L., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P. (2011). *Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of Chlorella vulgaris.* Bioresource Technology. Vol. 102, p. 200-206.

Raposo, F., Banks, C.J., Siegert, I., Heaven, S., Borja, R. (2006). *Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests.* Process Biochemistry. Vol. 41, p. 1444–1450.

Roldán, S. (2015). *Puesta a punto de un método para la determinación de la viabilidad de microalgas en sistemas de tratamiento de agua residual*. Trabajo Final de Máster Ingeniería Ambiental. Universidad Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia.

Round, F. E. (1973). *The biology of the algae*. St Martins Pr.

Safi, C., Frances, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Pouzet, C., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P. (2015). *Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase*. Algal Research. Vol. 8, p. 61-68.

Sato, M., Murata, Y., Mizusawa, M., Iwahashi, H., Oka, S. (2004). *A simple and rapid dual fluorescence viability assay for microalgae*. Microbiol. Cult. Collect. Vol. 20, p. 53–59.

Tomaselli, L. (2004). *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology*. Edited by Amos Richmond. Chapter 1: the microalgal cell.

Voigt, J., Hinkelmann, B., Harris, E. H. (1997). *Production of cell wall polypeptides by different cell wall mutants of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii**. Microbiological Research. Vol. 152, p. 189-198.

Voigt, J., Stolarczyk, A., Zych, M., Malec, P., Burczyk, J. (2014). *The cell-wall glycoproteins of the green alga *Scenedesmus obliquus*. The predominant cell-wall polypeptide of *Scenedesmus obliquus* is related to the cell-wall glycoprotein gp3 of *Chlamydomonas reinhardtii**. Plant Science. Vol. 215-216, p. 39-47.

