

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III**



**TESIS DOCTORAL**

**Optimización de la digestión anaerobia de microorganismos  
fotosintéticos: pretratamiento térmico y uso de  
cianobacterias**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Lara Méndez Rodríguez**

DIRECTORES

**Mercedes Ballesteros Perdices**  
**Cristina González Fernández**

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Microbiología III**



**OPTIMIZACIÓN DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE  
MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS:  
PRETRATAMIENTO TÉRMICO Y USO DE CIANOBACTERIAS**

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de  
Madrid presentada por:

**Lara Méndez Rodríguez**

DIRECTORAS:

Dra. Mercedes Ballesteros Perdices y Dra. Cristina González Fernández

Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Energía

Madrid, 2017







*“La vida es aquello que te va  
sucediendo mientras te empeñas  
en hacer otros planes”*

John Lennon (1940-1980).







Memoria presentada por Lara Méndez Rodríguez para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de la Dra. Mercedes Ballesteros Perdices y la Dra. Cristina González Fernández.

Madrid, 2017.

Fdo. Lara Méndez Rodríguez

IMDEA Energía

Fdo. Dra. Mercedes Ballesteros Perdices

Jefe de la Unidad de Biocarburantes

CIEMAT

Fdo. Dra. Cristina González Fernández

Investigadora Titular en la Unidad de Procesos Biotecnológicos

IMDEA Energía







# Agradecimientos

Vaya, esta es una de las secciones que más gente lee (por no decir que para muchas personas será lo único que lean de esta Tesis), de modo que intentaré no saltarme a nadie. Pero por si se da el caso, si estás leyendo esto y no te encuentras incluido/a en este apartado, y consideras que eres una de las personas que me ha aportado (aunque sea mínimamente) apoyo en mi trabajo, o a la hora de escribir, ánimos en los momentos duros, o risas en los buenos, considérate más que incluido.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Mercedes Ballesteros codirectora de esta Tesis y persona, por acogerme en su grupo y darme la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias por todo el apoyo que me ha brindado.

A la Dra. Cristina González, codirectora de esta Tesis, por todos los, consejos, los conocimientos que me ha aportado y toda su dedicación, sin los cuales la realización de este trabajo no habría sido posible. Y por supuesto, agradezco y no olvidaré en mis inicios tus enseñanzas codo con codo en el laboratorio con sus respectivas charlas... Intentare llevar palmeritas en mis visitas.

A toda la unidad de procesos biotecnológicos, los “bios”, a los del principio y a los del final, por los momentos únicos que hemos pasado entre matraces y reactores. A mi querida Marie, Elia, Nacho, Bea, mi inestimable compañero de ensayos Ahmed, Alfredo, David (Moreno), Santi y sus infinitos mundos, Chema y nuestras bromas (solo comprensibles para nosotros), y mi Merchi (indefinible).

Por supuesto no puedo olvidar a mis vecinos de laboratorio, toda la tropa de los termos: Laura, Ali, Alfon, Javi Fermo, sois los míticos. Y por desde luego también a, Héctor, Dani, Sergio, Paula, Santi... y todos que sois muchos!! Al igual que el resto de compañeros de IMDEA, si es que menuda tropa estábamos hechos!! Mario, Pedro, Espe, Zaira, Paula, Cleis, David, Barry, Nacho...y tantos y tantos, sois muchos a los que agradecer muchos buenos momentos. De los de “antes” tampoco me olvido, que también sois unos cuantos: Laurita, Sheida, Cristina, Tadgh, Tahir, Jorn...

También a la unidad de biomasa del CIEMAT, a los Drs. Ignacio Ballesteros, José Miguel Oliva, María José Negro y Paloma Manzanares. A Cristina, Aleta, Luis,

Felicia, Jose Maria, Alberto. Y no olvido a Miguel y Javi, por tantos días allí echándome una mano con el equipo y las conversaciones en el café.

Agradezco también al Dr. Jose Luis Sanz y a Ana Morato, por aceptarme tantas tardes en su laboratorio y por toda la ayuda que me han brindado.

Thanks to Dr. Bruno Sialve of INRA (France) for his support, experience and help. It was a pleasure for me to share those three months, and to know a little bit more of my neighbor country. And those friends that I let there in France but not out from my mind, Julie, Javiera, Jhonny, Gabri, Angel, Rita, Florian...

No puedo olvidar dar las gracias al Instituto IMDEA Energía, ya que gracias a su ayuda, pude realizar la estancia en el extranjero, la cual no solo me sirvió para crecer en mi trabajo, sino crecer como persona.

Gracias a mis queridas amigas, Elena, Lorena, Ana, que con tanto lío últimamente nos vemos menos de lo que debería ser. Aunque eso en breves habrá que compensarlo con alguna salida como las de antaño.

Por supuesto a mi querida familia, mi padre y mi madre, y mi hermana, que fuera el día que fuera, fuera la hora que fuera, siempre me han apoyado en los momentos más duros, me han achuchado en los momentos de bajón, emocionado y alegrado en los buenos momentos (más que yo, a veces!). Os quiero.

Y por último, pero no por ello menos importante para mí, a Antuan. Por estar a mi lado. Por hacerme reír (y también rabiarse; supongo que es mutuo). Por compartir junto a mí este tiempo. Por los momentos que me has regalado y que espero sigas regalándome. Gracias.





# ***Indice***

Agradecimientos	i
Abstract	xi
Resumen	xiv
Índice de tablas	xix
Índice de figuras	xxi
Abreviaturas	xxiv
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Microalgas y cianobacterias: biología y aplicaciones	3
1.1.1. Microalgas	3
1.1.2. Cianobacterias	6
1.1.3. Estructura y composición: pared celular	9
1.1.4. Cultivo y asimilación de nutrientes	12
1.1.5. Recolección	21
1.1.6. Aplicaciones biotecnológicas	22
1.2. Producción de energía: digestión anaerobia	33
1.2.1. Fundamentos, descripción y legislación vigente	33
1.2.2. Etapas del proceso de producción de biogás	34
1.2.3. Producción de metano a partir de microalgas sin pretratar	40
1.2.4. Microorganismos anaerobios: <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i>	42
1.3. Pretratamiento de la biomasa de algas para aumentar la producción de metano: ruptura/solubilización de las microalgas	45
1.3.1. Tipos de pretratamientos	45
1.3.2. Tratamiento térmico	53
<b>2. Objetivos</b>	<b>61</b>
2.1. Justificación de la Tesis	63
2.2. Objetivos de la Tesis Doctoral	65
2.3. Desarrollo de la Tesis	66

<b>3. Resultados publicados</b>	69
<u>Artículo 1</u>	71
Enhancing methane production of <i>Chlorella vulgaris</i> via thermochemical pretreatments	71
<u>Artículo 2</u>	91
Effect of high pressure thermal pretreatment on <i>Chlorella vulgaris</i> biomass: organic matter solubilisation and biochemical methane potential	91
<u>Artículo 3</u>	111
Methane production of thermally pretreated <i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Scenedesmus</i> sp. biomass at increasing biomass loads	111
<u>Artículo 4</u>	131
Biomethane production using fresh and thermally pretreated <i>Chlorella vulgaris</i> biomass: A comparison of batch and semi-continuous feeding mode	131
<u>Artículo 5</u>	147
Microbial communities of biomethanization digesters fed with raw and heat pretreated microalgae biomasses	147
<u>Artículo 6</u>	175
<i>Chlorella vulgaris</i> vs cyanobacterial biomasses: Comparison in terms of biomass productivity and biogas yield	175
<u>Artículo 7</u>	195
Comparison of <i>Chlorella vulgaris</i> and cyanobacterial biomass: cultivation in urban wastewater and methane production	195
<b>4. Discusión</b>	221
4.1. Biomasa de microalgas como sustrato para digestión anaerobia	223
4.1.1. Cultivo y productividad	223
4.1.2. Caracterización de la biomasa	227
4.2. Producción de metano a partir de biomasa microalgal fresca	230

4.2.1. Características de las microalgas como sustrato para la digestión anaerobia comparado con otras biomasas	230
4.2.2. Digestión anaerobia de microalgas: comparación entre especies	231
4.2.3. Digestión anaerobia de la biomasa de microalgas: producción potencial de biometano	233
4.3. Producción de metano a partir de biomasa pretratada	238
4.3.1. Pretratamientos termoquímicos	238
4.3.2. Pretratamientos térmicos	241
4.3.2.1. Efecto sobre la solubilización de materia orgánica	241
4.3.2.2. Producción de metano en BMP y digestor CSTR de biomasa pretratada térmicamente	245
4.4. Microbioma anaerobio	251
4.5. Microorganismos alternativos a las microalgas para la producción de biogás: Cianobacterias	254
4.5.1. Cultivo y productividad	254
4.5.2. Digestión anaerobia: análisis de la producción potencial de biometano	261
<b>5. Conclusiones</b>	267
5.1. Conclusiones	269
5.2. Futuras líneas de investigación	271
<b>Referencias</b>	273





# Abstract

Due to the gradual increase of petrol prices and the importance of the energetic independency, research and development on sustainable biofuels are in the spotlight of energetic policies in developed countries. Attending to commercial development, bioethanol and biodiesel are currently the main biofuels, although there is an increasing interest on biogas. Biogas is produced from anaerobic fermentation of organic matter. The interest of using photosynthetic microorganisms such as microalgae and cyanobacteria as biogas feedstock has increased, due to their multiple advantages. It is worth mentioning their contribution to greenhouse gas emissions (as they consume CO<sub>2</sub> by photosynthesis), they do not compete for farmlands and they can be grown in wastewater effluents. However, microalgae as biogas feedstock present a drawback derived from the presence of a cell wall which diminish their biodegradability. The cell wall is a semi-rigid structure which hampers the hydrolytic bacteria accessibility to organic matter in the anaerobic digestion process. In order to increase the biodegradability, it is necessary to establish a pretreatment step, which disrupts the cell wall and thus enabling the access to organic matter and bacterial attack. Opposite to microalgae, cyanobacteria present a different cell wall, which is composed of a peptidoglycan layer which is less recalcitrant against biodegradation, thus facilitating the anaerobic digestion process.

This Thesis aims the research of microalgae and cyanobacterial biomass as anaerobic digestion feedstock for biogas production. Regarding to microalgal biomass, the effect of different pretreatments has been evaluated in order to increase biomass biodegradability, hence increasing process efficiency. For such purpose it was used *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass. Additionally, the growth on wastewater effluents has also been evaluated in order to analyse the integration of water purifying system with energy production. Anaerobic digestion was investigated in batch mode (BMP) and semi-continuous mode, in mesophilic conditions (35 °C). Afterward, the evaluation of biogas production from cyanobacterial biomass (*Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena planctonica*, *Synechocystis* sp. and *Borzia trilocularis*) was carried out as an alternative substrate to microalgae without applying a pretreatment step. Cyanobacteria were grown using BG-11 as synthetic culture broth, and were also cultured in urban wastewater to evaluate their purifying capacity.

Regarding to the pretreatment effect to increase microalgae biodegradability, various conditions were analysed namely thermal and thermochemical (acid and alkaline) pretreatment on BMP (**Articles 1 and 2**). Results show that, even when increasing solubilisation of organic matter (in terms of carbohydrates and proteins), methane production was not proportional increased to solubilisation degree. These results were ascribed to the formation of inhibitory or recalcitrant side-products to hydrolysis during pretreatment step. Best results on biogas production were obtained when using thermal pretreatment at 120 °C 40 minutes.

With the aim of decreasing pretreatment energetic cost per microalgal biomass unit of the anaerobic digestion process, the effectiveness of this pretreatment was studied at increasing biomass loads (**Article 3**), using biomass concentrations of 1.6%, 3.2%, 6.5% and 13% TS. Results showed that initial biomass concentration do not affect the efficiency of pretreatment. It was observe a lineal correlation between increasing biomass concentration and solubilised carbohydrates concentration. Biogas production was not affected by the increase of biomass load during the pretreatment, showing similar methane productions in all cases tested.

Fresh and thermally pretreated *C. vulgaris* biomass was used for semi-continuous anaerobic digestion, in CSTR reactors (**Article 4**). Pretreated microalgae biomass increased methane production (126 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup>) with regard to fresh biomass (85 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup>). However, methane production was lower than the production observed in BMP. Despite of the low methane productions, there was no inhibition by VFAs, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> or NH<sub>3</sub>. In order to elucidate the reason of such low production the microbial populations of anaerobic sludge were evaluated employing pyrosequencing techniques (**Article 5**). Analysis revealed a high proportion of proteolytic bacteria compare to saccharolytic, which agrees with the protein rich substrate (50-60%) employed as feedstock. Nevertheless, a high number of sequences of non-cultured microorganisms were obtained, hampering a deepen analysis of microbial metabolic roles and the obtained results.

The evaluation of cyanobacteria as anaerobic digestion feedstock (**Articles 6 and 7**) revealed higher methane production with regard to fresh *C. vulgaris*. Since cyanobacterial growth rates on synthetic media were lower than that obtained for *C. vulgaris*, the calculation of methane production per liter of culture media was carried

out. This result showed *A. ovalisporum* and *A. planctonica* as the most productive species, and were used in urban wastewater cultivation for growth and nutrient ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) removal evaluation. On semi-continuous culture similar trends were obtained attending to growth and  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  removal by cyanobacteria and *C. vulgaris*, while methane production was 1.2-1.4 fold higher for cyanobacterial biomass.

To conclude, microalgae biomass pretreatment promoted the enhancement of methane production. Nevertheless, on semi-continuous mode biogas yield was decreased, making it necessary to identify the causes of this decline. Microbial population analysis of anaerobic sludge might be a helpful tool for this purpose. However, there is not enough information in literature about microorganisms that conform these types of reactors. On the other hand, cyanobacterial biomass use as anaerobic feedstock avoids the pretreatment step. In this context, it is of great relevance wastewater bioremediation processes integration. Under studied conditions, cyanobacteria may be useful microorganisms on pollutant removal from waste effluents comparable to microalgae, whilst using the biomass grown as biogas production feedstock.

