



AYUDAS A LA INVESTIGACIÓN FUNDACIÓN DOMINGO MARTÍNEZ Memoria final ÁREA DE MATERIALES

Nuevos procesos de microalgas y bacterias para la bioconversión de CO₂ de biogás a biopolímeros acoplada a la generación de biometano

Memoria Final de Proyecto

GRUPO DE INVESTIGACIÓN RECONOCIDO DE TECNOLOGÍA AMBIENTAL
DE LA UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (GIRTA-UVa)

Investigador principal: Raúl Muñoz Torre







Índice

1.Resumen de actividades realizadas	3
2. Equipo de Investigación	3
3. Principales tareas y resultados obtenidos	2
4.Hitos alcanzados	20
5.Publicaciones en revistas indexadas	2 1
6.Comunicaciones a Congresos Científicos	22
7. Continuidad del provecto y transferencia a la Sociedad	22





1.Resumen de actividades realizadas

El proyecto Nuevos procesos de microalgas y bacterias para la bioconversión de CO2 de biogás a biopolímeros acoplada a la generación de biometano, que tuvo como Investigador Principal y coordinador al Doctor Raúl Muñoz Torre de la Universidad de Valladolid, fue el seleccionado para la concesión de la ayuda de la Fundación Domingo Martínez en el área de materiales en el año 2018. El objetivo principal de este proyecto, con una duración de 3 años, fue el desarrollo de tecnologías innovadoras con microalgas para la eliminación del CO2 presente en el biogás, dirigidas hacia su bioconversión en bioplásticos (en forma de polihidroxialcanoatos, PHAs) y glucógeno, a la producción de un biometano de calidad similar al gas natural (upgrading del biogás), y a la producción de biofertilizantes/bioestimulantes algales. Para ello se optimizó el diseño y operación de procesos simbióticos de microalgas-bacterias, implementados en fotobiorreactores abiertos y cerrados interconectados a unidades externas de absorción como plataforma tecnológica para la purificación integral de biogás (eliminación de CO2 y H2S), minimizando la desorción de O₂ y N₂ al biometano mediante membranas y operación a presión, y en condiciones de interior y exterior. En una serie de experimentos independientes se estudió el potencial de acumulación de PHA y glucógeno de varias cianobacterias, y el potencial bioestimulantes de las microalgas generadas durante la purificación de biogás en la germinación de cultivos relevantes a nivel nacional.

2. Equipo de Investigación

El equipo de investigación ha estado compuesto por el siguiente personal de plantilla de la Universidad de Valladolid:

Dr. Pedro Antonio García Encina Dra. Silvia Bolado Rodriguez Dra. Raquel Lebrero Fernandez Dr. Raúl Muñoz Torre





3. Principales tareas y resultados obtenidos

Ensayos de acumulación de PHA y glucógeno en cianobacterias (Responsables: Raquel Lebrero, Rebeca Pérez, Investigador Contratado): Una vez demostrada la capacidad de la cepa Nostoc Muscorum de crecer en presencia de biogás se completaron los ensayos en botella analizando el comportamiento de esta cianobacteria (1) en condiciones de limitación de N y adición de ácidos grasos volátiles (AGVs, ácido acético y ácido valérico) y (2) limitando simultáneamente ambos nutrientes, N y P.

En un primer ensayo, se utilizaron botellas de 2,2 L con un espacio de cabeza de CO₂ y N₂ (30/70 v/v) y se mantuvieron en condiciones de agitación continua a 300 rpm y a 26 °C. La cepa de *Nostoc Muscorum* se creció previamente en condiciones estériles en un medio mineral Esddekok+ Salze modificado (Medio ES, SAG 2018). Se realizaron tres ensayos sin limitación de nitrógeno y tres con limitación de nitrógeno, añadiendo a dos de ellos los ácidos correspondientes transcurridos 5 días desde el inicio del experimento (Tabla 1). Todos los ensayos se realizaron por duplicado, analizándose periódicamente la composición del gas del espacio de cabezas y la del medio líquido. Al finalizar el experimento, se tomaron muestras de la biomasa para determinar la concentración de PHAs.

Tabla 1. Condiciones del test de acumulación de PHAs con limitación de N y adición de AGVs

Test	N-NO₃⁻ (mg/L)	P-PO ₄ ⁻³ (mg/L)	Adición de AGVs	Concentración de AGVs (mg/L)
Control	166	3,6	N/A	N/A
N + Ac. acético	166	3,6	Ácido acético	0,08
N + Ac. valérico	166	3,6	Ácido valérico	0,06
Limitación N	10	3,4	N/A	N/A
Limitación N + Ác. acético	10	3,4	Ácido acético	0,08
Limitación N + Ác. valérico	10	3,4	Ácido valérico	0,06

Tal y como se observa en la Figura 1, la cepa de *Nostoc Muscorum* es capaz de eliminar CO₂ durante los primeros 5 días independientemente de la concentración de N presente en el medio. Sin embargo, la adición de ácidos grasos volátiles detiene la actividad fotosintética, probablemente debido a la disminución del pH. Por el contrario, las botellas con exceso de N (CONTROL) presentan una reducción casi completa del CO₂. En los ensayos con limitación de nitrógeno, la biomasa acumuló PHAs en concentraciones de aproximadamente un 4%, sin observarse ninguna diferencia ni en la concentración ni en la composición del biopolímero (% de PHB y PHV) en las distintas condiciones estudiadas.



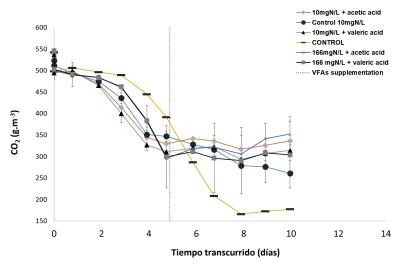


Figura 1. Evolución de la concentración de CO₂ (g/m³) en el espacio de cabeza de las botellas bajo diferentes concentraciones de N y adición de AGVs.

A continuación, se realizaron ensayos en botella en los que sometió a la cepa *Nostoc Muscorum* a limitación de ambos nutrientes, N y P. Para ello, en todas las botellas se utilizó un medio mineral con una concentración de $N-NO_3^-$ de 10 mg N/L, variando el ratio N:P con concentraciones de 0,2,1 y 3,4 mg $P-PO_4^3-/L$. A pesar de que en todos los ensayos se observó una reducción del CO_2 en el espacio de cabezas (Figura 2), en ningún caso se detectaron acumulaciones de PHAs superiores al 1%.

