



---

# Universidad de Valladolid

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

TÍTULO: DEPURACIÓN DE VINAZAS DIGERIDAS Y PURIFICACIÓN DE  
BIOGÁS MEDIANTE SISTEMAS DE ALGAS-BACTERIAS

AUTOR: JAVIER FERNÁNDEZ LORENZO

FECHA: JULIO 2014



**RAÚL MUÑOZ TORRE, profesor contratado doctor permanente, y ESTHER POSADAS OLMOS, estudiante de doctorado del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid, CERTIFICAN:**

Que **JAVIER FERNÁNDEZ LORENZO** ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Máster *Depuración de vinazas digeridas y purificación de biogás mediante sistemas de algas y bacterias*, con una duración de 3.5 meses (9 créditos).

Valladolid, 25 de julio de 2014

Reunido el Tribunal designado en Junta de Sección para la evaluación de Trabajos fin de máster, y después de atender a la defensa del trabajo “*Depuración de vinazas digeridas y purificación de biogás mediante sistemas de algas y bacterias*”, presentado por el alumno JAVIER FERNÁNDEZ, con una dedicación de 3.5 meses y realizado bajo la dirección del profesor contratado doctor permanente RAÚL MUÑOZ TORRE y la estudiante de doctorado ESTHER POSADAS OLMOS, del Depto. de Ingeniería Química, decidió otorgarle la calificación de \_\_\_\_\_.

Valladolid, 25 de julio de 2014

# ÍNDICE

RESUMEN .....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.1. AGUAS RESIDUALES AGROINDUSTRIALES.....	8
1.2. PURIFICACIÓN DE BIOGÁS.....	9
1.3. PRINCIPIO DE INTERACCIÓN: SISTEMAS MICROALGAS-BACTERIAS APLICADOS AL TRATAMIENTO SIMULTÁNEO DE AGUAS RESIDUALES Y PURIFICACIÓN DE BIOGÁS.....	9
1.4. REVALORIZACIÓN DE LA BIOMASA ALGAL.....	11
1.4.1 <i>Biocombustibles a partir de biomasa algal</i> .....	11
1.4.2 <i>Bioplásticos a partir de biomasa algal</i> .....	12
2. OBJETIVOS .....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
3.1 MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	15
3.2 AGUAS DIGERIDAS DE VINAZAS .....	15
3.3 EQUIPO EXPERIMENTAL.....	16
3.4 ETAPAS DE OPERACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS .....	18
3.5 CÁLCULOS REALIZADOS .....	19
3.6 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
4.1 ETAPA I: TRATAMIENTO DE LA VINAZA .....	21
4.2 ETAPA II: TRATAMIENTO DE LA VINAZA Y DEL BIOGÁS .....	25
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA EN LAS ETAPAS I Y II .....	26
5. CONCLUSIONES .....	28
6. ANEXO I.....	30
7. BIBLIOGRAFÍA .....	31

## RESUMEN

La intensa producción mundial de la industria agroalimentaria genera una gran cantidad de aguas residuales, las cuales se caracterizan por una elevada concentración de nutrientes y materia orgánica. Específicamente, las aguas procedentes de la fermentación de las melazas de la industria azucarera (vinazas) son unas de las más contaminantes. En este contexto, los sistemas de lagunaje algas-bacterias se han perfilado como una de las mejores técnicas para la eliminación de estos nutrientes, permitiendo además la purificación simultánea de biogás y un aprovechamiento de la biomasa algal generada.

En el presente trabajo se estudió la aplicación de un fotobiorreactor de lagunaje de algas y bacterias (high rate algal pond, HRAP) de 180 L interconectado a una columna externa de absorción de CO<sub>2</sub> de 2.5 L desde Marzo de 2014 hasta Junio de 2014 (73 días), para evaluar de manera simultánea la eliminación de nutrientes en vinazas, la purificación de biogás y la caracterización de la biomasa algal para obtener productos de valor añadido.

La vinaza con la que se trabajó se diluyó 10 veces con agua del grifo y se alimentó continuamente al sistema con un tiempo de retención hidráulico de 7 días. El trabajo se desarrolló en dos etapas diferentes, centrándose la primera exclusivamente en la depuración de las vinazas, mientras que en la segunda se estudió la depuración de las vinazas en el fotobiorreactor conectado a la columna de absorción de biogás sintético (30% de CO<sub>2</sub>) alimentada con un flujo de biogás de 5 mL/min y una recirculación de líquido desde el HRAP de 125 L/d.

Los resultados mostraron un déficit de carbono en la vinaza tratada inicialmente. De esta manera, sólo cuando se conectó la columna de absorción se tuvo una eliminación efectiva de nutrientes (37±7% de NT y 39.0±3.3% de P) y se produjo un aumento de concentración de sólidos suspendidos totales en el HRAP desde 0.18 g/L hasta 0.56 g/L (en parte debido también a las mayores tasas de evaporación). La alta tasa de oxigenación en el sistema conllevó una nitrificación rápida del N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> alimentado, siendo su eliminación superior al 94%, sin tener influencia el mayor aporte de carbono inorgánico en la etapa II: La eliminación de carbono sí que fue efectiva independientemente de la etapa estudiada, eliminándose toda la fracción biodegradable de carbono orgánico (máximo de 45±11% en la segunda etapa), y con eliminaciones

máximas de carbono inorgánico del  $70.5\pm 0.5$  % en la primera etapa de estudio. La eliminación de  $\text{CO}_2$  del biogás sintético alimentado fue del  $99.1\pm 0.2\%$ .

La recogida de la biomasa en el sedimentador instalado tras el HRAP fue efectiva ( $\geq 94\%$ ). Esta biomasa se caracterizó por tener altos contenidos de hidratos de carbono ( $81.8\pm 1.3$  y  $74.8\pm 3.5\%$  en las etapas I y II, respectivamente), lo que sugiere una efectiva producción de bioetanol a partir de la misma tras la extracción e hidrólisis de azúcares y su posterior fermentación, permitiendo de esta manera el concepto de biorefinería como una realidad emergente.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Aguas residuales agroindustriales

La intensa demanda mundial de alimentos, como consecuencia del considerable aumento de población durante el último siglo, ha conllevado una generación exponencial de aguas residuales en el sector de la agroindustria (Flores-Alsina y col., 2010). Las aguas residuales agroindustriales se caracterizan por sus altas concentraciones de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, y por un pH variable, además de ser específicas de cada agroindustria y dependientes de las campañas de producción de la materia prima procesada en cada una de ellas (Posadas y col., 2014a).

De manera específica, las melazas constituyen el principal residuo líquido de la industria azucarera. Estas aguas se caracterizan por contener un 54% de azúcares, los cuales pueden ser usados por levaduras del género *Candida*, siendo por ello reutilizadas en la producción de levaduras (Nigam y Vogel, 1991). Las aguas residuales procedentes de la fermentación de las melazas por parte de las levaduras se denominan vinazas, las cuales se caracterizan por altas concentraciones de potasio, calcio, clorito, iones sulfato y sólidos suspendidos, y por una alta demanda química de oxígeno (DQO) (De 15 a 176 g O<sub>2</sub>/L) (Coca y col., 2014; Ryznar-Luty y col., 2008).

El vertido en cauces naturales, tanto de las aguas residuales agroindustriales de manera general como de las vinazas específicamente, provoca la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas, eutrofización de ríos y lagos, y desequilibrios en los ecosistemas, entre otros problemas medioambientales (Drogui y col., 2008). Esta problemática, junto con las leyes más estrictas para límites de vertido a cauces naturales de las aguas tratadas en las agroindustrias, hacen necesario el desarrollo y aplicación de sistemas de tratamiento de aguas residuales efectivos y económicamente sostenibles para estas industrias (Posadas y col., 2014a).

Los sistemas tradicionales de tratamiento de aguas residuales presentan desventajas como los altos costes de aireación en sistemas de fangos activos (González y col., 2008; Bhatnagar y Sillanpää, 2010) y la baja eliminación de nutrientes en tratamientos anaerobios (Rovirosa y col., 1995; Wilkie y Mulbry, 2002). Esta situación conlleva la necesidad de desarrollar nuevos procesos de tratamiento de aguas residuales para obtener un efluente más depurado con menores costes económicos e impactos ambientales.



En este contexto, los sistemas microalgas-bacterias pueden solucionar las desventajas de las tecnologías tradicionales, de manera que reducen los altos costes de aporte de oxígeno gracias a la fotosíntesis y aumentan la eliminación de nutrientes debido a su asimilación como biomasa algal-bacteriana en un proceso simple y económico (De Godos y col., 2009).