# Resumen

Debido al precio creciente del petróleo y a la importancia de la independencia energética, la obtención de biocombustibles sostenibles es una de las prioridades de las políticas energéticas de los países desarrollados. Los principales biocarburantes, atendiendo a su desarrollo comercial, son el bioetanol y el biodiesel, aunque el biogás está adquiriendo un creciente interés. El biogás es producido por fermentación anaerobia de la materia orgánica. El empleo de microorganismos fotosintéticos (microalgas y cianobacterias) como sustrato para la digestión anaerobia se vislumbra como una opción interesante debido a las múltiples ventajas que plantea su uso. Entre ellas, cabe destacar su contribución a la mitigación de gases de efecto invernadero (debido al consumo de CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis), no compiten por el uso de tierras de cultivo y pueden cultivarse en aguas residuales. Sin embargo, la utilización de microalgas como sustrato presenta una limitación derivada de la baja biodegradabilidad de sus paredes celulares. Estas paredes son estructuras semi-rígidas que impiden la acción de las bacterias hidrolíticas en el proceso de digestión anaerobia. Para aumentar su biodegradabilidad es necesaria una fase de pretratamiento que facilite la ruptura de la pared celular, haciendo la materia orgánica accesible al ataque bacteriano. A diferencia de las microalgas, en las cianobacterias la pared celular está compuesta de peptidoglicano y es menos recalcitrante a la degradación, facilitando el proceso de digestión.

Esta Tesis tiene como objetivo el estudio de microalgas y cianobacterias como sustratos para la producción de biogás mediante digestión anaerobia. En el caso de las microalgas se ha estudiado el efecto de distintos pretratamientos para aumentar su biodegradabilidad, y por tanto aumentar el rendimiento del proceso, empleando *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. También se ha estudiado el cultivo de esta biomasa en efluentes residuales, con el objetivo de evaluar la posibilidad de acoplar el sistema de depuración de aguas con la producción de energía. La digestión anaerobia de *C. vulgaris* se evaluó en modo discontinuo (BMP) y semi-continuo en condiciones mesófilas (35 °C). Posteriormente, con el fin de evitar el pretratamiento, se investigó la producción de biogás utilizando cianobacterias (*Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena planctonica*, *Synechocystis* sp. y *Borzia trilocularis*) como sustrato alternativo a las microalgas. Estas cianobacterias fueron cultivadas en medio sintético BG-11 y en agua residual urbana para evaluar su capacidad de depuración.

En relación al efecto del pretratamiento para aumentar la biodegradabilidad de las microalgas, se analizaron diversas condiciones de pretratamientos térmicos y termoquímicos en BMP (**Artículos 1 y 2**). Los resultados muestran que, aunque los pretratamiento termoquímicos (ácido y alcalinos) producen un aumento de la solubilización de materia orgánica (en términos de carbohidratos y proteínas), la producción de metano no se incrementó de forma lineal a la solubilización observada. Estos resultados fueron atribuidos a la formación durante el pretratamiento de compuestos intermedios inhibidores o recalcitrantes. Los mejores resultados de producción de biogás se obtuvieron utilizando el pretratamiento térmico a 120 °C durante 40 minutos.

Con el fin de disminuir el coste energético por unidad de biomasa algal durante el pretratamiento se estudió su efectividad a altas cargas de sustrato (**Artículo 3**), empleando concentraciones de 1,6%, 3,2%, 6,5% y 13% ST. Los resultados muestran que la concentración inicial de biomasa no afecta la efectividad del pretratamiento. Se observó una relación lineal entre el aumento de la concentración inicial de biomasa y la concentración de carbohidratos solubilizados. La producción de biogás no se vio afectada por el aumento de la concentración en el pretratamiento dando producciones similares en todos los casos.

La biomasa de *C. vulgaris* fresca y pretratada térmicamente se utilizó en los ensayos de digestión anaerobia en modo semi-continuo en reactores CSTR (**Artículo 4**). El pretratamiento de la biomasa algal aumentó la producción de metano (126 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup>) con respecto a la biomasa sin tratar (85 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup>). Sin embargo, la producción de biogás fue inferior a la obtenida en modo discontinuo. A pesar de las bajas producciones, no se observó inhibición por AGVs, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o NH<sub>3</sub>. Para elucidar la causa de la baja producción de metano se analizó la evolución de las poblaciones bacterianas de los fangos anaerobios mediante técnicas de pirosecuenciación (**Artículo 5**). El análisis mostró una elevada proporción de microorganismos proteolíticos en comparación con sacarolíticos, lo cual concuerda con el tipo de sustrato rico en proteínas (50-60%) empleado como alimentación. Se obtuvieron un gran número de secuencias pertenecientes a microorganismos no cultivables, dificultando el análisis en profundidad de las relaciones entre el microbioma anaerobio y los resultados obtenidos.

En el estudio de cianobacterias como sustrato para la digestión anaerobia (**Artículos 6 y 7**) se observó mayor producción de metano en comparación con *C. vulgaris* fresca. Dado que la tasa de crecimiento en medio sintético de las cianobacterias fue inferior a la de *C. vulgaris*, se evaluó la producción de metano por litro de cultivo. El resultado demostró que las especies más productivas fueron *A. ovalisporum* y *A. planctonica*. Estas especies fueron cultivadas en aguas residuales urbanas para evaluar su crecimiento y eliminación de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ . En cultivo en semi-continuo, se obtuvieron crecimientos y eliminación de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  similares para cianobacterias y *C. vulgaris*, mientras que la producción de metano fue 1,2-1,4 veces mayor en cianobacterias.

Puede concluirse que, el empleo biomasa de microalgas pretratadas aumentó la producción de biogás. Sin embargo, las producciones de metano en semi-continuo son bajas, haciendo necesaria la identificación de las causas que producen esta disminución. El análisis poblacional de los fangos puede ser clave para elucidar esta inhibición. Sin embargo, todavía no se dispone de toda la información necesaria en cuanto a microorganismos que se desarrollan en este tipo de reactores. Por otro lado, el empleo de cianobacterias como sustrato de la digestión anaerobia puede evitar el uso de pretratamientos. A este efecto, la integración de procesos de biorremediación de aguas residuales resulta de gran relevancia. Bajo las condiciones empleadas, las cianobacterias se presentan como microorganismos comparativamente similares a las microalgas para la eliminación de contaminantes en efluentes residuales y como una biomasa fácilmente degradable para la producción de biogás.





# Índice de tablas

Tabla 1.1. Producciones específicas de CH <sub>4</sub> para tres tipos macromoleculares	40
Tabla 1.2. Composición macromolecular de diferentes especies de microalgas y el potencial de CH <sub>4</sub> teórico calculado	41
Tabla 1.3. Relación de pretratamientos y producciones de CH <sub>4</sub> .	56
<u>Artículo 1</u>	
Table 1. <i>Chlorella vulgaris</i> characterisation used as substrate	75
Table 2. Anaerobic digestion of the pretreated microalgae biomass	84
<u>Artículo 2</u>	
Table 1. Anaerobic digestion parameters of raw and pretreated <i>Chlorella vulgaris</i> biomass.	103
Table 2. Effect of thermal pretreatment on methane production applied on different types of biomasses	104
<u>Artículo 3</u>	
Table 1. Characterization of microalgae biomasses ( <i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Scenedesmus</i> sp.) subjected to thermal pretreatment and subsequent anaerobic digestion.	115
Table 2. Anaerobic digestion parameters of raw and pretreated <i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Scenedesmus</i> biomass.	124
<u>Artículo 4</u>	
Table 1. Chemical characterization of the different batches employed to feed the CSTRs.	134

## Artículo 5

Table 1. Average values of the parameters measured in the CSTR reactors fed with raw and heat pre-treated *C. vulgaris* biomasses. 155

Table 2. Coverage, diversity and evenness index estimates of the inoculum and the CSTR reactors fed with raw and heat pre-treated *C. vulgaris* biomasses. 157

Table 3. Metabolic traits of the genera identified with respect to the inoculum and the CSTR reactors fed with raw and heat pre-treated *C. vulgaris* biomasses. 165

Table SM 1. Average values of the chemical characterization of the *Chlorella vulgaris* raw and heat pretreated biomasses used as feedstock of the CSTRs 166

## Artículo 6

Table 1. Chemical characterisation of the photosynthetic microorganisms cultivated and subjected to anaerobic digestion. 184

Table 2. Methane yield and growth rate summary for the photosynthetic microorganisms studied 186

Table 3. Anaerobic digestion parameters of the photosynthetic microorganisms cultivated and subjected to anaerobic digestion. 187

## Artículo 7

Table 1. Chemical characterisation of the photosynthetic microorganisms after 10 days of culture. 212

# Índice de figuras

Figura 1.1. Microalgas pertenecientes a la clase <i>Chlorophyceae</i> .	4
Figura 1.2. Representación esquemática de la cadena de transferencia de electrones (fotoinducción)	6
Figura 1.3. Distintas morfologías de cianobacterias	7
Figura 1.4. (a) Diagrama esquemático de una sección de cianobacteria (b) Micrografía electrónica de una célula en división de <i>Synechococcus</i> sp.	11
Figura 1.5. Diversas configuraciones de FBRs para el cultivo de microalgas. Sistemas abiertos y sistemas cerrados	14
Figura 1.6. Formación de las especies de carbono inorgánico	18
Figura 1.7. Formación de las especies de $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$	19
Figura 1.8. Formación de las especies de fosfato en función del pH	20
Figura 1.9. Representación de las áreas de aplicación de las microalgas	24
Figura 1. 10. Esquema las etapas de producción y procesado de microalgas para la generación de biogás	28
Figura 1.11. Fases de la digestión anaerobia	36

## Artículo 1

Figure 1. Carbohydrates and proteins solubilised upon the different thermochemical pretreatments tested on <i>Chlorella vulgaris</i> .	79
Figure 2. Monomers released upon the different thermochemical pretreatments tested on <i>Chlorella vulgaris</i>	80
Figure 3. Cumulative methane yield achieved by the different pretreatments applied in <i>Chlorella vulgaris</i>	83

## Artículo 2

- Figure 1. Carbohydrates and proteins solubilisation upon the different thermal pretreatments 98
- Figure 2. Infrared absorption spectra ( $\text{cm}^{-1}$ ) of *Chlorella vulgaris* raw biomass and thermally pretreated biomass 100
- Figure 3. Cumulative methane yield achieved by the different pretreatments applied in *Chlorella vulgaris* 101
- Figure 4. Relationship between carbohydrates solubilisation and methane production enhancement for temperatures of 120, 140 and 160 °C. 104

## Artículo 3

- Figure 1. Carbohydrates solubilisation at increasing biomass load of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass during thermal pretreatment. 119
- Figure 2. Proteins solubilisation at increasing biomass load of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass during thermal pretreatment. 120
- Figure 3. Cumulative methane yield achieved by the fresh biomass and the different biomass loads pretreated thermally of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. 122

## Artículo 4

- Figure 1. Inlet and outlet concentrations of total COD and soluble COD of the CSTRs fed with raw biomass and thermally pretreated biomass. 138
- Figure 2. Inlet and outlet for TKN and ammonium concentration of the CSTRs fed with raw biomass and thermally pretreated biomass. 141

## Artículo 5

- Figure 1. Taxonomic profiles at the phylum and the order levels of the biomasses used as an inoculum with respect to both bioreactors studied. 158

Figure 2. Heatmap of the most abundant families and genera identified in the inoculum, reactor fed with the fresh *Chlorella* biomass and reactor fed with the thermal pre-treated *Chlorella* biomass. 160

### Artículo 6

Figure 1. Growth rates recorded for all the photosynthetic microorganisms along cultivation time. 182

Figure 2. Volumetric biomass productivities recorded for all the photosynthetic microorganisms along cultivation time. 183

Figure 3. Cumulative methane yield achieved by for all the photosynthetic microorganisms studied. 189

### Artículo 7

Figure 1. Growth profiles attained for *C. vulgaris* (a), *A. ovalisporum* (b) and *A. planctonica* (c) for the three tested temperatures along the cultivation time (22 °C, 27 °C and 32 °C). 204

Figure 2. Biomass macromolecular distribution of the photosynthetic microorganisms at the end of the cultivation time conducted at 22, 27 and 32 °C. 207

Figure 3. Different profiles of growth attained by *C. vulgaris*, *A. ovalisporum* and *A. planctonica* at 22 °C semi-continuous mode. 208

Figure 4. Different profiles of soluble COD, ammonium, pH and phosphate removal, attained by *C. vulgaris*, *A. ovalisporum* and *A. planctonica*, in a semi-continuous culture mode. 210

Figure 5. Cumulative methane yield achieved by *C. vulgaris*, *A. ovalisporum* and *A. planctonica* biomass after semi-continuous cultivation. 214

# Abreviaturas

AGV (VFA): Ácidos grasos volátiles (volatile fatty acids)

BMP: Biomethane potential test

CSTR: Continuously stirred tank reactor

DQO (COD): Demanda química de oxígeno (Chemical oxygen demand)

FAN: Free ammonia nitrogen

FBR: Fotobiorreactor

GEI (GHG): Gas de efecto invernadero (Greenhouse gas)

LHC: Light harvesting complex

VCO (OLR): Velocidad de carga orgánica (Organic loading rate)

PSI: Fotosistema I

PSII: Fotosistema II

SST (TSS): Sólidos en suspensión totales (Total suspended solids)

SSV (VSS): Sólidos en suspensión volátiles (Volatil suspended solids)

ST (TS): Sólidos totales (Total solids)

SV (VS): Sólidos volátiles (Volatil solids)

TAN: Total ammonia nitrogen

TRH (HRT): Tiempo de retención hidráulica (Hydraulic retention time)





# ***1. Introducción***



### 1.1. Microalgas y cianobacterias: biología y aplicaciones

#### 1.1.1. Microalgas

Las algas son un amplio grupo de organismos fotosintéticos eucariotas que, aunque su hábitat es mayoritariamente acuático, pueden desarrollarse sobre superficies húmedas como la corteza de los árboles o el suelo. En este sentido, se clasifican como algas plantónicas a aquellas que viven en las capas más superficiales del agua, mientras que se denominan bentónicas a aquellas que se encuentran adheridas a rocas u otros sustratos. Las algas según su origen evolutivo están relacionadas con las plantas terrestres, pero poseen características que las engloban en un grupo diferente. Por ejemplo, carecen de desarrollo a partir de semillas y no desarrollan tejidos ni estructuras como raíces y hojas o tejidos vasculares presentes en las plantas superiores.