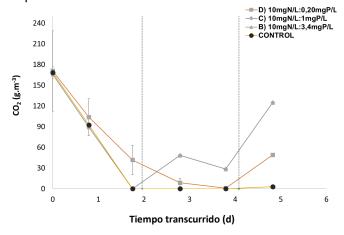


Figura 2. Evolución de la concentración de CO_2 (g/m³) en el espacio de cabeza de las botellas bajo limitación de N y P a diferentes ratios N:P

Como conclusión de este proyecto, se demostró la capacidad de la cepa *Nostoc Muscorum* para crecer en altas concentraciones de CO₂ (similares a las encontradas en el biogás). Sin embargo, los resultados de obtención de PHAs no fueron satisfactorios, independientemente de las condiciones analizadas (limitación de nutrientes, adición de fuentes alternativas de carbono). Por ello, los ensayos posteriores se centrarán en determinar si esta cianobacteria acumula algún biopolímero de valor añadido (i.e. glucógeno) diferente a PHA, al ser sometida a condiciones de estrés. La Figura 3 y 4 muestran la acumulación de glucógeno (GL) en los experimentos realizados con limitación de N en presencia y ausencia de AGVs, y con limitación simultánea de N y P a varios ratios N/P. Se observaron contenidos de glucógeno del 14-30% en *Nostoc*.



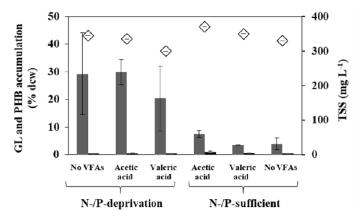


Figura 3. Acumulación de glucógeno (barra gris) y PHB (barra negra) en *Nostoc muscorum* bajo limitación de N y P en presencia de ácido acético y valérico.

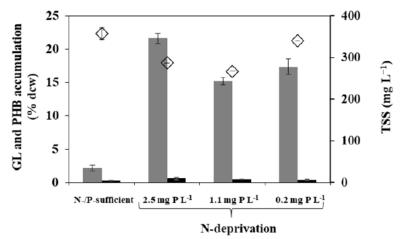


Figura 4. Accumulatión de glucógeno (barra gris) y PHB (barra negra) en *Nostoc muscorum* bajo limitación de N y P.

Purificación de biogás a biometano en fotobiorreactor abierto HRAP en interior (Responsables:

Raúl Muñoz, Pedro García Encina, Raquel Lebrero): Paralelamente a los ensayos en botellas se comenzaron a hacer pruebas con el fotobiorreactor abierto HRAP con consorcios de algas y bacterias con el fin de establecer las condiciones óptimas de operación para posteriormente escalar los ensayos realizados previamente en botellas a este reactor. Un esquema del sistema utilizado en esta experimentación se muestra en la Figura 5. El sistema está formado por un fotobiorreactor abierto HRAP (profundidad: 15 cm, ancho: 63 cm, largo: 202 cm) iluminado (12h:12h luz:oscuridad) por una superficie de luces de 1.2 m² (radiación fotosintética activa de 1350 ± 660 μmol m⁻² s⁻¹ en la superficie del cultivo) y dividido por una pared central en dos canales de agua. El HRAP está interconectado con una columna de absorción (diámetro: 4.4 cm, altura: 165 cm) por una recirculación externa del sobrenadante del cultivo del HRAP desde un decantador cónico de 10 L. El caldo de cultivo se agitó con una paleta de 6 aspas a una velocidad de recirculación interna de 20 cm s⁻¹.





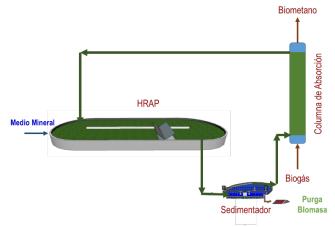


Figura. 5: Esquema del sistema experimental utilizado en las instalaciones del grupo GIRTA en el Dpto. de IQTMA

La alimentación del HRAP se llevó a cabo con medio mineral con un flujo de 3 L d⁻¹, a la vez que la columna se alimentó por la parte inferior con biogás sintético a un flujo de 60 mL min⁻¹. Este biogás, después de la purificación (*upgrading*), abandona la columna por la parte superior como biometano (Figura 5). El ratio líquido/gas fue de 0.5. Se empleó agua del grifo para compensar las pérdidas por evaporación. La productividad de biomasa se fijó en 15 g m⁻² d⁻¹, parámetro controlado mediante la purga de biomasa desde el sedimentador. En la Figura 6 se muestran imágenes reales del sistema experimental.

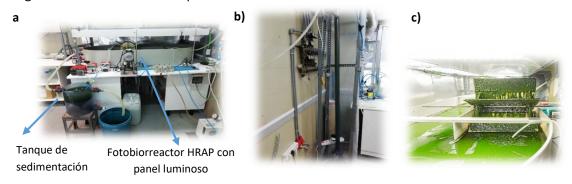


Figura 6: Fotos reales del sistema en las instalaciones de la Universidad de Valladolid: a) Fotobiorreactor HRAP con panel luminoso y tanque de sedimentación; b) columna de absorción; c) HRAP en condiciones de iluminación

Se evaluó inicialmente la influencia de la alcalinidad del caldo de cultivo del HRAP en la purificación de biogás llevando a cabo ensayos a diferentes concentraciones de carbono inorgánico (IC) a pH 10 con el fin de comprobar la evolución de la eliminación de CO_2 . La Figura 7 muestra la variación en la concentración del CO_2 de salida frente a variaciones cíclicas del flujo de biogás, simulando la variación típica del flujo de biogás en digestores reales, y operando a un flujo de líquido constante.



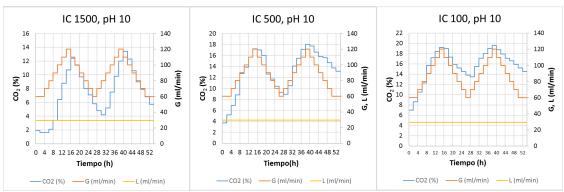


Figura 7. Gráficas de la evolución de CO2 en el biometano con el tiempo a diferentes IC

Uno de los inconvenientes que presenta esta tecnología es la potencial desorción de O_2 y N_2 en el biometano generado. Con el objetivo de eliminar estos gases disueltos que contaminarían el biometano en la unidad de absorción se acopló un módulo de membranas para extraerlos de manera selectiva del caldo de cultivo procedente del sedimentador antes de que entre en la columna. Se seleccionó un tipo de membrana de polidimetilsiloxano adecuada a la permeación selectiva de O_2 y N_2 . Para ello se contó con la colaboración del Grupo de Investigación de Superficies y Materiales Porosos (SMAP) de la UVa. Se hicieron pruebas con dos tipos de membranas: planas y de fibra hueca (Figura 8).

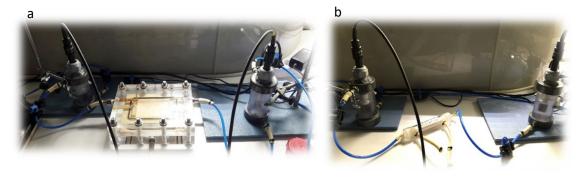


Figura 8. Membrana plana (a) y membrana de fibra hueca (b) de polidimetilsiloxano

Con el fin de **evaluar la capacidad de eliminación de O₂ y N₂ del caldo de cultivo por parte de las membranas** se realizaron los siguientes experimentos analizando de forma continua el oxígeno disuelto con oxímetros a la entrada y salida de la membrana. En la Figura 9 se muestra la configuración del módulo de membrana anexo al HRAP.