### **1.2 Purificación de biogás**

El biogás es una mezcla de gases producidos por comunidades microbianas hidrolíticas y metanogénicas que degradan la materia orgánica en condiciones anaerobias (ausencia  $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ). La composición del biogás es variable y depende del estado de oxidación del sustrato (BSP, 2009; Karki y col., 2009), siendo los principales componentes  $CH_4$  (50-70%),  $CO_2$  (30-40%),  $N_2$  (1-2%),  $H_2O$  (0.3%) y  $H_2S$  (trazas; 0-2% vol.). El biogás se puede utilizar como sustituto de los combustibles fósiles debido a que constituye una fuente de energía sostenible, pudiendo ser usado sin degradar el medio ambiente (Bahr y col., 2014). Sin embargo, para poder utilizar el potencial del  $CH_4$  contenido en el biogás es necesaria su purificación previa (Anexo 1). De esta manera, una disminución de  $CO_2$  en la corriente de biogás resultaría en menores costes de transporte y en un incremento en el contenido energético del mismo (Bahr y col., 2014). Por otro lado, la eliminación de  $H_2S$  es necesaria debido a que es un gas muy corrosivo, tóxico y maloliente (Fortuny y col., 2008).

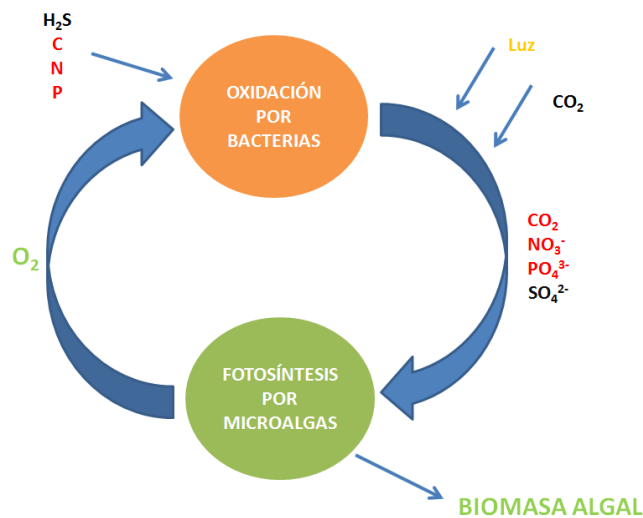
Las técnicas físico-químicas, como separación por membranas o absorción química, pueden aplicarse para eliminar simultáneamente el  $CO_2$  y  $H_2S$  de la corriente de biogás, pero presentan altos costes de operación (Tippayawong y Thanompongchart, 2012). Por otro lado, no se han desarrollado tecnologías biológicas para la eliminación simultánea de estos componentes del biogás. De esta manera, la tecnología simbiótica algas-bacterias se propone como una alternativa de eliminación simultánea del  $CO_2$  y  $H_2S$  del biogás, con bajo coste energético e impacto ambiental (Bahr y col., 2014).

### **1.3 Principio de interacción: sistemas microalgas-bacterias aplicados al tratamiento simultáneo de aguas residuales y purificación de biogás**

La interacción simbiótica microalgas-bacterias aplicada al tratamiento de aguas residuales y purificación de biogás se caracteriza por la oxidación bacteriana del carbono orgánico y nitrógeno (principalmente  $N-NH_4^+$ ) contenido en los efluentes de agua residual, y por la oxidación del  $H_2S$  del biogás. A su vez, estos productos de

oxidación ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ , respectivamente), junto con el  $\text{P-PO}_4^{3-}$  presente inicialmente en las aguas residuales y el  $\text{CO}_2$  transferido desde la fase biogás a la líquida (agua residual), son asimilados en forma de biomasa por las microalgas durante la fotosíntesis produciendo, a su vez, el oxígeno necesario para que las bacterias lleven a cabo las oxidaciones arriba mencionadas (Fig.1)(Muñoz y Guieysse, 2006; Bahr y col., 2014).

La purificación de biogás en sistemas de algas y bacterias se ve beneficiada a altos pHs (usando bacterias alcalófilas oxidantes del sulfuro y microalgas basófilas), ya que se aumenta el transporte másico de  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{CO}_2$  (gases ácidos) desde el biogás al caldo de cultivo (González-Sánchez y Revah, 2007; González-Sánchez y col., 2008). Por otro lado, el aporte extra de carbono inorgánico del biogás en estas aguas residuales previamente digeridas supone una ventaja para su tratamiento, ya que aporta el déficit de carbono previamente reportado para su depuración mediante sistemas de algas-bacterias (Posadas y col., 2014a). Así, el ratio óptimo C/N/P del agua residual en base a la composición molecular de las microalgas es 100/18/2 (g/g/g) (Oswald, 1988).



**Figura 1.** Interacción simbiótica microalgas-bacterias para la purificación de biogás y tratamiento de aguas residuales simultáneamente; Negro: Purificación de biogás/ Rojo: Tratamiento de aguas residuales/ Verde: Productos de la fotosíntesis.

Las primeras aplicaciones de la tecnología de microalgas y bacterias nacieron a mediados de 1950 en California para el tratamiento de aguas residuales domésticas en los llamados “High rate algal ponds” (HRAPs) (Posadas y col., 2013), los cuales son estanques abiertos poco profundos, con una paleta giratoria mezcladora (Sutherland, 2014).

#### **1.4 Revalorización de la biomasa algal**

La biomasa producida en el tratamiento simultáneo de las aguas residuales y en la purificación del biogás tiene múltiples aplicaciones, pudiéndose utilizar como biocombustible, para producción de bioplásticos o como biofertilizante (Chisti, 2007).

##### **1.4.1 Biocombustibles a partir de biomasa algal**

Los principales biocombustibles que se pueden obtener a partir de la biomasa algal son biodiesel, bioetanol, biogás y biohidrógeno (Chisti, 2007).

###### ***a) Obtención de biodiesel a partir de microalgas***

El cultivo de microalgas como materia prima alternativa para producción de biodiesel ha cobrado importancia en los últimos años debido a la alta tasa de crecimiento de las microalgas en comparación con plantas superiores y a su habilidad para acumular altas cantidades de lípidos (Chisti, 2007; Hossain y col., 2008; Sheehan y col., 1998). Además, las microalgas no suponen una competición por los terrenos cultivables como la producción de biodiesel de primera y segunda generación (Singh y Gu, 2010; Nautiyal y col., 2014).

La cantidad de lípidos en microalgas oscila entre 5 y 80%, aunque la fracción aprovechable para producción de biodiesel lo constituyen los triacilglicéridos (TAGs) (Chisti, 2007; Hu y col., 2008) que tienen una composición de ácidos grasos similar a los aceites vegetales (Haik y col., 2011).

Debido a la alta influencia del medio ambiente en HRAPs y del alto riesgo de contaminación en fotobiorreactores abiertos, la selección de una microalga con alto contenido en lípidos no asegura su crecimiento a largo plazo en aguas residuales debido a la colonización del cultivo por especies mejor adaptadas al medio (De Godos y col., 2009). Por ello, es necesario seguir diferentes estrategias de cultivo para aumentar el

contenido en lípidos de las microalgas, siendo el estrés por nutrientes (principalmente nitrógeno) la técnica más efectiva (Tabatabaei y col., 2011). De esta manera, bajo condiciones de falta de nutrientes, las microalgas pueden acumular lípidos haciendo uso del CO<sub>2</sub> disponible y de la energía solar (Xin y col., 2010).

#### ***b) Obtención de bioetanol a partir de microalgas***

El alto contenido de carbohidratos de las paredes celulares de holocelulosa y el citoplasma de almidón, han hecho de la biomasa algal una materia prima muy adecuada para la producción de bioetanol (Harun y col., 2014). El contenido total de hidratos de carbono en las microalgas oscila entre el 8 y 60% (Cea-Barcia y col., 2014). Estrategias de cultivo, como limitación de nutrientes (sulfuro, nitrógeno y fosfato), han sido empleadas para aumentar la acumulación de carbohidratos en las microalgas, obligándolas a transformar proteínas o péptidos en hidratos de carbono (Dragone y col., 2001; Harun y Danquah, 2011).

La producción de bioetanol a partir de microalgas se ha estudiado en diferentes géneros de microalgas: *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*; *Nannochloropsis* y *Spirulina*. La principal problemática para la producción de bioetanol a partir de estas microalgas es la liberación de azúcares fermentables, para lo que se han desarrollado diferentes pretratamientos (Hirano y col., 1997; Choi y col., 2010). Uno de los más usados es el pretratamiento químico extremadamente ácido (ELA) (Lee y col., 2013), en el cual se destruye la pared celular del alga (rompiendo los enlaces de hidrógeno intra e inter-moleculares), mientras que una dilución adicional del ácido libera los carbohidratos al hidrolizado líquido (Zhou y col., 2011).

#### **1.4.2 Bioplásticos a partir de biomasa algal**

Los plásticos obtenidos a partir del petróleo son los más usados debido a su bajo coste, peso, a su alta resistencia y a su capacidad para proporcionar aislamiento eléctrico y térmico. Sin embargo, las mismas propiedades que hacen a los plásticos convencionales atractivos para aplicaciones comerciales, también añaden costes medioambientales, impidiendo su biodegradación e incrementando la demanda y el tamaño de vertederos para gestionarlos (Zeller y col., 2013). Por tanto, actualmente se está desarrollando la producción de bioplásticos biodegradables, habiendo sido identificadas las microalgas como biomasa alternativa para la producción de éstos (Becker, 2007; Balaji y col., 2013).