Las algas pueden presentar morfologías variables y heterogéneas que abarcan desde organismos unicelulares, pudiendo formar colonias, hasta organismos pluricelulares, como es el caso de las macroalgas. Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas que presentan metabolismo fotosintético. Para su clasificación, tradicionalmente se han empleado diversos criterios tales como la morfología, la pigmentación, y otras características como la ausencia o presencia de estructuras de motilidad, su número y disposición, la naturaleza del material de almacenamiento, el ciclo de división, y las características ultra-estructurales (Se-Kwon, 2015). En base a estas características, las microalgas se engloban en varias divisiones principales, siendo las más comunes las *Chlorophyta* o algas verdes (Figura 1.1), *Rhodophyta* o algas rojas, *Glaucophyta*, el grupo de Heterokontos (*Heterokontophyta*) que incluyen las diatomeas (*Bacillariophyceae*), algas pardas (*Phaeophyta*) y algas doradas (*Chrysophyceae*) entre otros (Cavalier-Smith, 1993; Se-Kwon, 2015). Las clasificaciones taxonómicas en las que se engloban las diferentes especies de algas han experimentado un avance considerable debido a los datos aportados por la biología molecular. Las técnicas moleculares han aportado información adicional a las clasificaciones morfológicas tradicionales, evidenciando una gran diversidad genética poco comparable a la morfológica (Leliaert et al., 2012; Singh y Saxena, 2015).

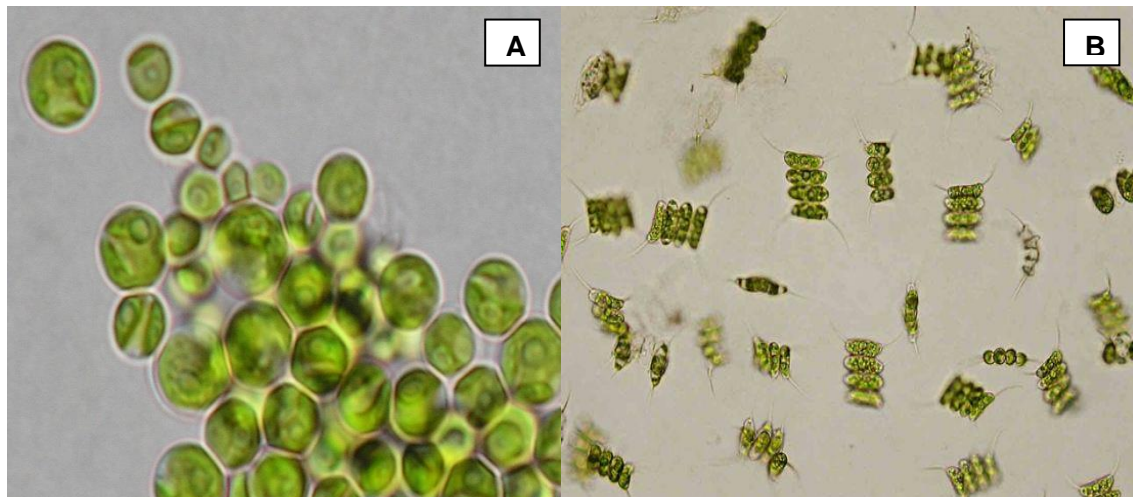
Existe otro grupo de microorganismos fotosintéticos que engloba a algas verde-azuladas (*Cyanophyceae*). Atendiendo estrictamente a la definición de las microalgas

## 1. Introducción

---

como “organismos eucariotas”, no es posible considerar a las cianobacterias como microalgas, dado que se trata de microorganismos fotosintéticos procariotas pertenecientes al dominio *Bacteria*. En este contexto, nos referiremos a estas algas verde-azuladas como cianobacterias, y de ellos se hablará en el siguiente apartado.

Las algas presentan eficiencias fotosintéticas mayores (6-8%) que las plantas terrestres (1.8-2.2%) (H. Chen et al., 2015). Las macroalgas tiene ciclos de división más complejos, lo cual dificulta su cultivo dado que implican recolección de esporas, inducción de la reproducción de los gametofitos y el crecimiento de la biomasa fértil (Edwards y Watson, 2011; Ghadiryanfar et al., 2016), mientras que las microalgas presentan ciclos más simples de división (Yamamoto et al., 2005). Por este motivo, las microalgas presentan mayores tasas de crecimiento que las macroalgas (Ji et al., 2013; Muñoz et al., 2004).



**Figura 1.1.** Microalgas pertenecientes a la clase *Chlorophyceae*. (A) *Chlorella vulgaris*. (B) *Scenedesmus* sp.

Las microalgas poseen una estructura que rodea la célula, llamada membrana plasmática, que se encarga de controlar el intercambio de metabolitos y mantener las diferencias entre el medio celular y el externo. A su vez, rodeando la membrana plasmática, las microalgas pueden presentar una estructura semi-rígida llamada pared celular, que actúa como protección, y de la cual se hablará en mayor detalle en el punto 1.1.2. Además, al ser organismos eucariotas, poseen otras membranas que se encuentran formando una variedad de estructuras sub-celulares llamadas orgánulos, con distintas funciones metabólicas.

## 1. Introducción

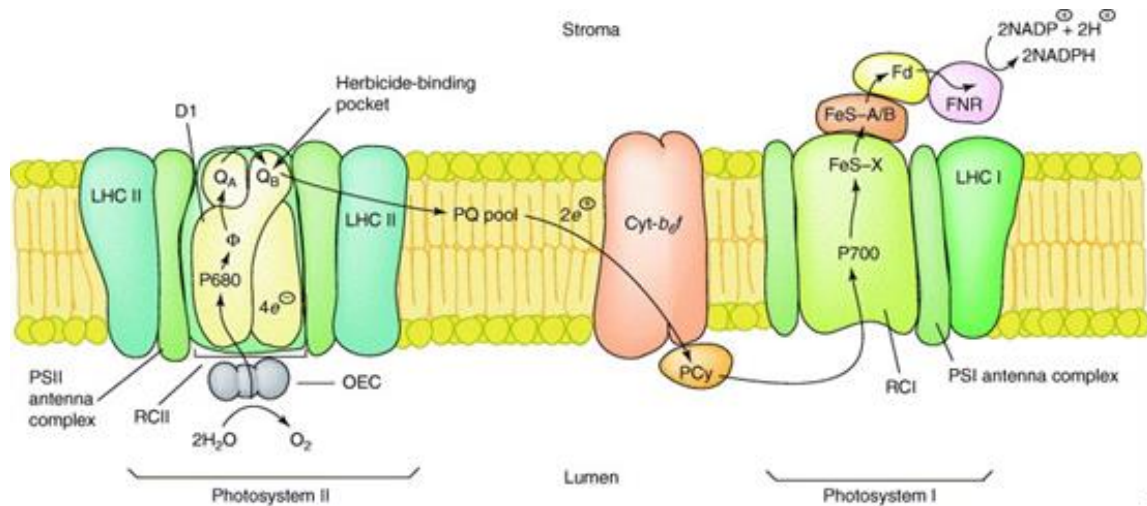
---

Las algas verdes son organismos fototrofos, es decir, son capaces de obtener energía a partir de los fotones provenientes de la luz. Las clorofilas a y b son los pigmentos dominantes contenidos en los cloroplastos (McDermott et al., 1995; Nurachman et al., 2015). También poseen otros pigmentos secundarios, tales como carotenoides que les confieren colores amarillentos y rojizos.

En la fotosíntesis, la función principal de las reacciones de absorción de luz es proporcionar poder reductor ( $\text{NADPH}_2$ ) y energía en forma de ATP para la asimilación de carbono inorgánico. Estos procesos se llevan a cabo en grandes complejos de proteínas conocidos como fotosistemas. Las clorofilas son los pigmentos que intervienen en el metabolismo fotosintético y están contenidas en unas estructuras del cloroplasto denominadas tilacoides, formando parte de los fotosistemas I y II (Figura 1.2). Los fotosistemas, también denominados PSI y PSII, son complejos proteicos donde se agrupan los pigmentos fotosintéticos. Están formados por un centro de reacción que agrupa las clorofilas encargadas de la captación de fotones, a su vez rodeado por estructuras proteicas transmembrana denominadas LHC (*light-harvesting complex*) (Scheller et al., 2001). La energía procedente de la luz es absorbida por la clorofila del LHCII y es transferida al centro de reacción del PSII. El electrón, procedente de la fotólisis de una molécula de agua pasa a la clorofila P680 oxidada. Desde aquí, el electrón pasa a través de una serie de transportadores de membrana (citocromos y quinonas) hasta llegar al PSI donde es aceptado por la clorofila P700, la cual previamente habría sido a su vez excitada con luz. A partir de aquí, se produce la transferencia de electrones que conducirán a la síntesis de NADPH (Hopkins y Hüner, 2008). Al mismo tiempo, los protones son transportados desde un espacio exterior (estroma) al espacio intratilacoidal (lumen) formando un gradiente de pH que impulsa la síntesis de ATP, catalizada por el complejo de proteínas denominado ATPasa o ATP sintasa.

Debido a su metabolismo autótrofo, el empleo de microalgas está considerado como un método biológico eficaz para la fijación de  $\text{CO}_2$  (Razzak et al., 2013; Wang et al., 2008; Yanagi et al., 1995). Mediante el empleo de luz solar, agua y  $\text{CO}_2$ , las microalgas se multiplican, generando así biomasa, a la vez que contribuyen a reducir/controlar las emisiones de  $\text{CO}_2$  de procesos industriales (Maity et al., 2014).

## 1. Introducción



**Figura 1.2.** Representación esquemática de la cadena de transferencia de electrones (fotoinducción) desde la oxidación de una molécula de agua hasta la captación del electrón por parte de dos moléculas de NADP y su reducción a NADPH. Fuente:Giardi y Pace, 2005.

### 1.1.2. Cianobacterias

Las cianobacterias son organismos unicelulares procariotas, es decir, carecen de núcleo y orgánulos celulares rodeados por membranas. Comúnmente, debido a su capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica y a que comparte nichos ecológicos con las algas eucariotas, se han denominado tradicionalmente algas verde-azuladas aunque su naturaleza eucariota, similar a las bacterias, es conocida desde hace tiempo.

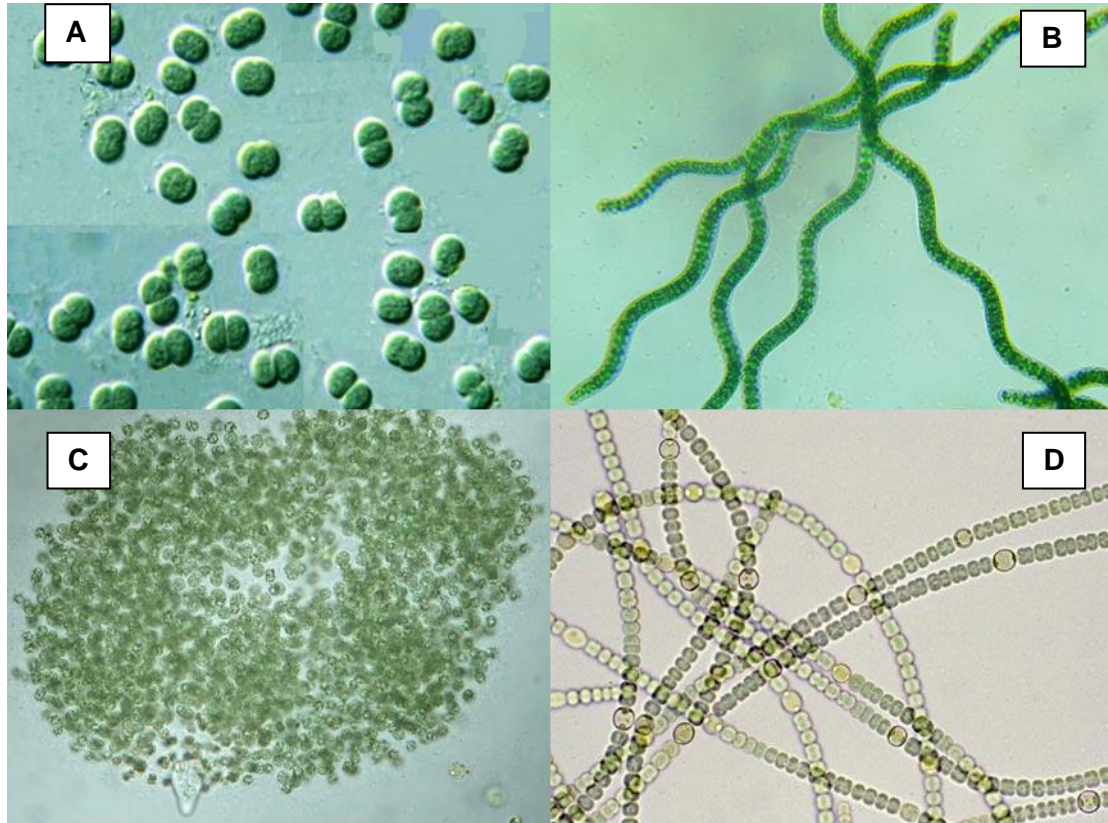
Las cianobacterias son un filo perteneciente a las Eubacterias. Son Gram negativas y se pueden encontrar en un gran número de ambientes (Markou y Georgakakis, 2011), tales como aguas marinas, salobres, ambientes hipersalinos, lagos alcalinos, aguas dulces, suelos, desiertos, paredes de cuevas, aguas termales, regiones polares y otros ambientes extremos (Thajuddin y Subramanian, 2005). Presentan una gran diversidad de morfologías (Figura 1.3) (cocoides, filamentosas con tricomas simples o agregados, con presencia o no de vaina, formando colonias, etc.) que, junto con el tipo de ciclo de vida, ha servido, de forma tradicional, para su clasificación taxonómica. Se dividen en seis órdenes, siendo estos *Chroococcales*,

## 1. Introducción

---

*Gloeobaterales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*, *Pleurocapsales*, y *Stigonematales* (de acuerdo con *NCBI Taxonomy Browser*).