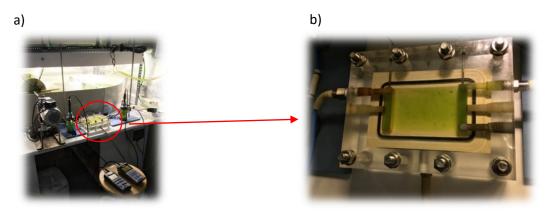


Figura 9. a) Fotobiorreactor HRAP con el módulo de membranas acoplado. Se muestran los oxímetros con los que se mide el oxígeno disuelto. b) Membrana plana ampliada

- <u>Pruebas a diferentes flujos:</u> Se hicieron pruebas a diferentes flujos de medio mineral (5-30 mL min⁻¹) obteniendo tasas de eliminación de O₂ mejores a flujos pequeños en el caso de la membrana plana (Figura 10a). La membrana de fibra hueca presentó una capacidad significativamente mayor para extraer O₂ a cualquiera de los flujos estudiados (Figura 10b), por lo que esta última se selecciona para la experimentación posterior.

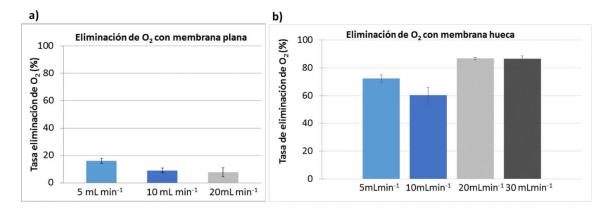


Figura 10: Pruebas con la membrana plana (a) y de fibra hueca (b) a diferentes flujos de medio mineral .

Pruebas a diferentes presiones: Se realizaron a continuación ensayos con la membrana de fibra hueca para evaluar la influencia de la presión absoluta transmembrana en la eficiencia de eliminación de oxígeno, analizándose valores de 100, 300 y 900 mbar de presión de vacío. Durante estos ensayos, se monitoreó la tasa de desoxigenación de la membrana de forma continua, así como la composición del biometano a la salida de la columna (Figura 11). Dichos análisis se hicieron en colaboración con el grupo SMAP-CSIC. Los resultados mostraron la alta capacidad de desgasificación de la membrana de fibra hueca operada a vacío. En el caso del oxígeno disuelto, la eficacia de eliminación aumenta de 3.5 % a 300 mbar hasta 61.7% cuando se opera a 100 mbar de presión absoluta (Figura 11). Si bien es cierto que no hay diferencia significativa en la concentración de O₂ en el biometano obtenido cuando se trabaja a 100 o a 300 mbar (0.14 y 0.12 %, respectivamente), sí existe diferencia respecto a no aplicar vacío (0.38 % de O₂ en el biometano). La ausencia de vacío en la membrana aumentó la concentración de O₂ en el líquido de recirculación debido a la alta permeabilidad del material de la membrana (PDMS). Del mismo modo, la concentración de N₂ en el biometano disminuye desde un 2.0 % sin



succión hasta valores de 0.82 y 0.79 % cuando se opera a 100 y 300 mbar, respectivamente (Figura 11). Esta reducción en la concentración de O_2 y N_2 se refleja posteriormente en la concentración de CH_4 , que alcanza valores de 96.1% a la mayor presión de vacío. Finalmente, cabe destacar que no se observa una diferencia significativa en la composición en H_2S y CO_2 en el biometano con la instalación de la membrana. Este resultado es de esperar, debido a que estos componentes son eliminados casi en su totalidad en la columna de absorción y, por tanto, su concentración en el biometano no depende de la membrana.

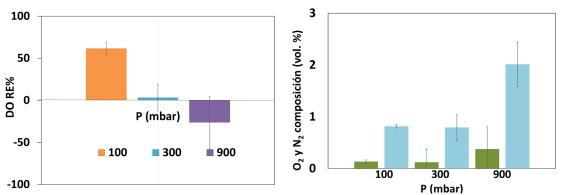


Figura 11. Eliminación de oxígeno disuelto (DO RE, izquierda) y composición de O₂ y N₂ en el biometano de salida (derecha) a las tres presiones estudiadas (100, 300 y 900 mbar de vacío)

Tras el diseño, construcción e instalación de la columna de absorción a presión, se evaluó la influencia de la presión de operación en la calidad del biometano obtenido. Se operó el sistema en cuatro etapas en función de la columna instalada y la presión de operación: columna convencional (Etapa I), nueva columna a presión atmosférica (Etapa II), nueva columna a 1 bar de sobrepresión (Etapa II) y nueva columna a 2 bar de sobrepresión (Etapa III). En la etapa I, trabajando con una columna de absorción convencional, la composición del biometano fue de $95.8 \pm 1.9\%$ de CH₄, $3.5 \pm 0.5\%$ de CO₂, $0.02 \pm 0.02\%$ de H₂S, $0.3 \pm 0.1\%$ de O₂ y $1.6 \pm 0.7\%$ de N₂ (Figura 12). A pesar de las altas eficacias obtenidas, la composición del biometano producido en esta etapa no cumplía con las condiciones requeridas por la legislación española vigente en términos de inyección en redes de gas natural o uso como combustible gaseoso en vehículos, la cual exige <2% de CO₂. Sin embargo, la composición del CO₂ en el biometano mejoró con la columna de absorción a presión. Al operar a presiones de 1 y 2 bares (etapas III y IV, respectivamente), el porcentaje de CH₄ aumentó a 96,4 ± 0,4% y 97,6 %, respectivamente. Asimismo, se observó una mejora significativa de la transferencia de H2S y de CO2, con eliminaciones de CO_2 y H_2S de 88,7 y 94,8 % en la etapa I; 92,3 y 99,2 % en la etapa II; 97,6 y 100 % en la etapa III y 98,3 y 100 % en la etapa IV, respectivamente. Estas eficacias de eliminación de ambos gases resultaron en composiciones en el biometano de 0,7 ± 0,1% y 0,6 ± 0,1 % para el CO₂ en las etapas III y IV, respectivamente, y 0,0 ± 0,0 % para el H₂S independientemente de la presión de operación (Figura 12).





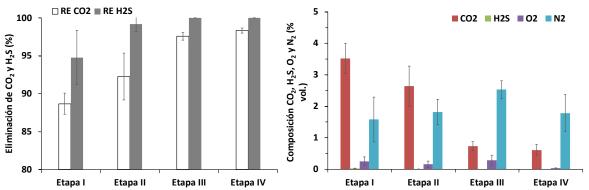


Figura 12. Composición de CO₂, H₂S, O₂ y N₂ en el biometano de salida (A) y eficacia de eliminación de CO₂ y H₂S (B) en función de la columna de absorción y la presión de operación

No obstante, a pesar de los buenos resultados de eliminación del CO_2 y el H_2S , la desorción de oxígeno y nitrógeno del caldo de cultivo al biometano se detectó como el principal problema en la etapa III. Estos resultados se atribuyen a que un aumento de presión conlleva una disminución del tamaño de burbuja y, por lo tanto, un aumento del área específica y del coeficiente de transferencia ($k_L a$). Como consecuencia, el nitrógeno se transfiere más fácilmente a la fase gas conforme aumenta la presión. Las concentraciones de O_2 en el biometano fueron $0.3 \pm 0.2 \%$ y $0.03 \pm 0.0 \%$ en las etapas III y IV, respectivamente, con concentraciones de O_2 de O_3 0 de O_4 1 de O_4 2 de O_4 3 de O_4 3 de O_4 4 en la etapa III y 1,7 O_4 5 de O_4 6 en la etapa IV.