Las microalgas tienen el potencial de producir biopolímeros como los polihidroxitiratos (PHBs) usando  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono. El PHB se diferencia de los plásticos del petróleo en su biodegradabilidad, que bajo condiciones aerobias origina  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , mientras que en condiciones anaerobias produce  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ . La producción de estos biopolímeros en microalgas puede ser incrementada mediante estrategias de cultivo en limitación de nutrientes (Balaji y col., 2013).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal del presente proyecto consistió en optimizar y comparar el tratamiento de vinazas digeridas y diluidas en un fotobiorreactor tipo lagunaje (HRAP) de algas y bacterias de 180 L sin y con purificación simultánea de biogás (con una unidad de absorción de biogás anexada al fotobiorreactor). Paralelamente, se caracterizó la composición de lípidos, proteínas, hidratos de carbono, cenizas y PHBs en la biomasa recogida con el objetivo de determinar sus posibles aplicaciones.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

El reactor fue inoculado el 31 de marzo de 2014 con 10 L de microalgas previamente aclimatadas al agua residual alimentada (0.56 g Sólidos Suspendidos Totales (SST)/L) y con 2 L de fango activo aerobio secundario (6.18g SST/L) procedente de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) de Valladolid (con una configuración de desnitrificación-nitrificación). La concentración inicial de sólidos suspendidos totales en el reactor bajo estas condiciones fue 0.08 g SST/L.

*Chlorella vulgaris* fue la especie originalmente adaptada a las aguas a tratar (vinazas). La adaptación de esta microalga se realizó diluyendo las vinazas con agua del grifo 10 veces en erlenmeyers de 250 mL, los cuales estuvieron continuamente iluminados (100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) y agitados a 200 r.p.m.

#### 3.2 Aguas digeridas de vinazas

El fotobiorreactor fue alimentado con aguas de vinaza procedentes de una agroindustria en la provincia de Valladolid (España) (Tabla 1), las cuales habían sido digeridas de manera anaerobia previamente.

**Tabla 1.** Caracterización de las vinazas brutas utilizadas en la experimentación.

COT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	SST (mg/L)	Ph
1267 ± 121	1282 ± 37	612 ± 115	423 ± 51	20 ± 8	160 ± 37	7.8 ± 0.1

COT: carbono orgánico total; CI: carbono inorgánico; NT: nitrógeno total; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Amonio; P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>: Fosfatos. SST: sólidos suspendidos totales

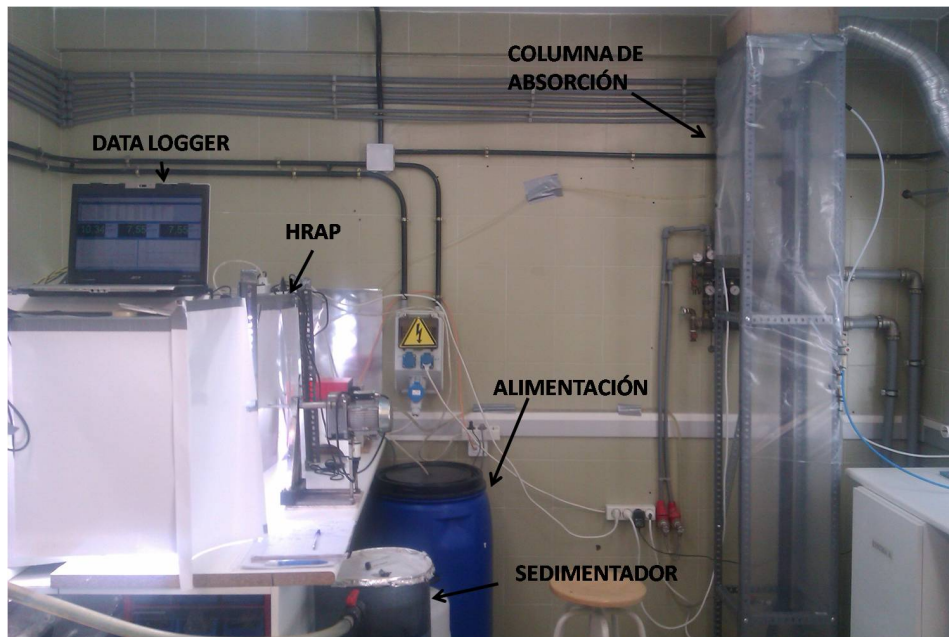
Con el objetivo de encontrar la dilución más adecuada de las vinazas para alimentar el fotobiorreactor y evitar la inhibición de las microalgas por altas concentraciones de amonio (González y col., 2008), se realizaron test de biodegradabilidad según Posadas y col., 2014a. Estos ensayos se llevaron a cabo con agua residual de vinaza digerida diluida con agua del grifo 10%, 30% y 50%, respectivamente, y sin diluir en botellas de 1250 mL (cámara de aire de 250 mL y volumen total líquido de 1 L). En los test de control (realizados a 30% de dilución) se añadió cobre (200 mg/L de CuCl<sub>2</sub>) para inhibir la actividad biológica y comprobar que la degradación de contaminantes en el resto de ensayos fue causa de la actividad de los microorganismos. Todos los tests se cultivaron en duplicado bajo un régimen de iluminación de 16:8 h:h luz/oscuridad a 325±28

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (Posadas y col., 2014a). Cada batch fue inoculado con 5.25 mL de fango activado y 47.25 mL de microalgas, lo que resultó en concentraciones iniciales de 0.03g Sólidos Suspendedos Volátiles (SSV)/L y 0.05 gSSV/L, respectivamente. Las botellas fueron purgadas con helio, cerradas con tapones de goma de butilo y selladas con cápsulas de plástico para asegurar que la biodegradación se llevaba a cabo exclusivamente gracias a la oxigenación fotosintética (Posadas y col., 2014a). Los resultados finales mostraron una biodegradabilidad máxima de aproximadamente 20%, 91% y 72% para el carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico (CI) y nitrógeno total (NT), respectivamente, en los test diluidos al 10%, alcanzándose pHs de 11.25 (que conllevó inhibición de la actividad biológica). Por lo tanto, en función de estos resultados, la dilución óptima (con agua del grifo) con la que se alimentó el reactor fue del 10% (1:10). De esta manera, se limitó el suministro de nutrientes en el HRAP (con el objetivo último de favorecer la acumulación de lípidos en las microalgas) y se evitó la inhibición de las microalgas por concentraciones elevadas de  $\text{N-NH}_4^+$  (González y col., 2008).

### **3.3 Equipo experimental**

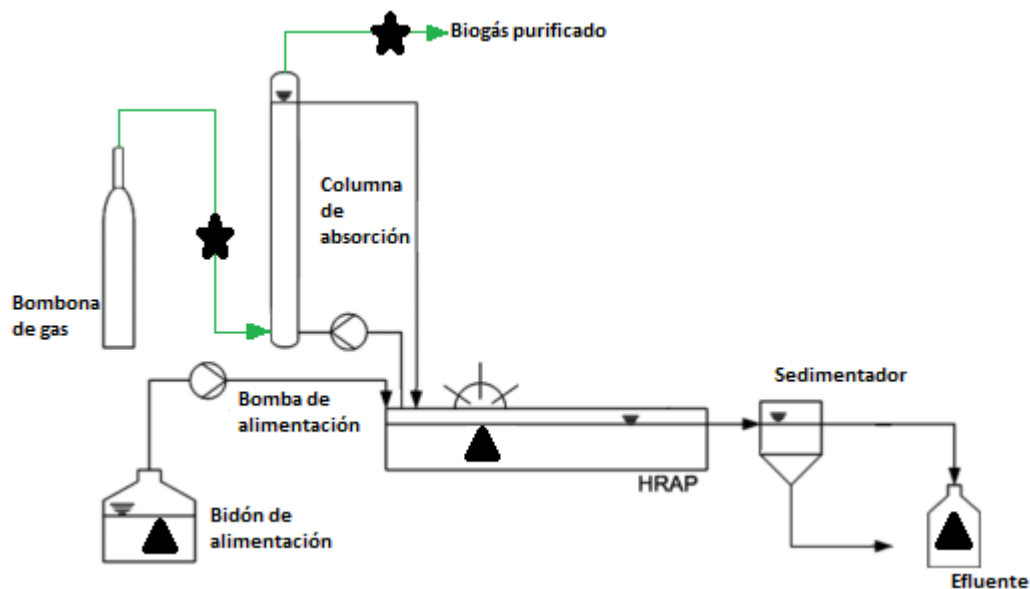
El dispositivo experimental consistió en un HRAP de 180 litros de capacidad, 15 cm. de profundidad y  $1.33 \text{ m}^2$  de superficie iluminada, con dos canales de circulación de líquidos divididos por una pared central, y conectado a una columna de absorción de  $\text{CO}_2$  de 2.5 L ( $\text{Ø} = 4 \text{ cm}$ ; altura = 195 cm), la cual estaba provista de un difusor metálico localizado en su base (Figs. 2 y 3.). El sistema fue operado en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Ambiental de la Universidad de Valladolid. (España) durante 73 días.