Se cree que las cianobacterias se encuentran entre los organismos pioneros de la vida en la Tierra, siendo los antepasados de estos microorganismos los que desarrollaron la fotosíntesis oxigénica, liberando oxígeno a la atmósfera primitiva (De Clerck et al., 2012).



**Figura 1.3.** Distintas morfologías de cianobacterias, unicelulares cocoides y filamentosas: (A) *Synechococcus* sp., (B) *Spirulina* sp., (C) *Microcystis* sp. y (D) *Anabaena* sp.

En la actualidad, esta comúnmente aceptada la teoría endosimbiótica que postula que algunos orgánulos propios de las células eucariotas, especialmente plastos y mitocondrias, habrían tenido su origen en organismos procariontes que después de ser englobados por otro microorganismo habrían establecido una relación endosimbiótica con éste. Se especula con que las mitocondrias provendrían de proteobacterias alfa (por ejemplo, rickettsias) y los plastos de cianobacterias. (Chorus y Bartram, 1999). Así, mediante fagocitosis de una cianobacteria por una célula

## 1. Introducción

---

eucariota heterótrofa (De Clerck et al., 2012; Douglas, 1994) que actuó como hospedador, la célula heterótrofa integró a la cianobacteria primitiva en su maquinaria celular, y como resultado de esta endosimbiosis inicial, y posiblemente posteriores, se formaron los plastos. Este origen evolutivo viene apoyado por evidencias genéticas y similitudes ultra-estructurales encontradas entre plastos y cianobacterias.

Para las cianobacterias, al igual que en algas verdes, el nitrógeno supone una fuente nutricional básica para la formación de biomasa y su metabolismo. Pueden obtener nitrógeno empleando  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$  como fuente nitrogenada (Markou et al., 2014a). Sin embargo, y a diferencia de las microalgas, algunas cianobacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) directamente de la atmósfera (Heimann y Cirés, 2015). Esta función la realizan a través de estructuras diferenciadas y especializadas llamadas heterocistes, encontrados en las cianobacterias filamentosas. Aun así, también se han documentado casos de cianobacterias no formadoras de filamentos con capacidad fijadora de  $\text{N}_2$  (Chorus y Bartram, 1999).

Los pigmentos empleados en la captación de luz y realización de la fotosíntesis son principalmente clorofilas a contenidas en los tilacoides. El color azulado característico de estos organismos es debido a la presencia de ficobiliproteínas (ficoeritrinas y ficocianinas) (Richmond, 2004) y también pueden contener carotenoides (Chorus y Bartram, 1999).

### 1.1.3. Estructura y composición: pared celular

#### 1.1.3.1. Microalgas

Las microalgas están recubiertas por una estructura semi-rígida denominada pared celular. Esta pared actúa como barrera física del alga frente a agentes externos. Se han descrito algunos taxones que presentan paredes con características estructurales y bioquímicas semejantes a las encontradas en algunas plantas terrestres (Sørensen et al., 2010). Por ejemplo, el componente estructural mayoritario en la pared celular de las plantas superiores es la celulosa, sin embargo solo algunas algas verdes presentan un contenido en celulosa similar (Bohutskyi y Bouwer, 2013). Otra diferencia característica de la pared celular de las plantas superiores y las microalgas es el contenido en lignina, un polímero altamente recalcitrante, que está en baja concentración o no existe en la pared celular de las microalgas. Existe gran diversidad morfológica en las paredes celulares de las algas verdes, pudiéndose encontrar desde individuos cuyas paredes están formadas por múltiples capas intrincadas, cubiertas de glicoproteínas cristalinas o paredes celulares cubiertas por varias capas fibrilares (Domozych et al., 2012).

En el género *Chlorella*, así como en otros géneros tales como *Scenedesmus*, se pueden encontrar especies con una pared compuesta de polisacáridos complejos cuya composición es especie-específica (Takeda, 1996). Se pueden también encontrar especies que presentan una pared celular recubierta por una capa exterior altamente resistente que consiste en un polímero alifático llamado “algaenan” (Afi et al., 1996; Cheng et al., 2011; Domozych et al., 2012). Las microalgas productoras de este tipo de polímero presentan una pared celular compuesta por una membrana de estructura trilaminar o TLS (trilaminar sheaths) (Gelin et al., 1999) que bajo microscopía electrónica de transmisión (TEM) presenta dos subcapas electrón-densas entre las cuales se intercala una capa de baja densidad. Sin embargo, se ha observado que la presencia de pared celular con estructura TLS y la producción de este polímero no están necesariamente relacionadas (Allard y Templier, 2000). De modo similar al “algaenan”, otro biopolímero que confiere gran fortaleza a la pared celular es la “esporopolenina”. Este polímero se ha detectado en algunas *Chlorophytas*, entre las que se encuentran *Chlorella* y *Scenedesmus* (Afi et al., 1996; Atkinson et al., 1972; Burczyk y Dworzanski, 1988). La fortaleza de las paredes celulares con presencia de estos polímeros convierte a las microalgas en microorganismos altamente resistentes

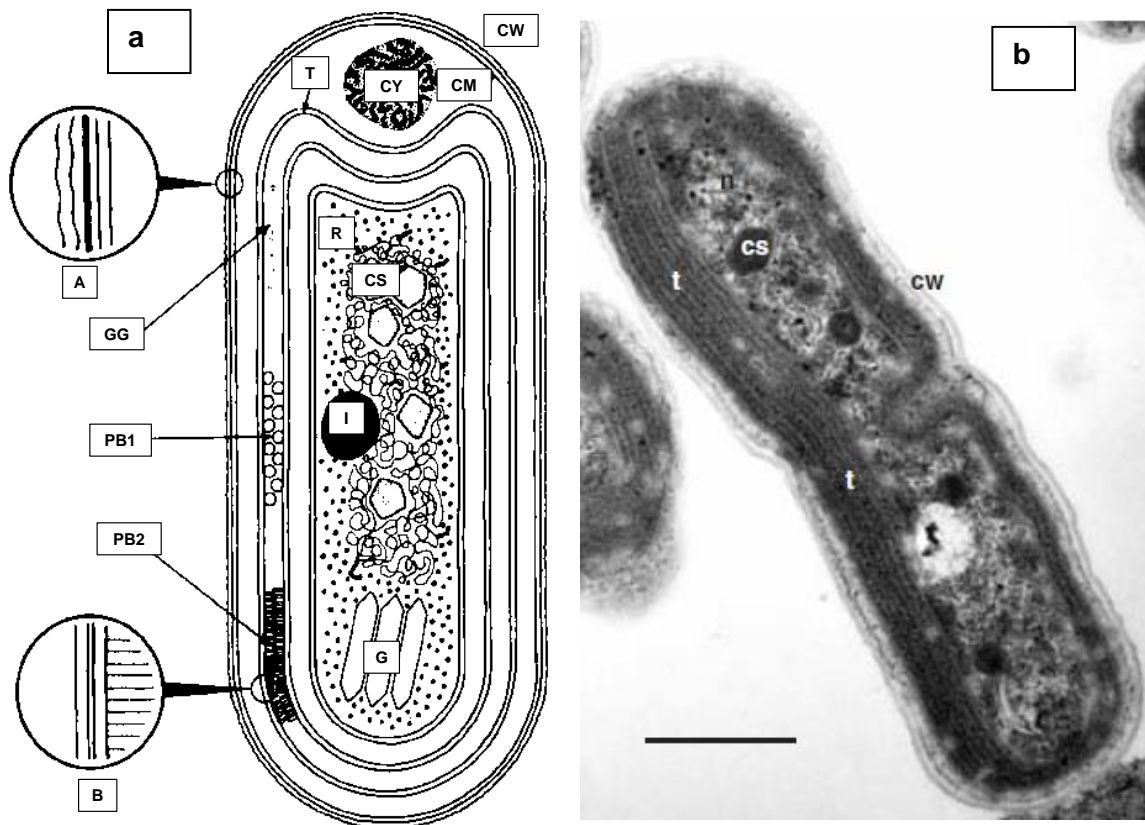
a la ruptura física y degradación bacteriana. Algunas especies que presentan estos polímeros son *S. acutus* (Couderchet et al., 1996) *S. obliquus* (Burczyk y Dworzanski, 1988; González-Fernández et al., 2012a) y algunas especies de *Chlorella* como *C. pyrenoidosa* (Rosen et al., 1985), *C. fusca* (Burczyk y Hesse, 1981) o *C. emersonii* (Afi et al., 1996). Sin embargo, también se han encontrado microalgas con paredes celulares más lábiles. Por ejemplo, en el conjunto *Chlamydomonas-Volvox*, la pared celular está compuesta principalmente por glicoproteínas de estructura cristalina ricas en hidroxiprolina (HRPGs) (Umen, 2014).

### 1.1.3.2. Cianobacterias

Las cianobacterias están cubiertas por una pared celular que consiste en varias capas formadas por peptidoglicano y lipopolisacáridos (Richmond, 2004) bajo la cual se encuentra la membrana plasmática. Su pared celular presenta la configuración típica de las bacterias Gram-negativas, aunque algunos estudios sostienen que, a pesar de la similitud con esta estructura, las cianobacterias poseen una capa de peptidoglicano más gruesa que las encontradas en bacterias Gram-negativas (Hoiczky y Hansel, 2000). Al tratarse de células procariotas, sus estructuras celulares no están organizadas en organelas, de modo que su material genético al igual que los ribosomas, se encuentra libre en el citoplasma.

El proceso fotosintético en las cianobacterias es igual que el que presentan las microalgas eucariotas, descrito anteriormente. En el caso de las cianobacterias, los tilacoides no se encuentran dentro de organelas especializadas para la realización de la fotosíntesis ya que son organismos procariotas; en este caso se encuentran localizados en las membranas. Cada tilacoide está formado por dos unidades de membranas donde se localizan los fotosistemas I y II, LHC, citocromos y ATP-sintasa (Richmond, 2004; Stanier, 1988).

## 1. Introducción



**Figura 1.4.** (a) Diagrama esquemático de una sección de cianobacteria: CM, Membrana celular; T, tilacoide; PB1 y PB2, vista anterior y posterior de ficobilisomas adyacentes a los tilacoides; GG, gránulos de glucógeno; CY, gránulo de cianoficina; P, gránulo de polifosfato; C, carboxisoma; R, ribosomas; G, vesículas de gas. (A) Vista agrandada de la cubierta celular mostrando la membrana exterior y capas de peptidoglicano y la membrana citoplásmica. (B) Vista agrandada de parte del tilacoide mostrando los ficobilisomas adheridos a su pared lateral. (Extraído de Stanier, 1988). (b) Micrografía electrónica de una célula en división de *Synechococcus* sp. en sección longitudinal (Extraído de Richmond, 2004).

Las cianobacterias presentan diversos tipos de inclusiones en su citoplasma para el almacenamiento de material de reserva. Algunos de ellos son los gránulos de glucógeno (unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídico), polisacárido de reserva energética de estructura parecida al almidón. También presentan carboxisomas, que contienen ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCo), encargada de la fijación de carbono, gránulos de cianoficina y gránulos de polifosfato, entre otros (Figura 1.4).

### 1.1.4. Cultivo y asimilación de nutrientes

La producción y aprovechamiento de microalgas y cianobacterias se considera una prometedora fuente de bioenergía renovable. Dadas las características biológicas de estos microorganismos, su cultivo presenta una serie de ventajas en comparación con las plantas terrestres, como es el hecho de que no compiten por el uso de tierras de cultivo.

En el cultivo de biomasa microalgal se busca la optimización de los parámetros de producción para conseguir un máximo rendimiento de la actividad fotosintética y, por tanto, una máxima productividad de biomasa. Las microalgas se cultivan en sistemas biológicos denominados fotobiorreactores (FBR). Para el diseño de un FBR se han de considerar factores tales como el tipo de irradiación que recibirá el cultivo, el tipo de agitación, el suministro de corrientes gaseosas (como por ejemplo el aporte de CO<sub>2</sub>), la desgasificación de los sistemas y otros parámetros medioambientales tales como la temperatura, la pluviometría de la zona, etc. Además, para seleccionar el FBR a utilizar para cultivar microalgas es crucial tener en cuenta el uso posterior de la biomasa generada. En este sentido, hay que tener en cuenta el valor del producto que se va a obtener, el capital inmovilizado y los costes de operación del sistema para poder así seleccionar el FBR más adecuado para cada aplicación.