Purificación de biogás a biometano en fotobiorreactor abierto HRAP en Exterior (Responsables: Raúl Muñoz, Silvia Bolado, Raquel Lebrero, Sergio Bordel): Durante la segunda anualidad se instaló un fotobiorreactor HRAP al aire libre en las instalaciones del Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. La planta piloto experimental consistió en un fotobiorreactor abierto (HRAP) de 180 L con una superficie iluminada de 1,20 m² (profundidad = 15 cm; longitud = 170 cm; ancho = 82 cm) y dos canales de agua divididos por una pared central y deflectores en cada lado de la curvatura. El caldo de cultivo en el HRAP fue continuamente agitado por un motor compuesto por 6 paletas a una velocidad interna del líquido de ≈ 20 cm s⁻¹. El HRAP se interconectó a una columna externa de absorción (AC) de burbujeo de 2,5 L (altura = 165 cm; diámetro interno = 4,4 cm) con un difusor de biogás metálico de 2 μm de tamaño de poro instalado en la parte inferior de la columna. El HRAP y la AC se interconectaron a través de una recirculación líquida externa del sobrenadante del caldo de cultivo de algas de un sedimentador de 8 L. El HRAP se instaló dentro de un invernadero (GH) para mejorar el rendimiento de la tecnología durante las condiciones invernales (Figura 13).







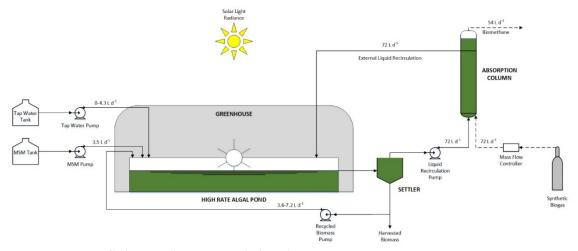


Figura 13. Fotografía (superior) y diagrama (inferior) del montaje experimental al aire libre utilizado para la mejora fotosintética continúa del biogás.

La mezcla de biogás sintético utilizada como alimentación estaba compuesta de CH₄ (70%), CO₂ (29.5%) y H₂S (0.5%) (Abello Linde; España). El medio mineral sintético (MSM) utilizado como fuente de nutrientes consistió en (por litro de agua destilada): 7.40 g de NaHCO₃, 3.70 g de Na₂CO₃, 0.94 g de K₂HPO₄, 1.91 g de NH₄Cl, 0.02 g de CaCl₂·2H₂O, 0.005 g de FeSO₂·7H₂O, 0.10 g MgSO₄·7H₂O y 5.00 ml de una solución de micronutrientes (compuesta de 0.10 g ZnSO₄·7H₂O, $0.10 \text{ g MnCl}_2\cdot4H_2O$, 0.20 g H_3BO_3 , $0.02 \text{ g Co(NO}_3)_2\cdot6H_2O$, $0.02 \text{ g Na}_2MoO_4\cdot2H_2O$, 0,0005 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,70 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y 1,02 g de EDTA · 2Na · 2H₂O por litro de agua destilada). Esto dió como resultado una concentración de carbono orgánico total (TOC) de 54 ± 4 mg/L, de carbono inorgánico (IC) de 1500 ± 43 mg/L, de nitrógeno total (TN) de 530 ± 19 mg/L, de P-PO₄³· de 94 \pm 8 mg/L y de SO_4^{2-} de 112 \pm 7 mg L⁻¹. El HRAP se inoculó el 15 de octubre de 2019 a una concentración inicial de 450 mg de sólidos suspendidos totales (TSS)/L con un inóculo de microalgas mixto. El HRAP se alimentó con un caudal de MSM de 3.5 L/día. El biogás sintético se inyectó en la columna de absorción en flujo de co-corriente a 72 L/día y una relación de caudal líquido-biogás (L/G) de 1.0. Se suministró agua de grifo para compensar las pérdidas por evaporación y permitir la operación del proceso sin efluente. La recolección de algas se realizó mediante la retirada diaria del volumen estimado de biomasa sedimentada para mantener la productividad de biomasa en función de las condiciones ambientales (0,0 g/m²/día en la etapa I, y 7,5 g/m²/día en las etapas II y III). En la etapa III se suministró aire en el fondo del HRAP a una velocidad de 8 L min⁻¹ para favorecer el stripping de CO₂ y mejorar la absorción de CO₂. La Tabla 2 muestra las condiciones de operación del HRAP objeto de estudio.

La concentración de oxígeno disuelto (OD), la temperatura ambiente, temperatura en el interior del invernadero, la radiación fotosintética (PAR) ambiente y la interior del invernadero se monitorearon diariamente por la mañana (9:00 a.m) y por la tarde (4:00 p.m). Se tomaron muestras de gas de 100 μ L de la entrada y biometano dos veces por semana para determinar las concentraciones de CH₄, CO₂, H₂S, O₂ y N₂. En la Tabla 3 se muestran los principales parámetros ambientales y de operación de estas 28 semanas de operación:

Tabla 2. Parámetros de operación del fotobiorreactor abierto operado en exterior.

<u> </u>		<u>'</u>					
Parámetro		1 11 111					
Fecha		15-Oct - 04-Nov	05-Nov – 20-Ene	21-Ene - 30-Abr			





Duración de la etapa (semanas)	3	11	14
Suministro de aire (L min ⁻¹)	0.0	0.0	8.0
Agua de evaporación (L d ⁻¹)	0.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.1 ± 1.2
Productividad de microalgas (g m ⁻² d ⁻¹)	0.0	7.5	7.5

Tabla 3. Parámetros ambientales del HRAP con invernadero operado en exterior.

Parámetro	Etapa			
	I	II	II	
OD promedio en la mañana (mg/L)	8.2 ± 2.2	9.2 ± 1.7	10.6 ± 0.8	
OD promedio en la tarde (mg/L)	12.5 ± 5.5	12.8 ± 1.4	9.2 ± 1.1	
Temperatura ambiente promedio mañana (ºC)	8.8 ± 3.3	4.4 ± 3.8	4.7 ± 3.8	
Temperatura ambiente promedio tarde (ºC)	17.6 ± 4.7	10.3 ± 3.2	13.6 ± 4.1	
Temperatura interior invernadero mañana (ºC)	11.2 ± 4.3	6.7 ± 4.4	10.1 ± 7.7	
Temperatura interior del invernadero tarde (ºC)	26.6 ± 10.0	16.4 ± 5.5	26.1 ± 9.4	
Máxima PAR ambiental en la mañana (μmol/m²/s¹)	398 ± 108	396 ± 82	993 ± 291	
Máxima PAR ambiental en la tarde (μmol/m²/s¹)	966 ± 385	790 ± 209	1738 ± 489	
PAR interior invernadero mañana (μmol/m²/s¹)	298 ± 85	218 ± 49	514 ± 158	
PAR interior invernadero tarde (μmol/m²/s¹)	807 ± 303	422 ± 127	1024 ± 285	
Tasa de evaporación media (L/m²/d)	1.7 ± 1.2	1.1 ± 0.4	2.4 ± 1.0	