**Figura 2.** Sistema experimental.

El fotobiorreactor fue continuamente agitado usando una paleta de 6 palas a 10.5 rpm e iluminado durante 16 horas al día (16:8 h, luz:oscuridad) con una intensidad media de  $190 \pm 47 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , usando un total de 33 bombillas de 20 W DUOLEC E27 y doce tubos fluorescentes de 30 W PHILLIPS TL-D. La clarificación del efluente se llevó a cabo en un sedimentador troncocónico de 8 litros localizado a la salida del HRAP.



**Figura 3.** Esquema de proceso. Línea negra: Fase líquida. Línea verde: Fase gas. Triángulos: Muestreo fase líquida. Estrellas: Muestreo fase gas.

### 3.4 Etapas de operación y toma de muestras

Se diferenciaron dos estados estacionarios durante la experimentación. En el primer estado, la columna de depuración de gas no se conectó al HRAP, por lo que el proceso se centró únicamente en el tratamiento de las vinazas mediante algas-bacterias. En el segundo estado se introdujo el biogás sintético, compuesto de CO<sub>2</sub> (30%) y N<sub>2</sub> (70%) (Abello Linde, España). Este fue burbujeado desde la base de la columna de absorción externa con un flujo de 7.2 L/d en co-corriente con una recirculación de líquido de 125 L/d proveniente del HRAP (bomba de recirculación Master Flex modelo 7518-00). El tiempo de retención hidráulico (TRH) en el HRAP se mantuvo constante en un valor típico de 7 días durante todo el período de experimentación. La primera etapa se realizó hasta el día 35 de operación y hasta el día 73 tuvo lugar la segunda etapa.

Se tomaron muestras líquidas de 300 mL dos veces a la semana de la alimentación (influyente), de la salida (efluente) y del medio de cultivo del HRAP para analizar las concentraciones de COT, CI, NT, amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SST, SSV y pH. Las muestras para el análisis de COT, CI, NT, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> fueron filtradas a través de filtros de nylon de 0.20 μm para analizar la fase soluble.

La temperatura ambiente, la del medio de cultivo y la concentración de oxígeno disuelto (OD) en el reactor fueron medidas online. La intensidad de luz en la superficie del HRAP se midió semanalmente. La biomasa fue recogida en el sedimentador dos veces por semana. El análisis de sedimentabilidad de la biomasa se llevó a cabo con la biomasa del caldo de cultivo una vez alcanzado el estado estacionario en cada período.

El análisis del biogás se realizó tomando muestras de 100 μL dos veces a la semana a la entrada y salida de la columna de absorción. El flujo de entrada de biogás fue controlado y medido mediante el uso de un controlador de flujo másico (Mass Flow Controller GFC, Aalborg), mientras que el flujo de salida se midió a partir del volumen de agua desplazado en una probeta de 2 L transcurrido un tiempo t.

### 3.5 Cálculos realizados

Las eficiencias de eliminación ( $\eta_E$ ) del CO<sub>2</sub> del biogás sintético burbujeado fueron calculadas a partir de la siguiente ecuación (1):

$$\eta_{E1} = \frac{C_{CO_2,ENT} \cdot F_{ENT} - C_{CO_2,SAL} \cdot F_{SAL}}{C_{CO_2,ENT} \cdot F_{ENT}} \cdot 100(1)$$

Donde  $C_{CO_2,ENT}$  y  $C_{CO_2,SAL}$  representan la composición de CO<sub>2</sub> en mg/ml en la entrada y la salida de la columna de absorción, mientras que  $F_{ent}$  y  $F_{sal}$  corresponden al caudal de entrada y de salida de la columna expresado en mL/min.

La eficiencia de eliminación de carbono total (CT) fue calculada de acuerdo con la ecuación (2):

$$\eta_C = \frac{(C_{ENT} \cdot Q_{ENT} + C_{CO_2,ENT} \cdot F_{ENT}) - (C_{SAL} \cdot Q_{SAL} + C_{CO_2,SAL} \cdot F_{SAL})}{(C_{ENT} \cdot Q_{ENT} + C_{CO_2,ENT} \cdot F_{ENT})} \cdot 100(2)$$

Donde  $C_{ENT}$  y  $C_{SAL}$  son las concentraciones de carbono disuelto total (COT + CI) en la entrada y la salida del HRAP (mg/L), respectivamente, y  $Q_{ENT}$  y  $Q_{SAL}$  corresponden a los flujos de entrada y salida del HRAP (L/d). En ésta ecuación las concentraciones de CO<sub>2</sub> a la entrada y a la salida de la columna se expresan en mg/L.

Las eliminaciones de carbono (COT y CI), nitrógeno (NT) y fósforo (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) fueron cuantificadas mediante la ecuación (3):

$$\eta_{E2} = \frac{C_{i,ENT} \cdot Q_{ENT} - C_{i,SAL} \cdot Q_{SAL}}{C_{i,ENT} \cdot Q_{ENT}} \cdot 100(3)$$

Donde  $C_{i,ent}$  y  $C_{i,sal}$  representan las concentraciones del parámetro  $i$ , (COT, CI, NT y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) en la entrada y en la salida expresadas en mg/L, y  $Q_{ent}$  y  $Q_{sal}$  son los caudales de agua residual de entrada y salida del HRAP expresados en L/d.

La eficiencia de eliminación de sólidos en el sedimentador se calculó mediante la ecuación (4):

$$\eta_{Sed} = \frac{SST_{HRAP} - SST_{efluente}}{SST_{HRAP}} \cdot 100(4)$$

Donde  $SST_{HRAP}$  y  $SST_{efluente}$  corresponden a las concentraciones de sólidos suspendidos totales (g SST/L) en el HRAP y el efluente, respectivamente.

La producción de biomasa (W) se cuantificó de acuerdo a la ecuación (5):

$$W = \frac{SST_{HRAP} \cdot Q_{sal}}{S} (5)$$

Donde W representa la biomasa producida total ( $\text{g/m}^2_{\text{superficie de reactor}} \text{d}^{-1}$ ) y S la superficie total del HRAP ( $1.33 \text{ m}^2$ ).

### 3.6 Procedimiento analítico

Las concentraciones de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  y  $\text{O}_2$  se analizaron mediante un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 (Palo Alto, USA) que lleva acoplado un detector de conductividad térmica y está equipado con dos columnas (CP-Molsieve 5A y CP-Pora BOND).

Las concentraciones de COT, CI y NT fueron determinadas mediante el uso de un analizador Shimadzu TOC-VCSH (Japón), equipado con un módulo de quimioluminiscencia TNM-1.  $\text{N-NH}_4^+$  se midió usando un electrodo de amonio Orion Dual Star (Thermo Scientific, Países Bajos). Los aniones  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NO}_2^-$  fueron analizados via HPLC-IC con una bomba de HPLC Waters 515, acoplada a un detector de conductividad (Waters 432) operado de una columna IC-PAK HC precedida de una precolumna IC-PAK Guard-Pak (Waters, USA). El fósforo soluble ( $\text{P-PO}_4^{3-}$ ) fue analizado por el método colorimétrico con adición de molibdeno vanadato en el espectrofotómetro U-200 (Hitachi, Japón) a una longitud de onda de 400 nm. Todos los análisis fueron llevados a cabo de acuerdo a métodos estándar (APHA, 2005).

El pH y el oxígeno disuelto (OD) fueron monitorizados online mediante una consola multiparamétrica Consort C3041 con almacenamiento de datos cada treinta minutos. La radiación fotosintética activa (PAR) se determinó con el medidor LI-250A (LI-COR Biosciences, Alemania).

La biomasa recogida en el sedimentador se centrifugó y se secó durante 24 horas a  $105^\circ\text{C}$  en un horno de laboratorio P-Selecta (SELECTA, España). El contenido en PHBs de la biomasa se analizó según Zúñiga y col., (2011), mientras que los lípidos se analizaron según Kochert (1978), las proteínas por el método de Lowry y col., (1955) modificado por Herbert y col., (1971) y los hidratos de carbono por el método de Dubois (Toledo-Cervantes y col., 2013).

La sedimentabilidad de la biomasa fue determinada usando dos conos Imhoff de 1L midiendo el volumen de biomasa sedimentada al cabo de 5, 10, 15, 20, 30 y 60 minutos (Park y col., 2011) respecto al volumen total con el fin de determinar el índice volumétrico de lodo (IVL).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de las dos etapas de operación, el oxígeno disuelto, las pérdidas por evaporación y la temperatura variaron ligeramente (Tabla 2), lo que pudo ser influenciado por el aumento de la temperatura externa. Sin embargo, el pH en el sistema se mantuvo bastante constante en ambas etapas, a pesar de adicionar CO<sub>2</sub> en la etapa II, como consecuencia de la alta capacidad buffer del agua residual (incluso a pesar de estar diluida 10 veces en la alimentación) (Tabla 1).