Los FBR se clasifican en reactores abiertos y cerrados. Los reactores abiertos a la atmósfera presentan requerimientos económicos más bajos, a la vez que un control menor del cultivo mientras que en los FBR cerrados se consiguen unas condiciones más controladas que permiten mayores tasas de crecimiento microalgal a cambio de un incremento del coste (Hannon et al., 2010; Ugwu et al., 2008). Dentro de cada clasificación, se pueden encontrar diversas configuraciones (Figura 1.5):

- Fotobiorreactores abiertos (raceways, open-ponds):

En este tipo de configuración, el cultivo está en contacto directo con la atmósfera. Este tipo de FBR se encuentra sometidos a las condiciones climatológicas que se den en la zona y se encuentran expuestos a contaminaciones ambientales. Esta exposición a contaminantes genera limitaciones en cuanto al tipo de alga a cultivar. Debido a la posible contaminación del sistema con algas autóctonas o la prevalencia de ciertas especies bajo determinadas condiciones operacionales, en los

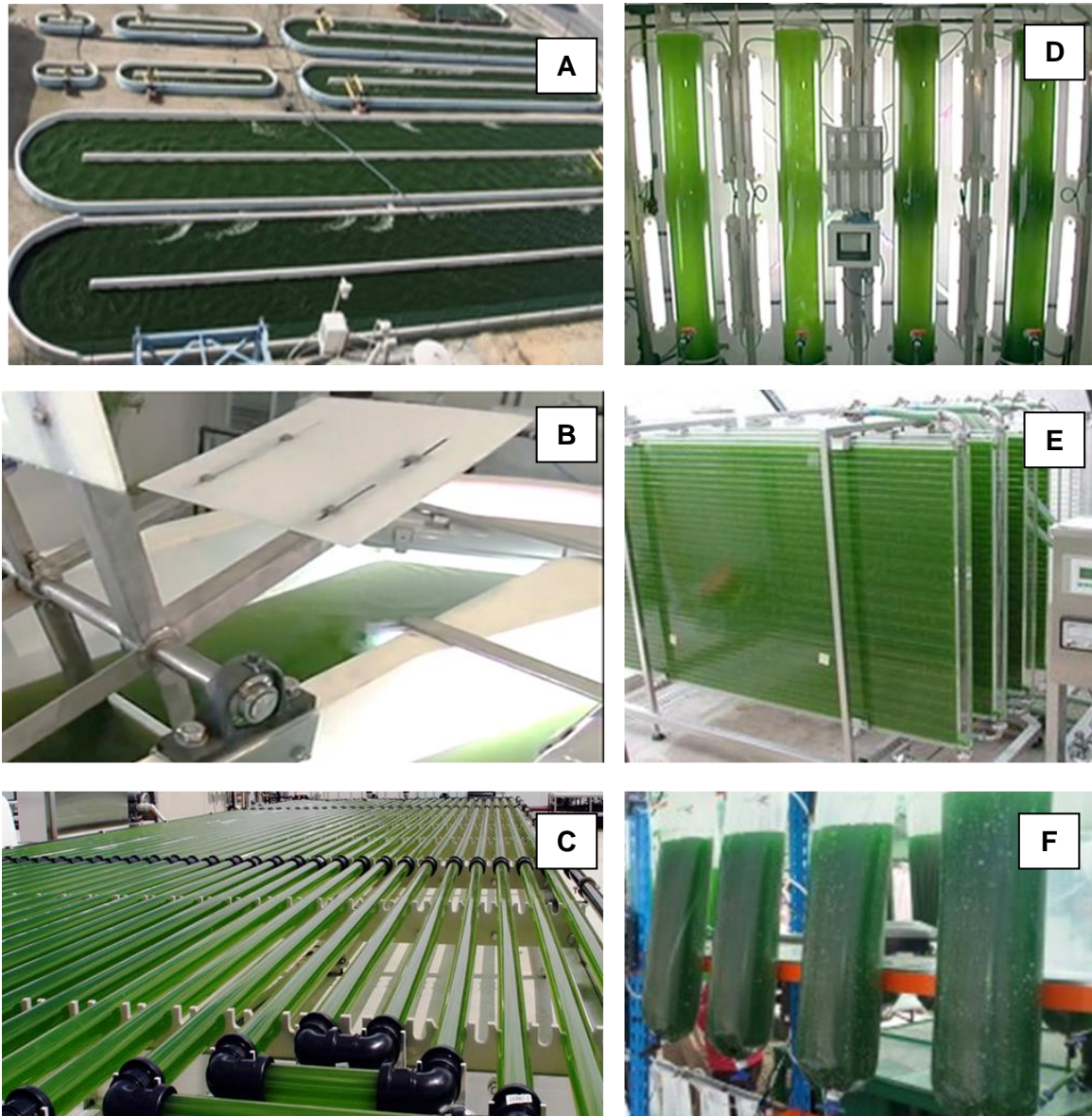
sistemas abiertos es prácticamente imposible cultivar una única especie de microalga ya que siempre hay intercambio con el ambiente (Posadas et al., 2014). Este tipo de reactores se diseñan con una altura de la capa de agua reducida (20-30 cm aproximadamente, (Cai et al., 2013; Wang et al., 2015)) para favorecer el paso de luz al cultivo, por lo que requieren mayores áreas para su construcción. Como consecuencia, estos sistemas de cultivo resultan en bajas densidades de biomasa. Sin embargo, suelen ser los más empleados para grandes producciones dados sus bajos costes de construcción, operación, mantenimiento y requerimientos energéticos (Brennan y Owende, 2010) para la agitación, que habitualmente se realiza mediante sistema de paletas (en el caso de los raceways).

- Fotobiorreactores cerrados (columnas tubulares, paneles, etc.):

En esta configuración, los parámetros operacionales en el reactor (iluminación, temperatura, pH, etc.), pueden establecerse según los requerimientos deseados por el operador, de modo que permiten mayor control sobre las condiciones de esterilidad y condiciones óptimas para maximizar el crecimiento del cultivo. Este mayor control del cultivo se traduce en sistemas con mayor productividad de biomasa. Sin embargo, el empleo de estos FBR implica proveerlos de sistemas de recirculación, sistemas de suministro de luz, dispositivos para el control de temperatura y pH, así como materiales de construcción adecuados, incrementando los costes asociados a este tipo de reactores con respecto a los sistemas abiertos (Brennan y Owende, 2010; Carvalho et al., 2006; Ugwu et al., 2008).

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se emplearon reactores abiertos con agitación por burbujeo bajo condiciones de iluminación constante para la producción de biomasa microalgal. El cultivo de microalgas se realizó en FBR de 50 L para la producción de mayores volúmenes de biomasa en los ensayos de digestión anaerobia, y se emplearon reactores de 0,5 L para el análisis del crecimiento en batch y semi-continuo de microalgas y cianobacterias.

## 1. Introducción



**Figura 1.5.** Diversas configuraciones de FBRs para el cultivo de microalgas. Sistemas abiertos: (A) tipo raceway (Seambiotic Algae plant, Israel), (B) sistema de agitación por paletas en raceway (IMDEA Energía, España). Sistemas cerrados: (C) FBR tubular (AlgaePARC, Wageningen), (D) FBR en columnas (IMDEA Energía, España), (E) FBR en paneles (Fuente: "Overview of Algal Biofuel Supply Chain," 2012) y (F) FBR en bolsas (ETSIA, UPM).

## 1. Introducción

---

Respecto a los requerimientos necesarios para establecer un cultivo de microalgas, se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

- Luz. Es el nutriente fundamental que proporciona energía a las microalgas para que, mediante el proceso fotosintético, puedan llevar a cabo la generación de ATP y poder reductor necesario para la fijación de CO<sub>2</sub> y formación de nueva biomasa. Es importante tener en cuenta que la luz es siempre el nutriente limitante en un fotobiorreactor bien diseñado, ya que a medida que la concentración de biomasa aumenta en el cultivo, es más difícil hacerla penetrar en su interior (Chen et al., 2011), pudiendo verse afectada la productividad de la biomasa. También se pueden dar procesos de fotoinhibición en un cultivo cuando este se encuentra bajo condiciones de saturación de luz (más luz de la que pueden usar para la fotosíntesis) (Se-Kwon, 2015).

- Temperatura. El empleo de temperaturas bajas en el sistema de cultivo implica una disminución del metabolismo (Richmond, 2004), mientras que el incremento en la temperatura aumenta el crecimiento hasta alcanzar una temperatura límite en la que se establece el óptimo de crecimiento, que una vez superada provocaría la inhibición del cultivo (Soeder et al., 1985). La temperatura afecta la tasa fotosintética puesto que, tanto las membranas celulares como la actividad de las enzimas implicadas, pueden verse comprometidas si la temperatura se encuentra fuera de sus rangos óptimos (Varshney et al., 2015). En el caso de las *Chlorophyta*, dado que se trata de un grupo muy amplio con gran variabilidad de organismos, las temperaturas óptimas para el crecimiento de las microalgas varían según la especie de la que se trate, estableciendo un rango general de 0-50 °C (Varshney et al., 2015). Algunas especies son capaces de vivir en temperaturas de hasta 50 °C como es el caso *Chlorella kessleri* o *Scenedesmus obliquus* (de Morais y Costa, 2007) y otras se desarrollan sin problemas por debajo de 20 °C, como *Chlamydomonas nivalis* (Remias et al., 2005).

- pH. Este factor influye sobre el crecimiento y metabolismo de las microalgas y la biosíntesis de metabolitos secundarios. Un ejemplo de ello es la producción de β-caroteno y vitamina E en *Dunaliella bardawil* y *Chlorella ellipsoidea*, que están influenciados por variaciones del pH en el medio (Khalil et al., 2010). En general el rango de pH para el crecimiento está entre 7-8, aunque tienen su crecimiento óptimo a

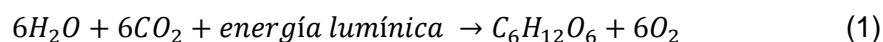
## 1. Introducción

---

un pH determinado que se considera especie-dependiente, y no necesariamente está dentro de estos límites. Por ejemplo, *Chlamydomonas applanata* tiene la capacidad de crecer en un rango de pH de 3.4-8.4 (Visviki y Santikul, 2000). Además, el pH del medio de cultivo también afecta a las distintas especies de carbono inorgánico ( $H_2CO_3+CO_{2(aq)}/HCO_3^-/CO_3^{2-}$ ), nitrógeno ( $NH_4^+/NH_3$ ) o fosfatos ( $H_3PO_4/H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}/PO_4^{3-}$ ) presentes en la solución de crecimiento (Markou et al., 2014a). Este hecho resulta relevante, dado que muchas microalgas tienen mayor o menor capacidad de asimilación de determinadas especies inorgánicas (Camiro-Vargas et al., 2005). De este modo, si la concentración de una determinada especie varía debido a su conversión en otra especie química mediada por una variación del pH, puede derivar en una menor o mayor asimilación por parte de la microalga y traducirse en menor o mayor crecimiento (Camiro-Vargas et al., 2005; Markou et al., 2014a).

- Nutrientes. Además de la luz, las microalgas requieren para su desarrollo de una serie de nutrientes (C, N, P, S, Fe,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ , etc.) esenciales para sintetizar metabolitos y componentes celulares, así como aumentar su biomasa y multiplicar sus células.

o  $CO_2$  (y otras fuentes de carbono). El componente mayoritario en las microalgas es el carbono. Su contenido puede variar en un rango de 17-65% (Bohutskyi y Bouwer, 2013; Grobbelaar, 2004) dependiendo de las especies, condiciones de cultivo y otros factores, aunque por lo general, se establece en torno al 50%. El metabolismo más frecuente en las microalgas es el autótrofo y por tanto, estos microorganismos emplean carbono inorgánico, principalmente en forma de  $CO_2$ . La reacción de fotosíntesis, por la que los organismos fotoautótrofos forman materia orgánica a partir de la fijación de  $CO_2$ , puede expresarse con la siguiente fórmula:



En general, para la formación de 1 g de biomasa microalgal se necesitan entre 1,6-2 g  $CO_2$ , estando el teórico establecido en 1,83 (Cuellar-Bermudez et al., 2015; Rosenberg et al., 2011). Sin embargo, algunas especies también pueden presentar metabolismo heterótrofo, en condiciones de ausencia de luz, empleando carbono orgánico (como por ejemplo glucosa (Kim et al., 2013), glicerol, acetato (Heredia-Arroyo et al., 2010) o subproductos de la industria como melazas (Andrade y Costa,

## 1. Introducción

---

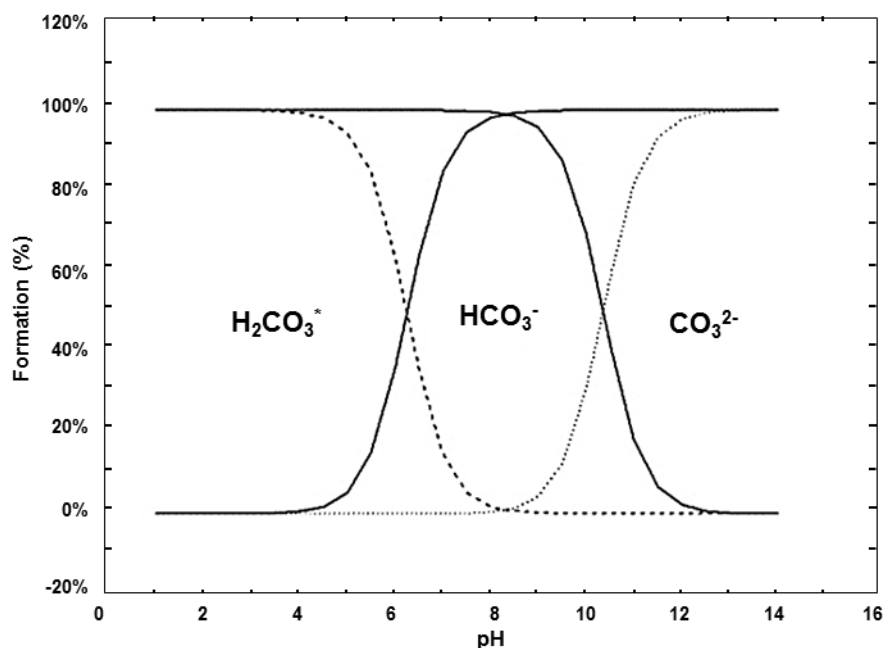
2007)). También algunas microalgas presentan metabolismo mixótrofo, es decir, combinan los mecanismos de autotrofia y heterotrofia utilizando fuentes de carbono orgánico e inorgánico.

La adición de  $\text{CO}_2$  en los cultivos de microalgas aumenta significativamente la producción de biomasa algal, ya que no solo se utiliza como fuente de carbono, sino como un reactivo químico que permite controlar el medio de cultivo. Como se ha mencionado con anterioridad, el  $\text{CO}_2$  disuelto en el medio líquido y combinado con las condiciones de pH, forma un sistema buffer bicarbonato-carbonato (Figura 1.6), donde dependiendo del pH, conviven tres especies inorgánicas que son en mayor o menor medida asimilables por las microalgas, dependiendo de la especie de la que se trate. Por ejemplo, *Rhodomonas* sp. asimila preferentemente  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_2$ , e *Isochrysis galbana*,  $\text{CO}_2$  (Camiro-Vargas et al., 2005). Durante la fotosíntesis, el pH del cultivo aumenta debido a la disminución de la concentración de  $\text{CO}_2$ , que es asimilado por las microalgas, y la acumulación de iones  $\text{OH}^-$  que se liberan de las especies carbonatadas ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). La variación de pH puede afectar negativamente al crecimiento de las microalgas debido a una disminución de la especie de carbono más fácilmente asimilable, junto con la disminución de otros nutrientes que también pueden verse afectados. Para corregir el aumento del pH se pueden emplear sistemas de inyección de  $\text{CO}_2$  mediante los cuales se acidifica el medio de cultivo (Carvalho et al., 2006).