En lo relativo a la calidad del biometano obtenido, las concentraciones de CO2 variaron de 1,9 a 4,9 % en la etapa I, de 2,4 a 6,1 % en la etapa II, y de 0.3 a 2.6 % en la etapa III como consecuencia del aumento del pH inducido por la aeración del HRAP, mientras que se obtuvieron concentraciones de H₂S de entre 0,02 y 0,06% independientemente de la etapa (Figura 14). Por otro lado, la concentración de N₂ varió entre 1,5 y 2,9 % en la etapa I, entre 1,9 y 3,2 % en la etapa II, y entre 1.0 y 2.5 % en la etapa III. En el caso del O2, se obtuvieron concentraciones entre 0,7 y 1,4 % en la etapa I, entre 0,9 y 1,5 % en la etapa II, mientras que en la etapa III la concentración de O2 en el biometano bajó al 0.4 %. Finalmente, la concentración de CH4 en el biometano se mantuvo en valores de 92,9 ± 2,0 % en la etapa I, de 92,8 ± 2,6 % en la etapa II, y fluctuó entre 93.0% y 98.2% en la etapa III (Figura 14). Estos resultados demuestran que la instalación de un invernadero permite la operación del fotobiorreactor abierto en exterior independientemente de las condiciones ambientales, manteniendo una elevada eficacia de upgrading de biogás en otoño e invierno en condiciones de clima continental. La inyección de un pequeño flujo de aire en el fondo del HRAP, simulando la eliminación de CO2 por las microalgas, aumentó el pH del medio de cultivo y mejoró significativamente la calidad del biometano producido en los meses más duros del invierno (enero y febrero).



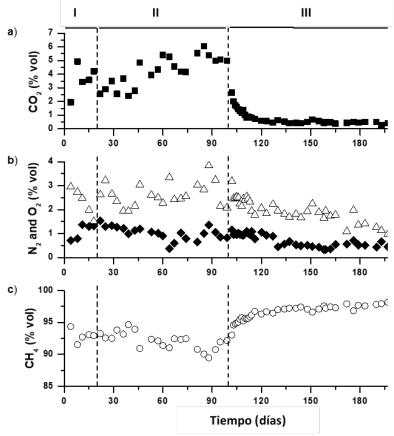


Figura 14. Evolución de la concentración de dióxido de carbono (a), nitrógeno (\triangle) y oxígeno (\blacklozenge) (b), y metano (c) en el biogás tratado en el fotobiorreactor abierto en exterior a lo largo de las etapas I, II y III.

A partir de los datos experimentales obtenidos durante la primera y segunda anualidad, se realizó un análisis de sostenibilidad del proceso fotosintético de tratamiento de agua residual y limpieza simultánea de biogás en dos plantas piloto y una a escala real. El análisis de ciclo de vida se realizó en términos de consumo de energía, emisiones de CO₂ e impactos medioambientales, utilizando el programa SimaPro y mostró los menores consumos energéticos y baja huella de carbono de esta tecnología.

Purificación de biogás a biometano en fotobiorreactor cerrado en interior (Responsables: Raúl Muñoz, Pedro García Encina, Raquel Lebrero, Investigador contratado): El fotobiorreactor cerrado se iluminó con dos sets de LED de alta intensidad que proporcionaban una intensidad luminosa de ~883 μmol/m²/s, operando con ciclos de luz:oscuridad de 12:12 horas. El medio de cultivo se recirculaba a una velocidad de 0,5 m/s a través del fotobiorreactor y la cámara de mezcla, evitando así la formación de biopelícula en el interior de los tubos. La columna de absorción se alimentaba en co-corriente con caldo de cultivo procedente de la cámara de mezcla y el biogás sintético a través de un difusor de acero inoxidable de 2 μm de tamaño de poro. El fotobiorreactor se inoculó con un consorcio de microalgas procedente de un HRAP operado en la planta de tratamiento de aguas residuales El Torno, en Chiclana de la Frontera. Inicialmente, se alimentó durante 14 días con biogón (mezcla sintética de CO₂ y N₂ en concentración 30/70 v/v) para el crecimiento y adaptación del inóculo. Tras la inoculación del fotobiorreactor cerrado y el periodo inicial de adaptación del inóculo, se sustituyó el biogón por una mezcla de biogás



sintético de composición 70% CH₄, 29,5% CO₂ y 0,5% H₂S (Abello Linde, España). El medio mineral sintético utilizado como fuente de nutrientes estaba compuesto por (g/L): 2,44 Na₂HPO₄; 1,52 KH₂PO₄; 1,0 (NH₄)₂SO₄; 0,2 MgSO₄·7H₂O; 0,05 CaCl₂·2H₂O y 5 mL de una solución de micronutrientes compuesta por (g/L): 0,5 EDTA; 0,2 FeSO₄·7H₂O y 100 mL de otra disolución de (g L⁻¹) 0,1 ZnSO₄·7H₂O; 0,03 MnCl₂·4H₂O; 0,3 H₃BO₃; 0,2 Co(NO₃)₂·6H₂O; 0,03 Na₂MoO₄·2H₂O; 0,01 CuCl₂·2H₂O y 0,02 NiCl₂·6H₂O. Además, durante las etapas II, III, IV, V y VI se modificó la concentración de carbono inorgánico mediante la adición de una mezcla de NaHCO₃ y Na₂CO₃ tal y como se muestra en la Tabla 4. El fotobiorreactor se operó durante 190 días sin limitación de nitrógeno previamente a los ensayos con limitación de este nutriente para estudiar la producción de bioplásticos u otro compuesto de valor añadido. Durante la etapa IV, el sistema operó con ciclos de 24h de limitación de N, y durante la etapa V los ciclos de limitación de N se aumentaron a 48 h. Finalmente, en la etapa VI se restableció la alimentación continua de nitrógeno (Tabla 4):

Tabla 4. Parámetros de operación del fotobiorreactor tubular empleado para la purificación de biogás.