El O<sub>2</sub> del HRAP fue consumido en la oxidación de la materia orgánica y en la nitrificación, tanto en los períodos de luz como de oscuridad, mientras que su producción tuvo lugar en el período iluminado como consecuencia de la actividad fotosintética. De esta manera, y a pesar de registrarse variaciones en la concentración de OD entre el día y la noche, estas concentraciones siempre fueron superiores a 2 mg O<sub>2</sub>/L (8.5-12.1 mg O<sub>2</sub>/L), lo que implica que en ningún caso el O<sub>2</sub> limitó la oxidación de materia orgánica o la nitrificación en el HRAP (Metcalf y Eddy, 2003). Por otro lado, la evaporación en el fotobiorreactor (4.4-10.8 L/m<sup>2</sup>/d) en ambos periodos, fue similar y comparable a los valores registrados en sistemas al aire libre (2-7 L/m<sup>2</sup>/d), dependiendo de la zona geográfica y época del año; Guieysse y col., (2013) debido a la alta turbulencia en nuestro diseño como consecuencia del sobredimensionamiento del motor para agitar el medio de cultivo (Mendoza y col., 2013). Esta alta turbulencia también contribuyó a mantener los niveles de OD por encima de 2 mg O<sub>2</sub>/L, incluso en períodos de oscuridad. Finalmente, la temperatura y el pH en el medio de cultivo fueron adecuados para el desarrollo de la actividad biológica en el sistema tanto durante fotosíntesis (día) como durante la noche (pH ≈8; temperatura:20-25 °C) (Park y Craggs, 2010; Mata y col., 2010).

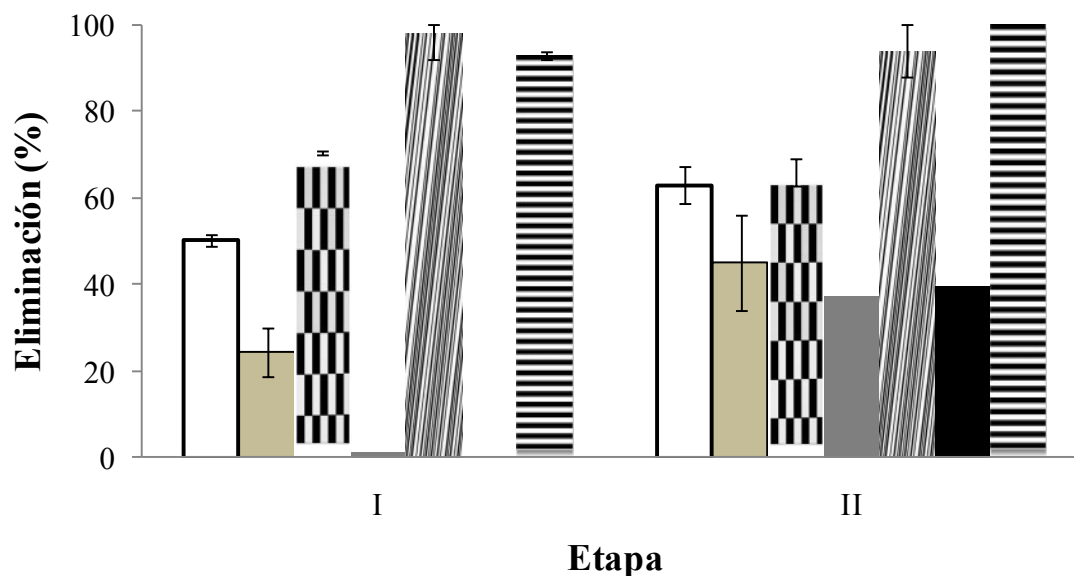
**Tabla 2.** Concentración media de oxígeno disuelto, evaporación, temperatura y pH en el fotobiorreactor durante las dos etapas de operación.

<b>Etapa</b>	<b>OD (mg O<sub>2</sub>/L)</b>	<b>Evaporación (L/m<sup>2</sup>/d)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>
<b>I</b>	9.2 ± 1.7	5.2 ± 0.8	24.1 ± 1.6	7.84 ± 0.09
<b>II</b>	9.7 ± 3.4	6.7 ± 3.1	25.0 ± 1.8	7.91 ± 0.17

##### 4.1 Etapa I: tratamiento de la vinaza

La eliminación de COT y CI en la primera etapa fue de 24.3±5.5% y 70.5±0.5%, respectivamente, siendo la eliminación de CT de 50.3±1.5% (Fig. 4). Las pruebas de

biodegradabilidad realizadas previamente según Posadas y col., (2014a), mostraron un máximo de eliminación de COT y CI de 20% y 90%, respectivamente. En estas condiciones, la eliminación de carbono en el sistema fue cercana a los valores máximos posibles. Es importante destacar que la baja biodegradabilidad de COT fue consecuencia del tratamiento previo de las vinazas, ya que anteriormente de manera anaerobia se eliminó un 60% de toda la cantidad de COT de la vinaza bruta inicial.



**Figura 4.** Porcentajes de eliminación en las etapas I y II: □ CT, ■ COT, ▨ CI, ■ NT, ▨ N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ■ P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y ≡ SST.

En base a las eliminaciones de la etapa I, las concentraciones de salida para COT y CI fueron  $126.7 \pm 7.8$  mg C/L y  $62.9 \pm 5.3$  mg C/L, respectivamente (Tabla 3). Sin considerar pérdidas por evaporación, estas concentraciones hubieran sido  $87.2 \pm 7.8$  mg/L y  $41.4 \pm 4.1$  mg/L para COT y CI, respectivamente. Así, y a pesar de que las pérdidas por evaporación permitieron el control de la temperatura en el HRAP (Christenson y Sims, 2011), la alta huella hídrica de esta experimentación conllevó un aumento en las concentraciones de los diferentes parámetros analizados en el efluente a lo largo de las dos etapas de operación, lo que pone en peligro la sostenibilidad de esta biotecnología (Posadas y col., 2013).

A pesar de las elevadas eliminaciones de COT y de CI, la eliminación de NT en la etapa 1 fue prácticamente despreciable ( $\approx 1\%$ ) (Fig. 4). Todo el nitrógeno total presente en la vinaza de alimentación ( $NT = NH_4^+ + NO_2^- + NO_3^- + N_{org}$ ) correspondió a N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, del cual la mayor parte se nitrificó ( $77.2 \pm 8.8\%$ ), detectándose un aumento de

concentraciones de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la salida (60.5±2.5 mg/L) (Tabla 3). La alta oxidación de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, junto con los bajos pHs respecto al pKa de equilibrio del N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-NH<sub>3</sub>; pKa= 9.25), implicó que el amonio no fuera eliminado por stripping (Cai y col., 2013), siendo su eliminación total del 98.0±2.0% (principalmente por nitrificación).

Por otro lado, la eliminación de P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> también fue nula en esta primera etapa, lo que conllevó concentraciones de 2.44 mg P/L en el efluente.

**Tabla 3.** Caracterización de la vinaza en la salida.

Etapa	COT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	SST (g/L)
I	126.7 ± 7.8	62.9 ± 5.3	104.9 ± 16.2	1.2 ± 1.1	60.5 ± 2.5	2.44 ± 0.58	0.012 ± 0.002
II	88.3 ± 0.9	65.0 ± 0.7	56.3 ± 0.3	2.6 ± 4.4	46.1 ± 2.4	1.62±0.61	0.024 ± 0.042

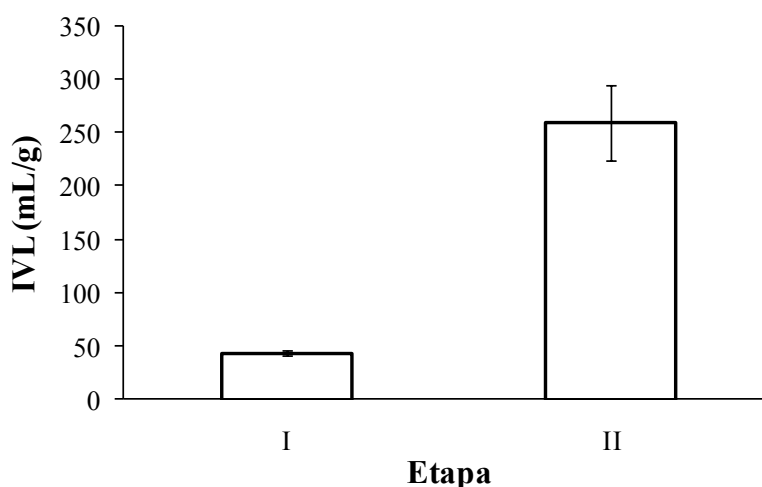
Debido a la baja eliminación de nutrientes en comparación con la eliminación de CT, se estimó la concentración de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo considerando el pH ( $\text{CO}_{2(l)} + \text{H}_2\text{O}_{(l)} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$ ; pKa<sub>1</sub> ( $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$ ) = 6.35; pKa<sub>2</sub> ( $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$ ) = 10.33) y la concentración de IC en el medio. Así, esta concentración estimada de CO<sub>2</sub> fue superior (2.2±0.7 mg/L) a la concentración de equilibrio del CO<sub>2</sub> con la atmósfera (0.39 mg/L) a partir del día 10 de operación. En estas condiciones, tuvo lugar eliminación de carbono por stripping, lo que pudo conllevar limitación de carbono en el tratamiento del agua residual y, por tanto, baja eliminación de nutrientes (Posadas y col., 2013). Por otro lado, y en función de la relación C/N/P óptima según la composición de la biomasa algal (100/18/2) (Oswald, 1988), el ratio 100/26/0.7 de las vinazas brutas podría indicar también una posible limitación de C para el tratamiento biológico de estas aguas residuales. Con el objetivo de confirmar la limitación de CI en el medio de cultivo en esta primera etapa, se colocó caldo de cultivo con diferentes concentraciones de bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) y di-hidrógeno fosfato potásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en ocho matraces aforados de 200 mL agitados a 200 r.p.m., con iluminación constante (325±28 μmol/m<sup>2</sup>/s) (Tabla 4). La razón por la que también se realizaron los ensayos con adición de fósforo fue debido a que las bajas concentraciones de P en la entrada (≈ 1 mg/L) y el alto ratio C/ P podrían indicar también una posible limitación de este nutriente para el tratamiento de las vinazas. Sólo en estado estacionario (con concentraciones medias de salida de 2.44 ± 0.58 mg P/L) se comprobó también que el P no era el elemento limitante.