○ *Fuente de nitrógeno.* El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales para el desarrollo de las microalgas, ya que supone aproximadamente entre el 1% y el 14% de su peso seco (Markou et al., 2014a). Se utiliza principalmente en la síntesis de proteínas y otros componentes celulares como ácidos nucleicos o pigmentos. Puede ser asimilado en distintas formas como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), preferentemente esta última (Hii et al., 2011; Perez-Garcia et al., 2011). La presencia de mayores o menores concentraciones de nitrógeno afecta notablemente la composición de las microalgas. Una limitación de la fuente de nitrógeno disponible en el medio de cultivo supone el uso de nitrógeno intracelular para llevar a cabo las funciones metabólicas, lo que suele generar una disminución del contenido proteico de la biomasa algal (Pancha et al., 2014). Sin embargo, una elevada concentración de nitrógeno (“total ammonia nitrogen” TAN) en el medio de cultivo puede tener efectos inhibitorios en el crecimiento (He et al., 2013; Markou et al., 2014b) Las concentraciones de nitrógeno que afectan

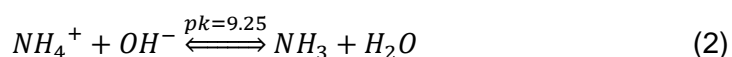
## 1. Introducción

el crecimiento son especie-dependiente, pudiendo variar según la microalga cultivada (Collos y Harrison, 2014)



**Figura 1.6.** Formación de las especies de carbono inorgánico. Fuente: Markou y Georgakakis, (2011)

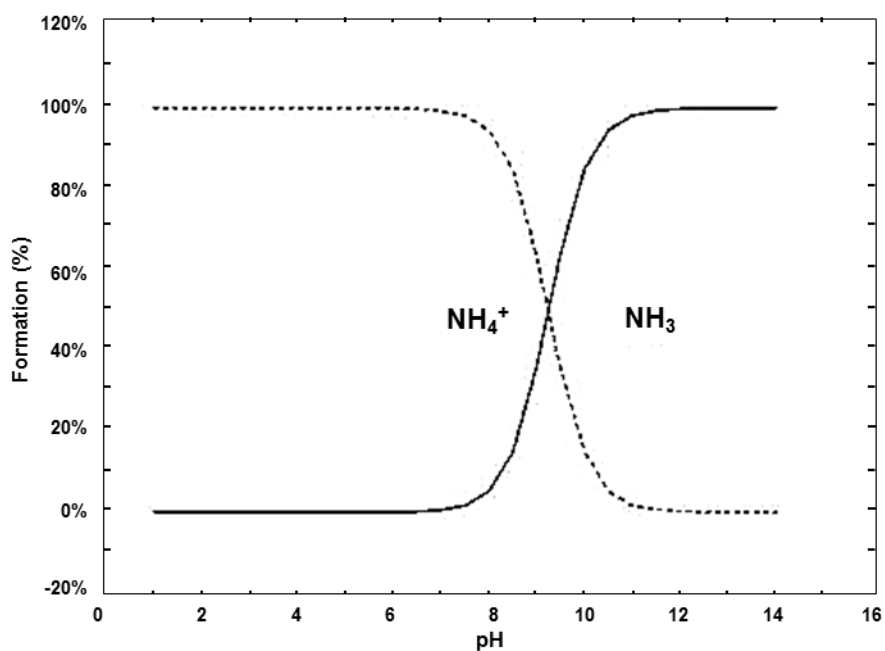
El pH también interviene en los procesos de asociados al equilibrio de especies inorgánicas nitrogenadas (Figura 1.7). Concretamente, el pH regula el equilibrio entre las concentraciones de  $NH_4^+$  y  $NH_3$  (Ec. 2). Este último compuesto nitrogenado es altamente inhibidor del crecimiento de las microalgas (Abeliovich y Azov, 1976). El nitrógeno amoniacal, a pesar de ser soluble en agua, es un compuesto altamente volátil por lo que, en situaciones en que el pH de un cultivo se eleva, el  $NH_4^+$  se desplaza hacia  $NH_3$ , lo que puede suponer la pérdida de nitrógeno del medio por volatilización (Cai et al., 2013). Este hecho es particularmente destacable en cultivos con aireación forzada (Jamieson et al., 2003).



La temperatura también juega un papel importante en el equilibrio  $NH_4^+/NH_3$  dado que afecta a su constante de disociación.

## 1. Introducción

---

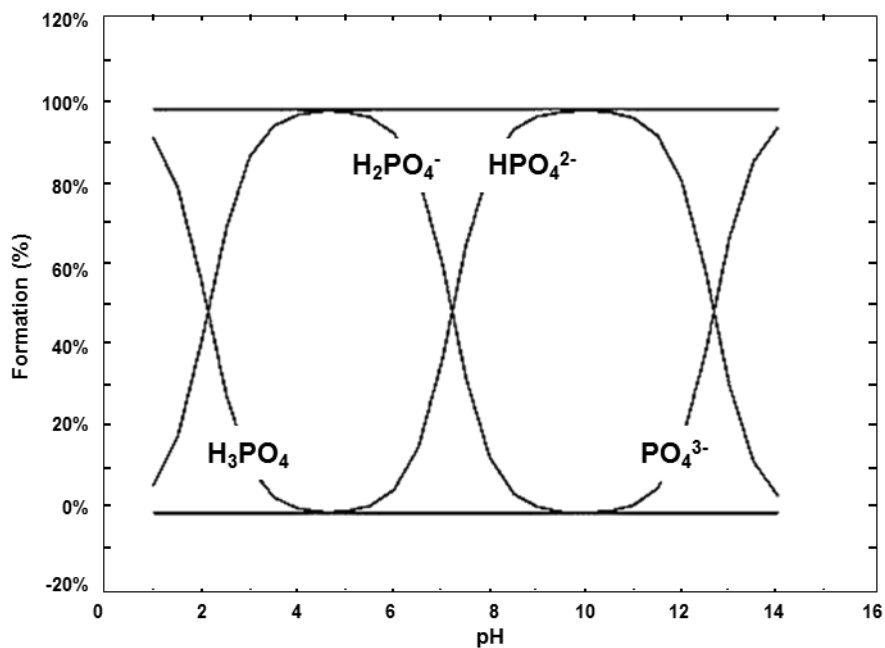


**Figura 1.7.** Formación de las especies de  $\text{NH}_4^+$ /  $\text{NH}_3$ . Fuente: Markou y Georgakakis, (2011)

○ *Fuente de fósforo.* El fósforo es el siguiente componente celular más importante en las microalgas puesto que forma parte de un gran número de moléculas imprescindibles para el metabolismo celular, tales como ácidos nucleicos, membranas celulares, fosfolípidos, ATP, NADPH, etc. El contenido en fósforo de la biomasa microalgal se encuentra en torno al 1% (Solovchenko et al., 2016). El fósforo es asimilado habitualmente en forma de ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), aunque también pueden emplearse otras formas inorgánicas que son transformadas a ortofosfato para una adecuada asimilación (Markou et al., 2014a). Su tasa de asimilación viene marcada por factores ambientales como la temperatura, el pH (Figura 1.8), o la disponibilidad de otros iones en el medio ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), que pueden influir en el transporte de fosfato al interior celular (Cembella et al., 1984; Correll, 1998). Las microalgas pueden acumular fósforo en exceso, proceso denominado “*luxury uptake*”, que hace referencia a la capacidad que poseen de acumular fósforo intracelular en forma de gránulos de reserva de polifosfato (Eixler et al., 2006), pudiendo almacenar hasta el 4% de fósforo en peso seco (Solovchenko et al., 2016). Estas reservas de fósforo pueden ser empleadas en situaciones de limitación de este nutriente en el medio (Powell et al., 2008).

## 1. Introducción

---



**Figura 1.8.** Formación de las especies de fosfato en función del pH. Fuente: Markou y Georgakakis, (2011)

○ *Otros nutrientes.* Además de los nutrientes mencionados previamente (C, N y P), existen otros elementos que, a pesar de no encontrarse de forma tan abundante en la célula, juegan un papel fundamental en las funciones metabólicas:

El potasio actúa como activador de numerosas enzimas que participan en la fotosíntesis y la respiración celular, interviene en la regulación osmótica y afecta la síntesis de carbohidratos y proteínas (Hopkins y Hüner, 2008).

El magnesio participa en procesos ATP dependientes para la fijación de  $CO_2$ , así como en la activación de determinadas enzimas y formando parte de las clorofilas (Black et al., 2007).

El azufre forma parte de aminoácidos, sulfo-lípidos, vitaminas y un elevado número de metabolitos secundarios, e interviene en procesos de fotosíntesis y fotoinhibición (Volgusheva et al., 2007).

El calcio forma parte de las paredes celulares y está involucrado en los procesos de división celular (Kylin y Das, 1967).

El hierro está asociado a procesos enzimáticos de asimilación de nitrógeno, transferencia de electrones y síntesis de metabolitos, ADN y ARN (Hopkins y Hüner, 2008).

### 1.1.5. Recolección

Una vez producida la biomasa algal es necesaria una etapa de cosecha o recolección, cuyo propósito es eliminar el agua y concentrar la biomasa para su posterior procesamiento. La etapa de recolección influye notablemente en los costos de producción, por lo que la selección de una técnica de cosechado eficiente y de bajo costo es trascendental. Para la recolección de la biomasa microalgal se pueden emplear diversos métodos y los más empleados se enumeran a continuación:

- Coagulación / floculación química. Estos métodos implican la manipulación de la biomasa, mediante el cambio de pH o la adición de coagulantes y floculantes al cultivo. La finalidad de este tratamiento es la aglomeración de las células en forma de agregados que posteriormente se recogen por sedimentación o flotación (Smith y Davis, 2012). Algunos de los reactivos químicos empleados son sulfatos, sales de aluminio o cloruro férrico (Vandamme et al., 2013). También se emplean compuestos orgánicos, como el quitosano o la poliacrilamida (PAM) (Banerjee et al., 2012). Puesto que los compuestos pueden actuar formando diferentes tipos de interacciones entre las superficies celulares, la eficiencia de floculación de estos compuestos químicos viene determinada por las características de la superficie de las microalgas, como son su carga neta y su hidrofobicidad (Vandamme et al., 2013). A pesar de tratarse de una técnica sencilla, los costes derivados del uso de productos químicos pueden ser un factor limitante para su utilización comercial, así como, en función del uso final de la biomasa obtenida, su potencial toxicidad.

- Autofloculación / biofloculación. Al igual que el método anterior, esta tecnología implica la aglomeración de células en agregados, sin embargo no se emplean compuestos químicos. El proceso puede ocurrir de forma natural cuando los cultivos de microalgas están expuestos a la luz solar, se suministra CO<sub>2</sub> o se producen cambios de pH (Smith y Davis, 2012). También se pueden dar procesos de autofloculación/biofloculación mediante la adición de otros microorganismos, como bacterias y hongos, o por la propia producción de exopolisacáridos (EPS) que actúan en la agregación de las paredes celulares (González-Fernández y Ballesteros, 2012a). Sin embargo, el principal inconveniente de la autofloculación es que las condiciones de proceso son difíciles de controlar y pueden afectar a la calidad de la biomasa (Barros et al., 2015). También pueden derivarse problemas de contaminación debido al

desplazamiento de la especie cultivada por otros microorganismos competidores (González-Fernández y Ballesteros, 2012a).

- Sedimentación. Esta técnica suele emplearse como paso posterior al proceso de coagulación / floculación. La sedimentación puede ser un proceso eficiente para la separación de distintas microalgas, dependiendo principalmente de su densidad y tamaño, aunque, este proceso puede requerir tiempos de sedimentación relativamente lentos ( $0,1-2,6 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ ) y provocar el deterioro de la biomasa (Christenson y Sims, 2011). El empleo de floculantes, en combinación con esta metodología puede aumentar la velocidad de sedimentación (Smith y Davis, 2012)

- Filtración. Este proceso también puede ser empleado solo o en combinación con los procesos descritos anteriormente. Consiste en la separación de la biomasa forzando el paso del medio líquido a través de una membrana cuyo tamaño de poro sea suficientemente pequeño para retener las células (Barros et al., 2015). La filtración es un proceso costoso y presenta algunos inconvenientes, como es el depósito de microalgas en la membrana, lo que provoca una reducción de la tasa de filtración y conlleva la limpieza o reemplazo de las membranas (Christenson y Sims, 2011). Esto incrementa los costes, el consumo de energía, y la necesidad de sustituciones frecuentes. Se han investigado distintos tipos de membrana para la recuperación de biomasa de microalgas, en base a distintos materiales, tamaño de poro y distintas configuraciones del proceso. Con el objetivo de mejorar la recuperación total de la biomasa la filtración se puede realizar en una o varias etapas (Bilad et al., 2014).

- Centrifugación. Es la técnica más rápida pero requiere grandes consumos energéticos y por tanto tiene costes económicos elevados. Este hecho limita su aplicación a procesos de recuperación de productos de alto valor añadido (Barros et al., 2015). Si se aplica el proceso después de emplear otros métodos, el consumo de energía disminuye dado que los volúmenes a procesar son menores.