Etapa	Duración (d)	Estrategia operativa	Tipo de gas	TN (mg N L ⁻¹)	IC (mg L ⁻¹)
0	0 – 66		Biogón	76.9 ± 11.0	217.1 ± 29.3
1	67 – 99	ludina a is als la sana a tura i i a		102.2 ± 2.0	218.8 ± 5.1
Ш	100 – 117	Influencia de la concentración de carbono inorgánico		97.1 ± 3.9	429.5 ± 47.5
Ш	118 – 190	de carbono morganico	Biogás	77.2 ± 8.5	1707.3 ± 52.8
IV	191 – 240	24-h ciclo de limitación de N	Biogas	4.9 ± 0.9	1285.1 ± 56.6
V	241 – 282	48-h ciclo de limitación de N		6.2 ± 1.0	1379.0 ± 87.9
VI	283 – 395	Nutrición regular		92.7 ± 6.3	1379.5 ± 47.8

Independientemente de las condiciones de operación, se alcanzaron eliminaciones prácticamente completas de H₂S, con concentraciones en el biometano generado inferiores al límite de detección del equipo de medida. La eliminación de CO2, por el contrario, aumentó progresivamente con el aumento del carbono inorgánico (IC) en el medio de cultivo, registrándose eficacias de eliminación de 77,7 ± 3,9 % en la etapa I (concentración de IC ~ 200 mg/L), 85.4 ± 3.3 % en la etapa II (IC ~ 450 mg/L) y 96.3 ± 0.8 % en la etapa III (IC ~ 1600 mg/L). Durante las etapas IV, V y VI, las eliminaciones de CO₂ se mantuvieron en valores medios de 97.3 \pm 0.5, 97.0 \pm 0.8 y 94.5 \pm 0.8 % como resultado de las altas concentraciones de IC en el medio de cultivo (~ 1300 mg IC/L) y altos pH (9.4-9.8) (Figura 15). Este aumento de la eficacia estuvo asociado a una mejor transferencia del CO₂, un gas ácido, al medio de cultivo del fotobiorreactor. El biometano obtenido presentó la siguiente composición en función de las condiciones de operación (Figura 15): Etapa I: 90.8 ± 1.5 % de CH₄; 6.2 ± 1.8 % de CO₂; 0.0 % de H₂S; 0.8 ± 0.3 % de O_2 y 1,7 ± 0,8 % de N_2 ; Etapa II: 93,3 ± 1,3 % de CH₄; 4,6 ± 1,1 % de CO₂; 0,0 % de H₂S; 0,5 ± 0,2 % de O_2 y 2,0 ± 0,5 % de N_2 ; Etapa III: 97,2 ± 0,9 % de CH_4 ; 1,1 ± 0,2 % de CO_2 ; 0,0 % de H_2S ; 0.4 ± 0.3 % de O_2 y 1.6 ± 0.4 % de N_2 . Durante las etapas IV, V y VI, el biometano mostró una composición media de 97.7 \pm 1.0 % de CH₄, 1.0 \pm 0.4 % de CO₂, 0.2 \pm 0.1 % de O₂ y 1.3 \pm 0.8 % de N2. Estos resultados demostraron el elevado rendimiento del fotobiorreactor cerrado para la limpieza de biogás bajo condiciones suficientes y limitantes de N.



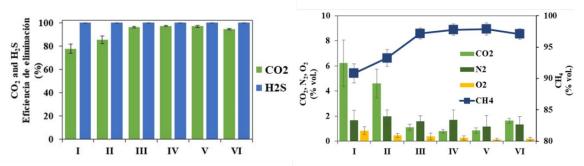


Figura 15. Eficacias de eliminación de CO₂ y H₂S (izquierda) y concentraciones de CH₄, CO₂, N₂ y O₂ en el biometano (derecha).

Transformación de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en gas natural renovable

(Responsables: Raúl Muñoz, Pedro García Encina, Raquel Lebrero, Investigador contratado): La fracción orgánica de residuos sólidos urbanos se obtuvo de un restaurante de Valladolid, mientras que el medio mineral usado para compensar la evaporación del HRAP simuló un digestato anaerobio. El sistema experimental, ubicado en los laboratorios exteriores del Instituto de Procesos Sostenibles, estuvo compuesto por un digestor anaerobio de 130 L operado a 37 ºC y acoplado a un medidor de biogás por pulsos eléctricos de 2 L de capacidad (Figura 16). La salida del biogás producido se almacenó temporalmente en un gasómetro de 100 L de capacidad desde el que se bombeo a una columna de absorción de burbujeo de 2,5 L (altura = 165 cm; diámetro interno = 4,4 cm) con un difusor de biogás metálico de 2 μm de tamaño de poro instalado en la parte inferior de la columna. La columna de absorción estuvo conectada a un fotobiorreactor abierto (HRAP) de 180 L con una superficie iluminada de 1,20 m² (profundidad = 15 cm; longitud = 170 cm; ancho = 82 cm) y dos canales de agua divididos por una pared central y deflectores en cada lado de la curvatura. El caldo de cultivo en el HRAP fue continuamente agitado por un motor compuesto por 6 paletas a una velocidad interna del líquido de ≈ 20 cm s⁻¹. El HRAP y la columna de absorción de biogás se interconectaron a través de una recirculación líquida externa del sobrenadante del caldo de cultivo de algas de un sedimentador de 8 L. El HRAP se instaló dentro de un invernadero para mejorar el rendimiento de la tecnología durante las condiciones invernales (Figura 16). Durante esta tercera anualidad se establecieron 5 etapas de operación, en las que se alimentó 1.4 L/d de residuos orgánicos con una concentración de 60 g material seca por kg de residuos (digestión en vía húmeda). El digestato generado (0.2-1.4 L/d) por el digestor anaerobio de 130L se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos y la fracción líquido se introdujo como medio nutritivo al HRAP. El biogás producido (50-82 L/d) se bombeo a la columna de absorción de biogás. El digestor anaerobio se inoculó con 100 L de digestato de la EDAR de Valladolid, y el HRAP se inoculó con un cultivo algal compuesto de Chlorella vulgaris (2%) y Pseudoanabaena sp. (98%).

Con el objetivo de optimizar el proceso integrado de digestión anaerobia de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos y generación de biometano y bioestimulantes-biofertilizantes algales, el sistema se operó a lo largo de 5 etapas con y sin invernadero, a diferentes relaciones L/G, con diferentes concentraciones de carbono inorgánico en el HRAP y con suministro de aire simulando el consumo de CI (Tabla 5).





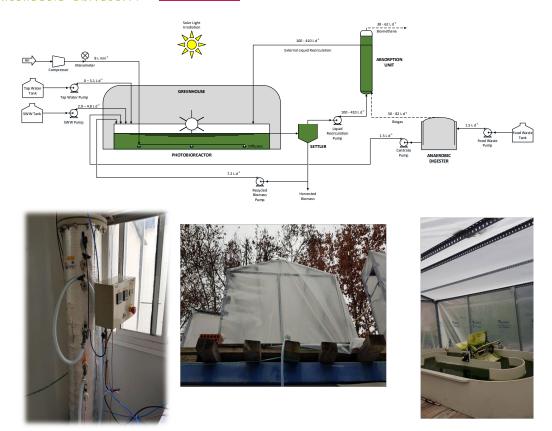


Figura 16. Diagrama esquemático del proceso integrado de digestión de basura y purificación de biogás (superior) y fotografía (inferior) del digestor anaerobio (izquierda), invernadero (centro) y HRAP (derecha).

Tabla 5. Parámetros de operación y ambientales del sistema integrado digestor-fotobiorreactor empleado para la purificación de biogás y generación de bioestimulantes algales a partir de residuos sólidos urbanos.