**Tabla 4.** Concentración añadida sobre el blanco (medio cultivo) para corroborar la limitación por carbono inorgánico en la etapa 1.

	CI (g/L)	P (g/L)
<b>Blanco A</b>	0	0
<b>Blanco B</b>	0	0
<b>A1</b>	0.37±0.05	0
<b>A2</b>	0.37±0.05	0
<b>B1</b>	0	0.25±0.05
<b>B2</b>	0	0.25±0.05
<b>C1</b>	0.37±0.05	0.25±0.05
<b>C2</b>	0.37±0.05	0.25±0.05

Tras 7 días de cultivo, se analizó el peso seco de la materia orgánica suspendida (SSV), siendo mayor la concentración de sólidos en los erlenmeyer en los que se adicionó únicamente CI (0.37±0.05 g/L) en vez de P (0.25±0.05 g/L). De esta manera, se comprobó la limitación de carbono en esta primera etapa.

La concentración media de SST en el reactor en la etapa I fue de 0.18±0.01 g SST/L, con una eficacia de eliminación de sólidos en el sedimentador del 93.3±0.9% (Fig. 4) y una productividad de biomasa de 2.4±0.3 g/m<sup>2</sup>/d. El índice volumétrico de fangos que informa sobre la sedimentabilidad y compactación de la biomasa fue 44±2 mL/g, lo que indicó buenas condiciones de sedimentabilidad al ser menor de 100 mL/g, que es valor estándar establecido para considerar la existencia de bulking en la biomasa (Ahmad y col., 2007) (Fig. 5).



**Figura 5.** Determinación del índice volumétrico de sedimentación en cada etapa de operación.



## 4.2 Etapa II: tratamiento de la vinaza y del biogás

Con el objetivo de disminuir el déficit en carbono para el tratamiento del agua residual, se conectó la columna de absorción de CO<sub>2</sub> al HRAP con un flujo de 5 mL/min de biogás sintético. La elección del flujo del biogás se realizó considerando el efecto de adición de CO<sub>2</sub> sobre el medio de cultivo, debido a que contribuye a la acidificación del mismo. De esta manera, un descenso brusco de pH conllevaría un aumento de pérdida de CO<sub>2</sub> por stripping y el carbono seguiría limitando en el proceso. Por otro lado, pHs más bajos también empeorarían la transferencia de CO<sub>2</sub> desde el biogás hasta la fase líquida (Bahr y col., 2014). Sin embargo, un mayor aporte de carbono supuso un aumento de la actividad fotosintética y los valores de pH se mantuvieron cercanos a 8 (Tabla 2). Los mayores aumentos de pH se registraron durante el período de iluminación ( $\approx 8.4$ ) debido a la actividad de las microalgas, mientras que los valores mínimos fueron registrados al final de la etapa de oscuridad ( $\approx 7.6$ ).

En esta segunda etapa el ratio de alimentación C/N se aumentó de 3.39 a 4.62, siendo la eliminación de COT y de CI de  $45 \pm 11\%$  y de  $66 \pm 3\%$ , respectivamente. En este caso, la mayor biodegradabilidad de COT pudo ser consecuencia de la alta variabilidad de las características de las aguas residuales, ya que se trabajó con un nuevo lote de vinazas en esta etapa. En la eliminación de CI en porcentaje se consideró la transferencia de CO<sub>2</sub> desde la fase gas a la líquida. Así, la eliminación de CO<sub>2</sub> en la columna de absorción fue del  $99.1 \pm 0.2\%$  y la eliminación de CT aumentó hasta un 63%. Debido a este aumento de eliminación de CT, un mayor aporte de CI no incrementó su concentración en el medio de cultivo y se mantuvo constante en torno a 65 mg /L (Tabla 3). La elevada velocidad de recirculación de líquido desde el HRAP a la columna (125 L/d) conllevó una elevada desorción de O<sub>2</sub> del medio de cultivo, registrándose porcentajes de O<sub>2</sub> en la salida de biogás del  $9.2 \pm 3.8\%$ . En estas condiciones, una menor recirculación de líquido y la depuración de biogás de composición real con H<sub>2</sub>S (su oxidación disminuye el O<sub>2</sub> en la corriente de salida) conllevaría una menor cantidad de O<sub>2</sub> en el biogás tratado (Bahr y col., 2014) y, por tanto, una depuración óptima del mismo.

En esta segunda etapa, la eliminación de NT aumentó hasta  $37 \pm 7\%$  (Fig. 4). A su vez, la eliminación de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante este período fue del  $94.0 \pm 11.0\%$ , con una tasa estimada de nitrificación del  $65.1 \pm 9.5\%$  y una concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el efluente de  $46.1 \pm 2.4$  mg N/L (Tabla 3).

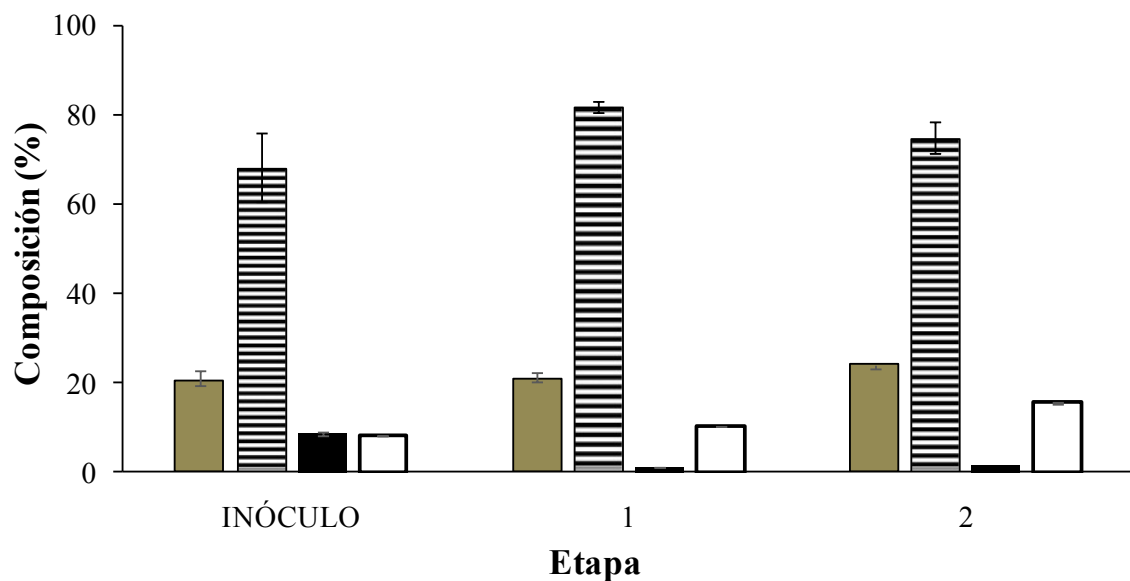
La eliminación de P también aumentó hasta  $39.0 \pm 3.3\%$ , con una concentración en el efluente de  $1.62 \pm 0.61$  mg P/L (Tabla 3). Debido a que no se llegaron a alcanzar valores de pH cercanos a 9, se considera que toda la eliminación de P tuvo lugar como asimilación de biomasa algal (Cai y col., 2013).

Debido a una mayor eliminación de carbono y nutrientes (en forma de biomasa algal), la concentración de sólidos aumentó hasta  $0.56 \pm 0.09$  g/L en la etapa II, lo que conllevó un aumento en la productividad hasta  $7.7 \pm 0.6$  g/m<sup>2</sup>/d. La producción de biomasa en este sistema no es extrapolable a las producciones en sistemas al aire libre en HRAPs ( $\approx 20$  g/m<sup>2</sup>/d) debido a que la luz recibida en condiciones naturales oscila entre 1000 y 3000  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  (Chisti, 2007). En esta segunda etapa, la eficacia de eliminación de sólidos en el sedimentador fue similar a la etapa I ( $95.07 \pm 5.39\%$ ). La alta eliminación de la biomasa generada del efluente tratado en el sedimentador implica una ventaja económica respecto a las técnicas físico-químicas convencionales de recogida de biomasa algal tales como centrifugación o coagulación-floculación (De Godos y col., 2011). La sedimentabilidad volumétrica de la etapa II fue de  $260 \pm 36$  mL/g, un valor bastante mayor que el de la etapa I ( $44 \pm 2$  mL/g), lo que indicó unas peores condiciones de sedimentabilidad, posiblemente por la influencia del aumento de microalgas filamentosas.