### **1.1.6. Aplicaciones biotecnológicas**

En los últimos años, el empleo industrial de las microalgas ha ganado considerable atención dado su gran variedad de aplicaciones. Estas abarcan el sector de la alimentación humana, animal, cosmético, farmacéutico y nutracéutico. Debido a su composición nutricional, las microalgas pueden ser empleadas como complementos

## 1. Introducción

---

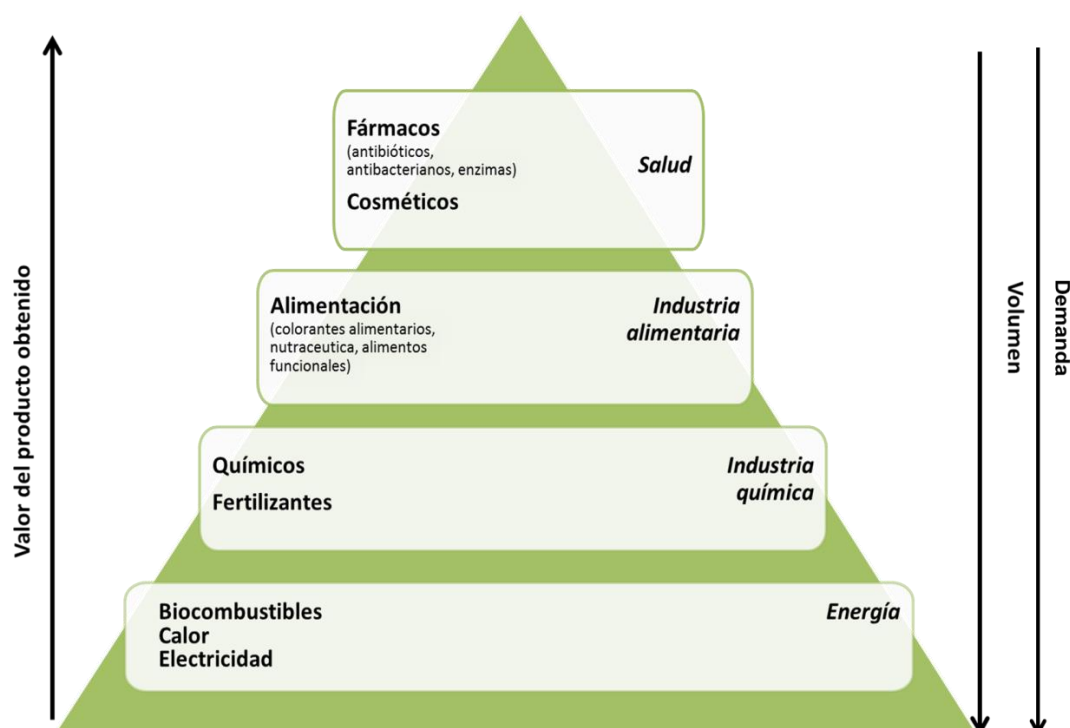
alimenticios, dado que son fuente de proteínas, polisacáridos, vitaminas y otros compuestos que pueden resultar beneficiosos a la salud humana o animal. Como ejemplo del uso de las microalgas en la alimentación, cabe destacar la producción de ácidos grasos Omega-3 poliinsaturados (PUFA), que presentan una amplia gama de efectos beneficiosos sobre la salud humana. Concretamente las microalgas contienen ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). El EPA interviene en la prevención de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias, diabetes o cáncer (C. Y. Chen et al., 2015). El DHA es un ácido graso que se localiza en los tejidos corporales y es el mayor ácido graso estructural de la materia gris cerebral (Kroes et al., 2003).

Las microalgas también pueden emplearse en los sectores energéticos y medioambientales. Más concretamente, estos microorganismos han mostrado su utilidad en aplicaciones de biorremediación de aguas residuales (Cho et al., 2011), mitigación de gases de efecto invernadero (Razzak et al., 2013), obtención de fertilizantes (Uysal et al., 2015), y producción de biocombustibles (Mata et al., 2010), entre otros. En el área de biorremediación de aguas, los procesos se basan en la recuperación de los compuestos contaminantes presentes en efluentes de tipo residual, dado que sirven de nutrientes para las microalgas (Cho et al., 2011; González-Fernández et al., 2016). Tanto la materia orgánica (moléculas sencillas), como los compuestos nitrogenados y fosfatados inorgánicos contenidos en las aguas residuales pueden ser asimilados por los microorganismos fotosintéticos, sirviendo como fuente de nutrientes para su crecimiento. De este modo, no sólo se eliminan contaminantes del medio sino que, de forma adicional, se genera biomasa, que puede ser empleada para diferentes propósitos. Existen numerosos estudios de aplicación de microalgas en sectores medioambientales como es la eliminación de nutrientes en aguas residuales urbanas (Posadas et al., 2014), en aguas derivadas de la ganadería (de Godos et al., 2009a), eliminación de metales pesados (Monteiro et al., 2009), antibióticos (J. Chen et al., 2015) e incluso se emplean para disminuir la concentración de CO<sub>2</sub> en corrientes gaseosas (Douskova et al., 2009; Muñoz y Guieysse, 2006).

En cuanto a las aplicaciones energéticas, el estudio de las microalgas como sustrato sostenible para la producción de biocombustibles y energía, está cobrando gran relevancia. Este interés viene marcado por diversas causas, tales como la disminución de las reservas naturales de combustibles fósiles y el aumento de los

## 1. Introducción

gases de efecto invernadero (GEI). De hecho la Directiva 2009/28/Ce Del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de abril de 2009, ha establecido un compromiso por parte de los países europeos de establecer medidas para alcanzar, en el año 2020, una contribución de las energías renovables del 20% como mínimo de energía procedente de fuentes renovables en el consumo final bruto de energía y un 10% de la energía en el sector del transporte. Los biocombustibles son productos que se necesitan en grandes cantidades y, para que puedan ser una alternativa a los combustibles fósiles, se ha de conseguir que sus costes sean semejantes.



**Figura 1.9.** Representación de las áreas de aplicación de las microalgas

En el área de los biocombustibles, históricamente la investigación relacionada con las microalgas se ha centrado en la producción de biodiesel. El biodiesel es un combustible biodegradable con bajas emisiones de CO<sub>2</sub> (Gouveia y Oliveira, 2009), compuesto por esteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de triglicéridos. Existen diversas especies de microalgas que acumulan elevados niveles de lípidos, por lo general en forma de glicerolípidos no polares tales como triacilglicerol (TAG) (Day et al., 2012). Algunos de los géneros empleados en la producción de biodiesel son *Botryococcus*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella* y

## 1. Introducción

---

*Nannochloropsis* (Ho et al., 2014). No obstante, la producción de biodiesel a partir de microalgas presenta ciertas limitaciones. La mayoría de las especies incrementan su contenido en lípidos bajo ciertas condiciones limitantes para su cultivo (Ji et al., 2013; Přebyl et al., 2013). En estas condiciones, los microorganismos disminuyen la tasa de crecimiento, resultando en bajas producciones de biomasa (Rodolfi et al., 2009). Otro inconveniente frecuentemente mencionado en la producción de biodiesel a partir de microalgas es que, para una eficiente extracción de lípidos, se requiere el secado previo del material, incrementando los costes del proceso (Sialve et al., 2009). Algunas investigaciones recientes están desarrollando procesos para extraer los lípidos en biomasa húmeda, aunque las eficiencias de la extracción disminuyen (Wahlen et al., 2011).

También es posible producir bioetanol a partir de las microalgas. El bioetanol es un biocombustible líquido, que se puede obtener a partir de diferentes biomásas (azucaradas, amiláceas, lignocelulósicas, macro y microalgas). De modo similar al biodiesel, cuya producción está basada en los lípidos, la producción de etanol se basa en la transformación de los carbohidratos. Algunas especies de microalgas pueden presentar altas cantidades de carbohidratos, principalmente localizados intracelularmente (en forma de almidón como reserva de energía) o en la pared celular. La mayoría de las paredes celulares de las microalgas no presentan lignina (polímero estructural presente en materiales lignocelulósicos que dificulta el ataque enzimático a los carbohidratos), lo cual es beneficioso para el proceso de producción de bioetanol a partir de los carbohidratos estructurales de la microalgas. Algunos estudios apuntan a microalgas del género *Scenedesmus*, *Chlorella* o *Chlamydomonas* como los microorganismos fotosintéticos con mayor capacidad de acumular carbohidratos (Ho et al., 2013, 2014; Kim et al., 2006). Sin embargo, la producción de bioetanol a partir de microalgas también presenta ciertas limitaciones. Como se ha mencionado anteriormente, el bioetanol es producido a partir de los carbohidratos que, una vez transformados en azúcares simples, son fermentados por las levaduras o bacterias etanolgénicas. Sin embargo, no todos los azúcares son susceptibles de ser metabolizados por las levaduras convencionales (Boles y Hollenberg, 1997). La composición de azúcares que presenta la biomasa de las microalgas es especie dependiente (Lam y Lee, 2015), limitando de este modo las especies que pueden ser empleadas para la producción de etanol. Por ejemplo, *Nannochloropsis oculata* contiene un 8% de carbohidratos, de los cuales el 68% es glucosa (Brown, 1991),

## 1. Introducción

---

mientras que *Chlorococcum humicola*, contiene 32% de carbohidratos totales, siendo el 9,5 % correspondiente a xilosa (Harun y Danquah, 2011). El microorganismo empleado de forma convencional en procesos de producción de etanol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que metaboliza monómeros de glucosa principalmente, así como fructosa, manosa o galactosa pero no es capaz de fermentar las pentosas (Boles y Hollenberg, 1997). Para lograr una acumulación mayor de carbohidratos se pueden modificar los parámetros de cultivo (González-Fernández y Ballesteros, 2012b) limitando la disponibilidad de nutrientes, pero como se ha mencionado anteriormente, tienen como desventaja que esta limitación de nutrientes ralentiza el crecimiento del cultivo de microalgas.

La producción de hidrógeno mediante procesos biológicos es también otra alternativa para obtener biocombustibles (Show y Lee, 2014) a partir de biomasa algal. El biohidrógeno, puede ser producido por distintas vías como son la biofotólisis (directa o indirecta), fotofermentación o fermentación oscura. Algunos géneros investigados con este objetivo son *Chlamydomonas*, *Anabaena*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis* o *Scenedesmus* (Batista et al., 2014; Nobre et al., 2013). Algunos de los problemas asociados a la generación de biohidrógeno son sus bajas tasas de producción, así como posibles acumulaciones de metabolitos intermedios que pueden inhibir el proceso (Chandrasekhar et al., 2015).

Otra vía para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas es la producción de biogás. Esta se realiza a través de un proceso de digestión anaerobia mediante la degradación microbiana de la materia orgánica, cuyo resultado final es la obtención de un gas con un elevado contenido en  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . A diferencia de los procesos destinados a la obtención de biodiesel o bioetanol, en los cuales el sustrato principal son los lípidos o los carbohidratos respectivamente, en la digestión anaerobia se transforman en  $\text{CH}_4$  todos los componentes macromoleculares de la célula, es decir lípidos, proteínas y carbohidratos (Angelidaki y Sanders, 2004). Este hecho simplifica el proceso puesto que evita procesos de extracción de macromoléculas. A su vez, los procesos de biodegradabilidad no requieren que la biomasa se encuentre seca ni altamente concentrada y, por tanto, no se necesita incluir una etapa de secado como ocurre en la producción de otras formas energéticas (Chisti, 2007).

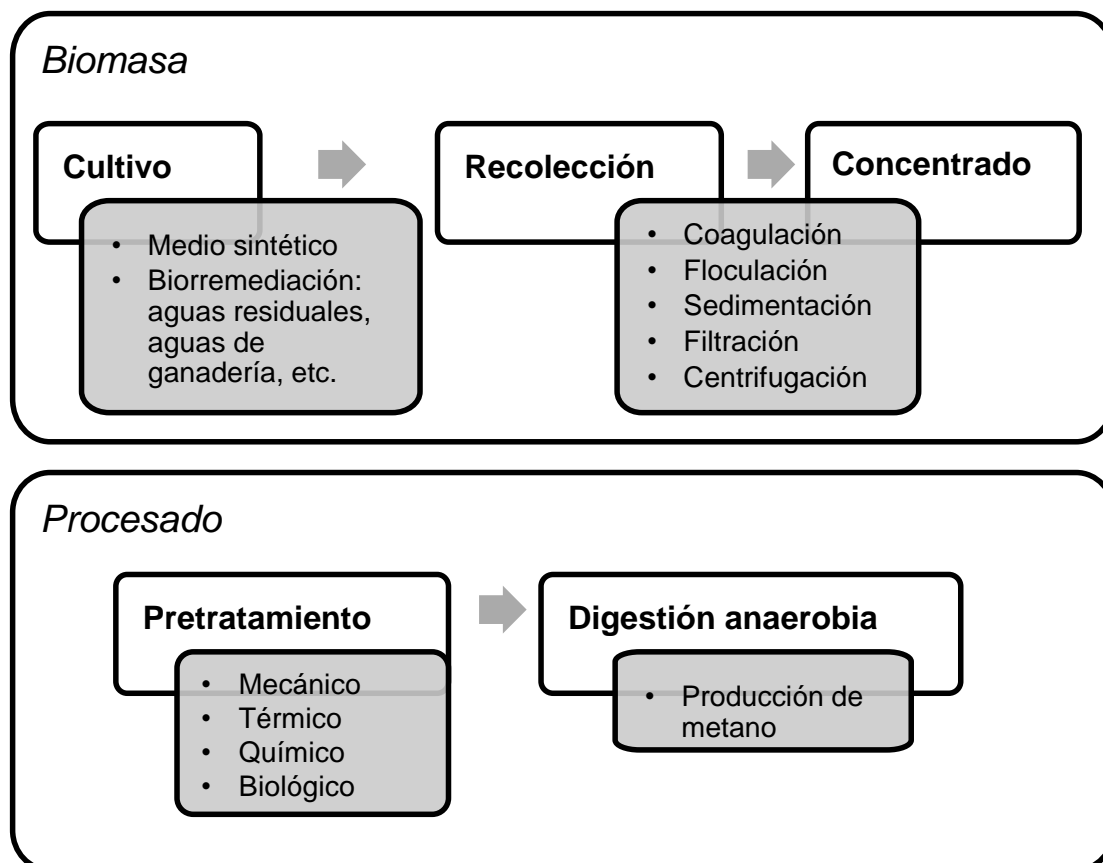
### 1.1.6.1. Biocombustibles y bioproductos a partir de microalgas

La idea de utilizar biomasa de microalgas cultivadas para la obtención de biocombustibles como alternativa a los cultivos energéticos terrestres, ha resurgido con fuerza en los últimos años, salvando el obstáculo de la competencia con los alimentos por el terreno cultivable. El concepto de la utilización de las microalgas para la producción de biocombustibles ha ido evolucionando hacia el desarrollo de tecnologías más avanzadas que permitan obtener, a partir de la biomasa algal, una variedad de combustibles, productos químicos y energía desarrollando el concepto de biorrefinería. Este término describe la producción de biocombustibles y energía y de co-productos de alto valor añadido a partir de biomasa, basándose en la integración de diversas tecnologías de bajo impacto ambiental para su procesamiento (Suganya et al., 2016). Las futuras biorrefinerías constituyen la vía más prometedora para la creación de una nueva industria basada en la utilización de la biomasa para la obtención de alimentos, piensos seguros y sanos, materiales para la industria química, energía y otros productos. En la actualidad, la producción de biocombustibles de tercera generación a partir de biomasa, cuya producción que sea económicamente factible, está muy relacionada con el concepto de biorefinería. De este modo, el coste económico asociado a la producción y transformación de la biomasa algal, no solo recaerá en la producción de biocombustibles, sino también en la obtención de otros productos de mayor valor añadido (Figura 1.9), aumentando su viabilidad económica.