	Etapa				
Parámetro	I	II	III	IV	V
Fecha	05/08-30/08	31/08-13/09	14/09-30/09	01/10-11/11	12/11-3/12
Uso de invernadero	No	No	No	Yes	Yes
L/G ratio	2.0	2.0	5.0	2.0	2.0
Suministro de Aire (L min ⁻¹)	0.0	8.0	0.0	0.0	0.0
Agua de evaporación (L d ⁻¹)	4.6 ± 0.4	4.4 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oxígeno disuelto Mañanas (mg L ⁻¹)	2.4 ± 1.1	8.1 ± 1.5	2.3 ± 1.0	2.7 ± 1.8	6.1 ± 2.3
Oxígeno disuelto Tardes (mg L-1)	2.4 ± 1.2	5.8 ± 1.5	2.3 ± 0.8	2.1 ± 1.5	5.3 ± 1.9
Tasa de evaporación en HRAP (L m ⁻² d ⁻¹)	7.9 ± 1.6	8.0 ± 0.9	5.1 ± 1.8	2.8 ± 1.1	2.9 ± 1.4
Productividad Algal (g m ⁻² d ⁻¹)	22.5	22.5	22.5	15.0	0.0

El digestor anaerobio piloto soportó eliminaciones totales de la materia orgánica de la basura del 83% (medidas como DQO total) y de materia orgánica soluble del 92 % (Figura 17) en condiciones mesófilas. Durante la operación de digestor anaerobio en vía húmeda, la concentración de sólidos volátiles disminuyó del 8-9 % medido al inicio del experimento al 5 % durante los días 50-100, y se estabilizó al 6 % a partir del día 120 (Figura 17). Se observó un aumento gradual de la concentración de carbono orgánico disuelto total desde los 200 mgC/L a los 550 mg C/L, de nitrógeno total disuelto de los 700 mgN/L a los 1400 mgN/L, y de carbono



inorgánico disuelto de los 600 mgC/L a los 1000 mgC/L como consecuencia de la degradación de la materia orgánica presente en la basura frente al inoculo procedente de la digestión de lodos de EDAR. Por su parte, el pH en el digestor anaerobio se mantuvo contante en valores cercano a 8.1, lo que garantizó una buena actividad metabólica. La ausencia de acidificación del cultivo anaerobio se confirmó mediante las mediciones de concentración de ácidos grasos totales, que alcanzaron concentraciones totales en el rango de 200-500 mg/L como ácido acético. La producción de biogás se mantuvo relativamente constante en el rango de 67 L/d, con fluctuaciones entre 50 y 82 L/d como consecuencia de la heterogeneidad de la basura orgánica alimentada al digestor anaerobio.

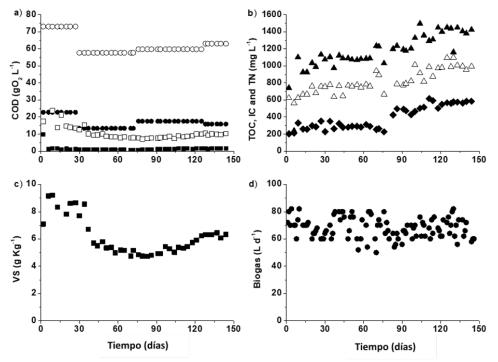


Figura 17. Evolución de (a) DQO total (símbolos vacíos) y DQO soluble (símbolos sólidos) en la alimentación de basura (círculos) y digestato (cuadrados), (b) concentración de TOC (♦), CI (Δ) y TN (▲) en el digestato, (c) concentración de sólidos volátiles en el digestato y (d) producción de biogás en el digestor anaerobio.

El biogás generado en el digestor presentó una composición típica constante de metano del 59,7 %, de dióxido de carbono del 38.9 %, de oxígeno del 0.33 %, de nitrógeno del 1.08% y concentraciones de H_2S despreciables (Figura 18). La operación del fotobiorreactor en la etapa I, con una relación L/G de 2 sin invernadero y con una concentración de carbono inorgánico en el HRAP de 650 mgC/L, conllevó una mejora en la composición del biometano hasta 80.9 ± 1.1 de CH_4 , 14.7 ± 1.1 de CH_4 , 14.7 ± 1.1 de 14.7 ± 1



aumento en la concentración de CI del caldo de cultivo del HRAP hasta los 1550 mgC/L, que disminuyó hasta los 1250 mgC/L al final de esta etapa, la instalación del invernadero y la operación a L/G de 2, lo que conllevó una mejora en el biometano (88.4 \pm 4.1 de CH₄, 4.4 \pm 1.8 de CO₂, 0.85 \pm 0.46 de O₂ y 6.3 \pm 2.7 de N₂). La etapa V se llevó a cabo en condiciones similares a la etapa IV, con un aumento en la concentración de CI del HRAP hasta los 2000 mgC/L, lo que resultó en una composición del biometano de 89.9 \pm 2.0 de CH₄, 3.6 \pm 1.8 de CO₂, 1.28 \pm 0.41 de O₂ y 5.3 \pm 0.7 de N₂ (Figura 18). Esta última composición cumple con la legislación Española y Europea para inyección de biometano en red o uso como combustible vehicular.

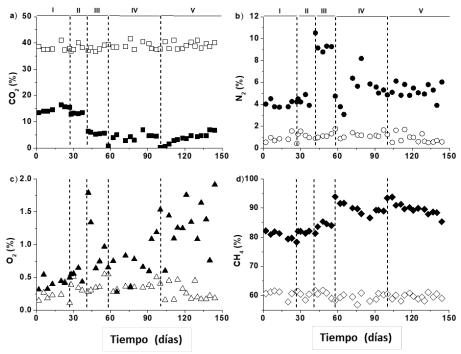


Figura 18. Evolución de la concentración de (a) CO_2 , (b) N_2 (c) O_2 y (d) CH_4 en el biogás bruto (símbolos vacíos) y en el biometano (símbolos sólidos).

Evaluación del poder biofertilizante y bioestimulante de las microalgas. (Responsables:Silvia Bolado, Investigador contratado): Se optimizó un método de hidrólisis enzimática para liberar los bioestimulantes de la biomasa algal producida en el HRAP (que fue recolectada diariamente del sedimentador y congelada antes de su hidrólisis enzimática). Se concentró la biomasa algal mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 400ml de pasta algal concentrada y se calentó a 80ºC en agitación durante 20min. Después se enfrió en un baño de agua. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en condiciones normalizadas con adición de 4% v/v Alcalasa 2.5L (equivale a 16 ml de enzima) durante 3 horas a un pH de 8.0 (que se mantuvo constante con NaOH 1M) y 50ºC en un reactor encamisado de 500 ml de volumen útil. A continuación, se disminuyó el pH a 7 con H₂SO₄ 1M y se procedió a añadir la segunda enzima flavourzyme 1000L (16ml equivalente al 4%), manteniéndose controlado con H₂SO₄ 1M el pH en 7 durante 3 horas. Para finalizar, se calentó la mezcla hidrolizada a 75ºC durante 15min para detener la reacción enzimática. Se realizaron ensayos de germinación en recipientes herméticos sobre algodón con 12 semillas por recipiente de trigo, tomate, pepino y pimiento. Se añadió 5 ml de agua, 5 ml de algas (1 g/L) o 5 ml de alga hidrolizada (1 g/L). Los resultados muestran una mayor longitud y peso húmedo de la planta de trigo, pepino y pimiento en los sistemas germinados con alga hidrolizada. En semillas de pepino y pimiento el peso seco fue mayor en las semillas germinadas con alga hidrolizada (Tabla 6).