### **4.3 Caracterización de la biomasa en las etapas I y II**

La biomasa inicial se caracterizó por una composición en proteínas, hidratos de carbono, lípidos y cenizas de  $20.23 \pm 0.98\%$ ,  $68.21 \pm 7.64\%$ ,  $8.6 \pm 0.94\%$  y  $8.33\%$ , respectivamente (Fig. 6). Esta biomasa del inóculo estuvo formada por una baja cantidad de proteínas y lípidos respecto a resultados reportados previamente (30-35% para proteínas; 5-80% para lípidos) (González-López y col., 2010; Chisti, 2007) y por una alta cantidad en hidratos de carbono (10-57%) (Cea-Barcia y col., 2014). Con el paso del tiempo, el déficit de carbono en la etapa I conllevó un aumento en el contenido de hidratos de carbono hasta  $81.84 \pm 1.33\%$ , mientras que la cantidad de lípidos disminuyó hasta  $1.07 \pm 0.31\%$ . Una tendencia similar se registró en la segunda etapa, en la cual la cantidad de proteínas aumentó ligeramente hasta  $24.13 \pm 1.41\%$ , disminuyendo los hidratos de carbono a  $74.79 \pm 3.54\%$  y manteniéndose los lípidos en  $1.63 \pm 0.08\%$ . Es importante destacar que la cantidad de PHBs en la biomasa algal fue inferior al 0.15% en el inóculo y en la biomasa recogida, por lo que la producción de biopolímeros a partir de las microalgas cosechadas en este proyecto no sería rentable.

De esta manera, y considerando la composición en la biomasa a lo largo de las dos etapas analizadas, producción de biometano (tras digestión anaerobia) y/o de bioetanol (tras fermentación) a partir de las microalgas cosechada en las etapas I y II se plantean como alternativas sostenibles para el aprovechamiento energético de esta biomasa. Similares resultados fueron reportados por Cea-Barcia y col. (2014), cuyas cantidades máximas de hidratos de carbono en biomasa crecida en efluente secundario fueron de  $57\pm 1\%$ , proponiéndose también esta biomasa como alternativa para la producción de biohidrógeno.



**Figura 6.** Composición (%) de la biomasa del inóculo y de las etapas I y II: ■ proteínas; ▨ hidratos de carbono, ■ lípidos y □ cenizas.

## 5. CONCLUSIONES

La eliminación de carbono orgánico e inorgánico de las vinazas tratadas en el sistema de lagunaje de algas y bacterias fue efectivo independientemente de la etapa estudiada, ya que se eliminó toda la fracción biodegradable de COT posible ( $\approx 20-40\%$ ) y la eliminación de CI siempre fue mayor del 66%. La estimación de gradientes de  $\text{CO}_2$  en el medio de cultivo y el crecimiento de biomasa algal indican que la eliminación de carbono tuvo lugar por stripping y por asimilación como biomasa algal en ambas etapas.

La baja fracción C/N en la vinaza alimentada y la pérdida de  $\text{CO}_2$  por stripping del medio de cultivo implicó una limitación de carbono en la depuración biológica de las vinazas en la primera etapa. De esta manera, la eliminación de nutrientes en el fotobiorreactor sólo fue efectiva ( $37\pm 7\%$  de NT y  $39.0\pm 3.3\%$  de P) una vez que se conectó la columna de absorción de  $\text{CO}_2$ , siendo la eliminación de  $\text{CO}_2$  en esta prácticamente del 100%. La alta tasa de nitrificación implicó una oxidación de  $\text{N-NH}_4^+$  superior al 94%, de manera que se previno su pérdida por stripping. Por otro lado, debido a que los pHs fueron inferiores a 9, el principal mecanismo de eliminación de nutrientes en el fotobiorreactor fue su asimilación como biomasa algal. Estas mayores eliminaciones provocaron una mayor producción de biomasa en la etapa II ( $\approx 7 \text{ g/m}^2/\text{d}$ ), con una buena eliminación de los sólidos en el sedimentador ( $\geq 94\%$ ), a pesar de que disminuyó su sedimentabilidad.

El alto contenido en hidratos de carbono de la biomasa recogida ( $\approx 70-85\%$ ) indica que el uso más adecuado de esta sería para producción de bioetanol a partir de la fermentación de los azúcares que contiene (tras extracción por sonicación e hidrólisis ácida).

Estos resultados muestran como los sistemas de lagunaje algas-bacterias equipados con una columna interna de absorción de  $\text{CO}_2$ , suponen una gran ventaja respecto a otros tratamientos de aguas residuales, ya que mitigan la emisión de gases de efecto invernadero y disminuyen la eutrofización de los cursos fluviales. La integración de estos procesos, junto con la posible producción de bioetanol a partir de la biomasa producida, presentan el concepto de biorefinería como una realidad técnicamente viable.

**Agradecimientos:** Este Trabajo Fin de Máster es una colaboración en el doctorado de Mayara Leite Serejo, en el cual le agradezco que me permitiera participar, ayudándome además, a iniciarme en el mundo de la investigación con sus consejos y su apoyo.

## ANEXO I

Propiedad (*)	Unidad	Mínimo	Máximo
Metano (CH <sub>4</sub> ) .....	mol %	95	–
CO .....	mol %	–	2
H <sub>2</sub> .....	mol %	–	5
Compuestos Halogenados:			
– Flúor/Cloro .....	mg/m <sup>3</sup>	–	10/1
Amoníaco .....	mg/m <sup>3</sup>	–	3
Mercurio .....	µg/m <sup>3</sup>	–	1
Siloxanos .....	mg/m <sup>3</sup>	–	10
Benceno, Tolueno, Xileno (BTX) .....	mg/m <sup>3</sup>	–	500
Microorganismos .....	–	Técnicamente puro	
Polvo/Partículas .....	–	Técnicamente puro	

(\*) Tabla expresada en las siguientes condiciones de referencia: [0°C, V(0°C, 1,01325 bar)].

**Figura 7. Especificaciones de calidad del gas procedente de fuentes no convencionales introducido en el Sistema Gasista (BOE A-2013-185).**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad A.L., Wong S.S., Teng T.T., Zuhairi A. (2007). *Optimization of coagulation-flocculation process for pulp and paper mill effluent by response surface methodological analysis*. Journal of Hazardous Materials, 145: 162-168.
- APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington (2005).
- Bahr M., Díaz I., Dominguez A., González-Sánchez A., Muñoz R. (2014). *Microalgal-Biotechnology as a platform for an integral biogas upgrading and nutrient removal from anaerobic effluents*. Environ. Sci. Technol., 48 (1): 573-581.
- Balaji S., Gopi K., Mathuvelan B. (2013). *A review on production of poly  $\beta$ -hydrobutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics*. Algal Research, 2: 278-285.
- Becker E.W. (2007). *Micro-algae as a source of protein*. Biotechnol. Adv., 25. 207–210.
- Bhatnagar A., Sillanpää M. (2010). *Utilization of agroindustrial and municipal wastes materials as potential adsorbents for water treatment: a review*. Chem. Eng J 157: 277–296.
- BSP. *BSP Year Book 2009*. Biogas Sector Partnership- Nepal, Bagdol, Lalitpur, Nepal. 2009.
- Cai T., Park S.Y., Li Y. (2013) *Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects*. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 19. 360-369.
- Cea-Barcia G., Buitrón G., Moreno G., Kumar G. (2014). *A cost-effective strategy for the bio-prospecting of mixed microalgae with high carbohydrate content: Diversity fluctuations in different growth media*. Bioresource Technology, 163: 370-373.
- Chan Y.J., Chong M.F., Law C.L., Hassel D.G. (2009). *A review on anaerobic treatment of industrial and municipal wastewater*. Chemical Engineering Journal 155 (1-2): 1-18.
- Chisti Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Advances, 25: 294 – 306.
- Choi S. P., Nguyen M. T., Sim S. J. (2010). *Enzymatic pretreatment of Chlamydomonas reinhardtii biomass for ethanol production*. Bioresource

Technology, 101: 5330–5336.

- Christenson L., Sims R. (2011). *Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels and bioproducts*. *Biotechnology Advances*, 29: 686-702-
- Coca M., Barrocal V.M., Lucas S., González-Benito G., García-Cubero M.T. (2014). *Protein production in Spirulina platensis biomass using beet vinasse-supplemented culture media*. *Food Bioprod. Process.* (2014).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.012>
- De Godos I., Blanco S., García-Encina P.A., Becares E., Muñoz R. (2009). *Long term operation of high rate algae ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates*. *Bioresour. Technol.* 100: 4332–4339.
- De Godos I., Guzman H.O., Soto R., García-Encina P.A., Becares E., Muñoz R., Vargas V.A. (2011). *Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment*. *Bioresour. Technol.* 102: 923-927.
- Dragone G., Fernández B.D., Abreu A.P., Vicente A.A., Teixeira J.A. (2011). *Nutrients limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae*. *Applied Energy*, 88: 3331-3335.
- Drogui P., Asselin M., Brar S.K., Benmoussa H., Blais J.F. (2008). *Electrochemical removal of pollutants from agro-industry wastewaters*. *Sep. Purif. Technol* 61:301–310.
- Eaton A.D., Clesceri L.S., Greenberg AE (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21 st edn. American Public Health Association/American Water Works Association/ Water Environment Federation.
- Flores-Alsina X., Gallego A., Feijoo G., Rodríguez-Roda I. (2010). *Multiple-objective evaluation of wastewater treatment plant control alternatives*. *Journal of Environmental Management*. Vol. 91. Issue 5: 1193-1201.
- Fortuny, M.; Baeza, J. A.; Gamisans, X.; Casas, C.; Lafuente, J.; Deshusses, M. A.; Gabriel, D. (2008). *Biological sweetening of energy gases mimics in biotrickling filters*. *Chemosphere*, 71 (1): 10-17.
- González C., Marciniak J., Villaverde S., García-Encina P.A., Muñoz R. (2008). *Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 891-898.
- González-López C. V., Cerón-García M.C., Acién-Fernández F.G., Segovia-Bustos



- C., Chisti Y., Fernández-Sevilla J.M. (2010). *Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass*. *Bioresource Technology*. 101 (19): 7587-7591.
- González-Sánchez A., Revah S. (2007). *The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium*. *Enzyme and Microbial Technology*. 40 (2): 292-298.
  - González-Sánchez A., Revah S., Deshusses M. (2008). *Alkaline Biofiltration of H<sub>2</sub>S Odors*. *Environ. Sci. Technol.*, 19.7398-7404.
  - Guieysse B., Béchet Q., Shilton A. (2013). *Variability and uncertainty in water demand and water footprint assessments of fresh algae cultivation based on case studies from five climatic regions*. *Bioresource Technology*. 128: 317-323.
  - Haik Y., Selim M.Y.E., Abdulrehman T. (2011). *Combustion of algae oil methyl ester in an indirect injection diesel engine*. *Energy* 36, 1827-1835.
  - Harun R., Danquah M.K. (2011). *Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production*. *Process Biochemistry*. 46. 304-309.
  - Harun R., Yip J.W.S., Thiruvankadam S., Gahni W.A.W.A.K., Cherrington T., Danquah M.K. (2014). *Algal biomass conversion to bioethanol – a step-by-step assessment*. *Biotechnol. J.*, 9. 73–86.
  - Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E. (1971). *Chapter III. Chemical Analysis of Microbial Cells*. *Methods in Microbiology* 5 (B): 209-344.
  - Hirano A., Ueda R., Hirayama S., Ogushi Y. (1997). *CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation*. *Energy*, 22. 137–142.
  - Hossain S.A.B.M., Salleh A., Boyce A.N., Chowdhury, P. Naquiuddin, M. (2008). *Biodiesel fuel production from algae as renewable energy*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4 (3). 250-254.
  - Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis, E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert, M., Darzins A. (2008). *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production perspectives and advances*. *Plant J*. 54. 621–639.
  - Karki A.B., Shrestha J.N., Baijgain S., Sharma I. (2009). *Biogas as Renewable Source of Energy in Nepal Theory and Development*. BSP-Nepal,-Kathmandu, Nepal.
  - Kim K.H., Choi I.S., Kim H.M., Wi S.G., Bae H. (2014). *Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic*

- hydrolysis and immobilized yeast fermentation*. *Bioresource Technology*, 153: 47-54.
- Kochert G. (1978). *Handbook of phycological methods*. London: Cambridge University Press.
  - Kromkamp J. (1987). *Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21:3: 457-465.
  - Laliberté G., Proulx G., Pauw N., De la Noüe J. (1994). *Algal technology in wastewater treatment*, *Ergenisse Limnol.* 42 (1994), pp. 283 – 302.
  - Lee J.Y., Kim Y.S., Um B.H., Oh K. (2013). *Pretreatment of Laminaria japonica for bioethanol production with extremely low acid concentration*. *Renew. Energy*, 54: 196–200.
  - Lowry O.H, Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). *Protein measurement with the Folinphenyl reagent*. *Journal of Biological Chemistry*. 193 (1):265-275.
  - Mara D.D., Pearson H. (1986). *Artificial freshwater environment: waste stabilization ponds*. In: *Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), Biotechnology*. Velagsgesellschaft, pp. 177–206.
  - Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217-232.
  - Mendoza J.L., Granados M.R., de Godos I., Acién F.G., Molina E., Banks C., Heaven S. (2013) *Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production*. *Biomass and Bioenergy*. 54: 267-275.
  - Metting F.B. (1996). *Biodiversity and application of microalgae*. *J. Ind. Microbiol.*, 17: 477–489.
  - Metcalf and Eddy (2003). *Wastewater Engineering and Reuse*, cuarta edición, Mc. Graw Hill.
  - Muñoz R., Guieysse B. (2006). *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review*. *Water Res.*, 40 (15): 2799–2815.
  - Nautiyal P., Subramanian K.A., Dastidar M.G. (2014). *Production and characterization of biodiesel from algae*. *Fuel Processing Technology* 120: 79–88.
  - Nigam P., Vogel M. (1991) *Bioconversion of sugar industry by-products-molasses and sugar beet pulp for single cell protein production by yeasts*. *Biomass and Bioenergy*. Volume 1, Issue 6: 339-345.

- Oswald W.J. (1988). *Micro-algae and waste-water treatment*. In: Borowitzka MA, Borowitzka L.J. (eds) *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge: 305 – 328.
- Park J.B.K., Craggs R.J., Shilton A.N. (2011). *Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond*. *Water Research*, 45: 6637-6649.
- Posadas E., García-Encina P.A., Soltau A., Domínguez A., Díaz I. (2013). *Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal-bacterial biofilm bioreactors*. *Bioresource Technology*, 139: 50-58.
- Posadas E., Bochon S., Coca M., García-González M.C., García-Encina P.A., Muñoz R. (2014). *Microalgae-based agro-industrial wastewater treatment: a preliminary screening of biodegradability*. *Journal of Applied Phycology*. DOI 10.1007/s10811-014-0263-0.
- Rovirosa N., Sánchez E., Benítez F., Travieso L., Pellón A. (1995). *An integrated system for agricultural wastewater treatment*. *Water Science Technology* 32: 165–171.
- Ryznar-Luty A., Krzywonos M., Cibis E., Miskiewicz T., (2008). *Aerobic biodegradation of vinasse by a mixed culture of bacteria of the genus Bacillus: optimization of temperature, pH and oxygenation state*. *Pol. J. Environ. Stud.* 17:101-112.
- Sheehan J.T., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. (1998). *A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae*. National Renewable Energy Laboratory /TP-580-24190.
- Singh J., Gu S. (2010). *Commercialization potential of microalgae for biofuels production*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14. 2596-2610.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006). *Commercial applications of microalgae*. *J. Biosci. Bioeng.* 101(2): 87-96.
- Sutherland D.L., Turnbull M.H., Craggs R.J. (2014). *Increased pond depth improves algal productivity and nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds*. *Water Research*, 53: 271-281.
- Tabatabaei M., Tohidfar M., Salehi-Jouzani G., Safarnejad M., Pazouki M. (2011). *Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran*. *Renewable and Sustainable Energy* 15: 1918-1027.

- Tippayawong, N., Thanompongchart, P. (2010). *Biogas quality upgrade by simultaneous removal of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S in a packed column reactor*. *Energy* 2010, 35 (12), 4531–4535.
- Toledo-Cervantes A., Morales M., Novelo E., Revah S. (2013) *Carbon dioxide fixation and lipid storage by Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource Technology*, 130:652-658.
- Wilkie A.C., Mulbry W.W. (2002). *Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae*. *Bioresource Technology*, 84: 81–91.
- Xin L., Hong-Ying H., Ke G. y Ying-Xue S. (2010). *Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*, 101: 5494-5500.
- Zeller M.A., Hunt R., Jones A., Sharma S. (2013). *Bioplastics and their thermoplastic blends from Spirulina and Chlorella microalgae*. *J. Appl. Polym. Sci.*, 130: 3263–3275.
- Zhou N., Zhang Y., Wu X., Gong X., Wang Q. (2011). *Hydrolysis of Chlorella biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl<sub>2</sub>*. *Bio resource Technology*, 102: 10158–10161.
- Zúñiga C., Morales M., Le Borgne S., Revah S. (2011). *Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by Methylobacterium organophilum isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor*. *Journal of Hazardous Materials*. 190 (1-3): 876-882.