Tabla 6. Rendimientos de pruebas de germinación

	TRIGO	TOMATE	PEPINO	PIMIENTO
Largo de la planta (cm)				
Control	14,38 + 2,87	7,44 + 2,19	10,19 + 1,40	3,25 + 0,53
Alga sin hidrolizar	14,38 + 2,88	8,83 + 1,97	11,38 + 1,02	4,69 + 0,66
Alga hidrolizada	17,07 + 2,04	6,72 + 3,45	11,72 + 1,50	4,79 + 0,97
Peso húmedo de la planta (m	ıg)			
Control	0,13247 + 0,041	0,0448 +0,008	0,3109 + 0,066	0,0359 + 0,007
Alga sin hidrolizar	0,1563 + 0,030	0,0489 + 0,014	0,3444 + 0,070	0,0467 + 0,007
Alga hidrolizada	0,1541 + 0,049	0,0354 + 0,016	0,4074 + 0,079	0,0559 + 0,010
Peso seco de la planta (mg)				
Control	0,0203 + 0,006	0,0026 + 0,002	0,0191 + 0,003	0,0033 + 0,001
Alga sin hidrolizar	0,0197 + 0,005	0,0018 + 0,001	0,0184 + 0,003	0,0033 + 0,001
Alga hidrolizada	0,0179 + 0,004	0,0015 + 0,001	0,0213 + 0,004	0,0042 + 0,001

4. Hitos alcanzados

- Comprobación de la tolerancia de la cepa de *Nostoc Muscorum* a altas concentraciones de CO₂ (30% es la concentración más habitual de CO₂ en el biogás), pero su inhibición por el H₂S presente en el biogás, lo que validó el empleo de biogás desulfurado como fuente de carbono de esta cianobacteria.
- Confirmación de la imposibilidad de acumular PHA en *Nostoc Muscorum* en condiciones de limitación de nutrientes pero sí de acumular glucógeno.
- Validación de la tecnología de purificación de biogás en fotobiorreactor abierto y cerrado en condiciones de interior, e identificación de la alcalinidad del medio de cultivo como parámetro de operación clave.
- Demostración de la mayor eficiencia de membranas de fibra hueca frente a membranas de placa plana para la desgasificación del O₂ y N₂ presentes en el caldo de cultivo, alcanzándose un biometano de calidad superior al Standard Español y Europeo.
- Demostración de la eficiencia de utilizar columnas operadas a 1 y 2 bar de sobrepresión para minimizar la desorción de O₂ y N₂ del caldo de cultivo del fotobiorreactor al biometano, alcanzándose un biometano de calidad superior al Standard Español y Europeo.
- Validación de la tecnología de purificación de biogás en fotobiorreactor abierto en exterior con biogás sintético.
- Confirmación de la sostenibilidad de la tecnología de purificación de biogás con microalgas mediante análisis de ciclo de vida.
- Confirmación de la viabilidad del sistema de transformación de residuos sólidos urbanos (residuos de alimentos y lodos de depuradora) en biometano empleando digestión anaerobia acoplada a upgrading fotosintético en fotobiorreactor abierto en exterior
- Confirmación del poder bioestimulatne de microalgas hidrolizadas durante la germinación de semillas de trigo, pepino y pimiento.



5. Publicaciones en revistas indexadas

- Ángeles R, Vega-Quiel M.J, Batista A, Fernández-Ramos O, Lebrero R, Muñoz R (2021) Influence of biogas supply regime on photosynthetic biogas upgrading performance in an enclosed algal-bacterial photobioreactor. Algal Research. 57: 102350
- Marin D, Carmona-Martinez A.A, Blanco S, Lebrero R, Muñoz R (2021) Innovative operational strategies in photosynthetic biogas upgrading in an outdoors pilot scale algal-bacterial photobioreactor. Chemosphere . 264. 128470
- Ángeles R, Arnaiz E, Gutiérrez J Muñoz R, Lebrero R (2021) Biogas-based production of glycogen by *Nostoc muscorum*: assessing the potential of transforming CO₂ into value-added products. Chemosphere. 275: 129885.
- Ángeles R, Arnaiz E, Gutiérrez J, Sepúlveda-Muñoz C.A, Fernández-Ramos O, Muñoz R, Lebrero R (2020). Optimization of photosynthetic biogas upgrading in closed photobioreactors combined with algal biomass production. Journal of water process engineering. 38: 101554.
- Marin D, Carmona-Martinez A, Lebrero R, Muñoz R (2020) Influence of the diffuser type and liquid-to-biogas ratio on biogas upgrading performance in an outdoor pilot scale high rate algal pond. Fuel. 275. 117999.
- Ángeles R, Rodríguez A, Domínguez C, García J, Prádanos O, Muñoz R, Lebrero R (2020) Strategies for N_2 and O_2 removal during biogas upgrading in a pilot algal-bacterial photobioreactor. Algal Research. 48. 101920
- Ferreira A, de Godos Crespo I, Gouveia L, Toledo-Cervantes A, Munoz R (2019) Life cycle assessment of pilot and real scale photosynthetic biogas upgrading units. Algal Research. 44. 101668.
- + 2 publicaciones derivadas del trabajo de la tercera anualidad

6. Comunicaciones a Congresos Científicos

Ángeles R, Domínguez C, Arnáiz E, Palacio L, Prádanos, A. Hernández, R. Muñoz, Lebrero R. Membrane technology for O2 and N2 removal during biogas upgrading in microalgae photobioreactors. IWALGAE 2019- IWA Conference on Algal Technologies and Stabilization Ponds for Wastewater Treatment and Resource Recovery. 1-2 July 2019, Valladolid, Spain (poster)

NOTA: Este apartado se ha visto limitado por la cancelación de multiples congresos a raíz de la pandemia del covid-19.



7. Continuidad del proyecto y transferencia a la Sociedad.

Los resultados del proyecto investigación servirán de base para el desarrollo del proyecto LIFE SMART Agromobility, donde el concepto de producción de biogás y purificación del mismo en fotobiorreactores de microalgas será implementado en el contexto de la ganadería porcina.

El proyecto está previsto se desarrolle en una granja de cerdos gestionada por la Cooperativa COPISO, uno de los socios en el proyecto, que está ubicada en Sauquillo (Soria), España. El prototipo contará con biotecnología de microalgas para el proceso de upgrading y producción de biometano y contará con capacidad para suministrar combustible a dos vehículos ligeros. Adicionalmente, y fomentando procesos basados en economía circular, se obtendrá biofertilizante del proceso biotecnológico. El proyecto LIFE SMART AgroMobility, que se desarrollará hasta 2023, cuenta con un presupuesto total de 2,29 millones de euros que es cofinanciado en un 55% por el Programa LIFE de la Comisión Europea.

LIFE SMART AgroMobility cuenta dentro de su consorcio con: la Universidad Politécnica de Madrid, COPISO SORIA, el Ente Regional de la Energía de Castilla y León, Everis Ingeniería, la Asociación Ibérica de Gas Natural y Renovable para la Movilidad, Natural & bio Gas Vehicle Association y la Universidad de Valladolid.