No obstante, el coste de producción de la biomasa algal debe mantenerse lo más bajo posible para que los biocombustibles procedentes de microalgas sean una realidad. En este aspecto, una alternativa que permitiría reducir los costes sería el cultivo de microalgas en sistemas baratos que utilicen aguas residuales ricas en nutrientes. De este modo, se han realizado numerosas investigaciones en las cuales se emplean medios de cultivo baratos, como son las aguas residuales (urbanas, ganaderas etc, (Molinuevo-Salces et al., 2016; Morales-Amaral et al., 2015; L. Wang et al., 2010)) para crecer dicha biomasa. Este tipo de cultivo, no solo supone la producción de biomasa algal, sino que también disminuye la concentración de contaminantes del agua residual debido a la capacidad de asimilación de dichos contaminantes por parte de las microalgas que lo emplean como nutrientes. El exceso de nutrientes (nitrógeno y fosforo) en las aguas residuales causa procesos de eutrofización, provocando graves problemas ambientales (Cai et al., 2013). De este

## 1. Introducción

modo, el cultivo de microalgas se podría integrar en procesos de depuración de aguas, contribuyendo a la disminución de estos contaminantes a la vez que se genera biomasa que puede ser revalorizada posteriormente. Este proceso es denominado “biorremediación”.



**Figura 1. 10.** Esquema las etapas de producción y procesado de microalgas para la generación de biogás.

Según el tipo de agua empleada, la concentración de nutrientes puede variar considerablemente y es necesario realizar una adecuada dosificación para formular un medio de cultivo adecuado. En el caso de los efluentes ganaderos (purines de cerdo, por ejemplo), la concentración de nitrógeno amoniacal total es de aproximadamente 1, 3-2,5 g·L<sup>-1</sup> (González et al., 2008; Molinuevo-Salces et al., 2012) y, para evitar inhibición del crecimiento de las microalgas, debe diluirse, para poder utilizarlo como medio de cultivo. Molinuevo-Salces et al. (2016) estudiaron el crecimiento de una población mixta de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y

## 1. Introducción

---

*Chlamydomonas reinhardtii*) empleando purines ganaderos diluidos a diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  (80 y  $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en distintas condiciones de temperatura y fotoperiodo. En su estudio, la eliminación de nutrientes fue efectiva en ambas condiciones (96-99% eliminación), siendo el cultivo realizado a mayor concentración de  $\text{NH}_4^+$  inicial el que produjo una mayor concentración de biomasa. Cañizares y Domínguez (1993) cultivaron *Spirulina máxima* con purines estabilizados mediante aireación ( $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ ), empleando diferentes diluciones y consiguieron crecimiento en todas las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  empleadas. Sin embargo, las tasas de eliminación fueron mayores cuando se empleó medio diluido al 50%, consiguiéndose eliminar el 75% del  $\text{N-NH}_4^+$ , el 53% del fósforo total, y el 98% del ortofosfato.

También se han publicado diversos estudios sobre el uso de aguas residuales urbanas como medio de cultivo. Ramos Tercero et al. (2014) cultivaron *Chlorella protothecoides* en agua residual urbana. Se utilizaron aguas de diferentes plantas de tratamiento, tras el tratamiento primario y salida del secundario, tanto en batch como en continuo. En todos los casos se obtuvieron eliminaciones de nutrientes entre el 90-95% de  $\text{N-NH}_4^+$  y 50-70% de  $\text{P-PO}_4^{3-}$ . En el tratamiento en continuo la mayor concentración de biomasa se alcanzó empleando el tiempo de retención hidráulica (TRH) más alto (2 días). Sin embargo, la mayor productividad se obtuvo a TRH más bajos (0.8 días), debido a que a menores TRH la concentración celular es menor y por tanto permite una mayor penetración de luz.

Posadas et al. (2013) evaluaron el crecimiento en biopelícula de un consorcio de microalgas-bacterias heterótrofas, que emplean el  $\text{O}_2$  generado por las microalgas para oxidar los compuestos orgánicos y los nutrientes presentes en efluentes de agua residual doméstica. Lo compararon con los resultados de una biopelícula exclusivamente bacteriana, empleando TRH de 10, 5 y 3 días. Los resultados mostraron una mayor eliminación en el FBR empleando el consorcio microalgas-bacterias, siendo las eliminaciones de carbono, nitrógeno y fósforo de 91, 70 y 85%, para unas concentraciones iniciales de 281, 91 y  $7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente, a un TRH de 10 días. Posteriormente, compararon el crecimiento en biopelícula en fotobiorreactores (FBR) abierto y tubular cerrado (Posadas et al., 2014) empleando TRH de 10, 7 y 5 días. Las máximas eliminaciones obtenidas fueron de 89 y 85% en carbono, 92 y 80% en nitrógeno y 96 y 68% en fósforo, para los FBR abierto y cerrado,

## 1. Introducción

---

respectivamente, a un TRH de 10 días. Las mayores eficiencias encontradas en el fotobiorreactor abierto fueron atribuidas, en el caso del nitrógeno, a una mayor eliminación (probablemente mediada por stripping amoniacal), siendo un 56% el nitrógeno asimilado. En el reactor cerrado, la asimilación por parte de las microalgas seguida del proceso de nitrificación fueron los mecanismos responsables de la eliminación, ya que la configuración de este tipo de reactor evita pérdidas por volatilización (de Godos et al., 2009b). Las diferentes eficiencias de eliminación de nutrientes encontradas para los dos estudios en mismas condiciones de operación podrían ser debidas a la diferente actividad y producción de biomasa de microalgas en cada uno de ellos. La productividad obtenida fue de  $2 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  mostrando una eficiencia fotosintética del 1,5% (Posadas et al., 2013) mientras que en el siguiente estudio la productividad fue de  $3,8 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  correspondiente al 3.2% de actividad fotosintética (Posadas et al., 2014). En el caso del fósforo, la eliminación en ambos reactores fue debida a la asimilación del mismo por parte de los microorganismos. En ambos estudios, así como para ambas configuraciones de FBR, observaron que las eficiencias de eliminación disminuían al emplear TRH más bajos, probablemente debido al aumento de carga en el influente. En el FBR cerrado se observó una disminución en la actividad microalgal mediada por una limitación de luz.

Wang et al. (2010) cultivaron *Chlorella* sp. en agua residual urbana procedente de distintos puntos del proceso de depuración: antes (a) y después (b) de la decantación primaria, tras el tratamiento secundario (c) y el agua procedente de la centrifugación de fangos (d). Se obtuvieron eficiencias de eliminación de  $\text{N-NH}_4^+$  de 82%, 75%, y 78% y de fósforo de 83%, 91%, y 86%, para a, b y d, respectivamente, siendo su composición inicial de 35.4, 34.1, 0 y 76  $\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$  y de 5.7, 6.9, 0.3 y 201  $\text{mg TP} \cdot \text{L}^{-1}$  para los medios a, b, c y d. En el caso del agua tras el tratamiento secundario (c), rica en  $\text{N-NO}_3^-$ , ( $17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se consiguió una eliminación del 63%, demostrando que esta microalga tiene capacidad de eliminación de varios tipos de compuestos nitrogenados en diversos tipos de efluentes. En el caso de la eliminación de fósforo, únicamente se produjo un 5% en el efluente c, debido al desbalance en la proporción N/P encontrado (53,2).

Todos estos estudios demuestran la sinergia que existe entre el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa algal, así como la versatilidad de los posibles efluentes empleados para el cultivo. La utilización de las microalgas para el

tratamiento de aguas residuales se identifica como un elemento clave para eludir las barreras asociadas a los costes y la escalabilidad de los sistemas de los cultivos de microalgas en los procesos de producción de biocombustibles.

### 1.1.6.2. Biocombustibles y bioproductos a partir de cianobacterias

Al igual que lo mencionado anteriormente en relación a los posibles usos de las microalgas, las cianobacterias presentan múltiples aplicaciones en ámbitos muy variados, tales como su empleo en maricultura, alimentación animal o humana (como es el caso de *Spirulina*, que contiene grandes cantidades de proteínas y vitamina B12), productos farmacéuticos y químicos (la ficocianina es empleada como colorante), fertilizantes (la capacidad de fijación de N<sub>2</sub> de las cianobacterias aporta un papel fundamental en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno), biorremediación y producción de biocombustibles (Brennan y Owende, 2010; Hannon et al., 2010; Thajuddin y Subramanian, 2005).

En el ámbito de la eliminación de contaminantes en aguas residuales, el cultivo de cianobacterias es una alternativa a los microorganismos fotosintéticos como las microalgas. Del mismo modo que las microalgas, las cianobacterias pueden eliminar compuestos nitrogenados y fosfatados así como compuestos orgánicos (Chojnacka y Zielińska, 2012; Markou y Georgakakis, 2011), contaminantes que son los responsables de los procesos de eutrofización de aguas. Las cianobacterias son capaces de emplear como fuente de nitrógeno NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y otros compuestos nitrogenados, como urea, contenidos en los efluentes ganaderos con alto contenido en nitrógeno o de aguas residuales (Cañizares y Domínguez, 1993; Converti et al., 2006; Proulx et al., 1994) (artículo 6.2). De hecho, en el contexto de una planta de tratamiento de aguas residuales, también pueden contribuir a la recuperación de nitrógeno en procesos de nitrificación-desnitrificación donde se genera nitrógeno gas. A pesar de presentar ciertas similitudes con las microalgas, su aplicación en el campo de las aguas residuales está mucho menos estudiado, probablemente dada la toxicidad de algunas cianobacterias (Ni et al., 2012), así como a las bajas tasas de crecimiento de estos microorganismos comparadas con las microalgas (Krzemińska et al., 2014; Markou et al., 2012).

## 1. Introducción

---

Las cianobacterias se utilizan para la producción de compuestos de alto valor añadido. Sin embargo, la investigación del uso de las cianobacterias para la producción de biocombustibles y en biorremediación de aguas no es tan extensa. En base a los estudios llevados a cabo, está emergiendo la investigación para su empleo, dadas las características celulares que presentan, y que pueden resultar beneficiosas en esta área de aplicación. Recientemente las cianobacterias empiezan a considerarse interesantes como sustratos en la digestión anaerobia debido a la mayor digestibilidad que presentan en comparación con las microalgas, dada la diferente estructura de su pared (Richmond, 2004) (Artículos 6.1 y 6.2). Sin embargo, la investigación relacionada con la producción de  $\text{CH}_4$  a partir de biomasa de cianobacterias es todavía muy escasa. Se han realizado algunos estudios de digestión anaerobia de *Spirulina máxima*, obteniéndose  $0,15 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$  (Varel et al., 1988) en un reactor operado con un TRH de 16 días. Zhong et al. (2012) evaluaron la producción de biogás empleando biomasa de *Microcystis* sp., obteniendo una producción de metano de  $0,20 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$ . Aramrueang et al. (2016) emplearon *Spirulina platensis* en un digestor anaerobio operado a una VCO de  $1,0 \text{ g SV} \cdot \text{L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y 25 días de TRH, obteniendo un máximo de producción de  $0,342 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$ .

### 1.2. Producción de energía: digestión anaerobia

#### 1.2.1. Fundamentos, descripción y legislación vigente

La Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo establece el objetivo de conseguir una cuota mínima en cada Estado miembro para el año 2020 del 20% de energías renovables en el consumo final bruto de energía de la Unión Europea y una cuota mínima del 10% de energía en el consumo de energía en el sector del transporte. En este contexto, la producción de biocombustibles a partir de biomasa de microorganismos autótrofos, que utilizan para desarrollarse  $\text{CO}_2$  y luz solar, es una de las líneas prioritarias de investigación establecidas por la Unión Europea. El proceso de digestión anaerobia es una tecnología ya desarrollada para la obtención de biogás a partir de diferentes residuos orgánicos y ampliamente empleada en el tratamiento de fangos generados en plantas de aguas residuales. La producción de biogás se realiza mediante un proceso biológico de digestión anaerobia en el que tiene lugar la degradación de la materia orgánica compleja en productos más simples, para finalmente dar lugar a la producción de un gas rico en metano ( $\text{CH}_4$ ). El biogás es una mezcla de gases de naturaleza variada, formado principalmente por  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , cuya composición varía en un rango de 50-80% y 15-50%, respectivamente. Además de estos compuestos, también se generan en menor proporción otros gases entre los que se incluyen  $\text{N}_2$  (0-5%),  $\text{H}_2$  (<3%),  $\text{O}_2$  (<1%), sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (0.1-1%), monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ) (<0.3%) y vapor de agua ( $\text{H}_2\text{O}_v$ )(1-2%) (Pettersson, 2013).

Los motores de cogeneración son sistemas de aprovechamiento energético en el que se emplea el biogás para la generación conjunta de electricidad y calor. Estos sistemas son capaces de trabajar con un contenido de  $\text{CO}_2$  en el biogás de 40-50%, permitiendo el uso de este directamente o tras una limpieza para eliminar el ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Abatzoglou y Boivin, 2009). El biogás también puede destinarse a otros usos como son su empleo en calderas, turbinas o su utilización como biocarburantes para vehículos. También puede inyectarse a la red de gas natural. En estos casos, ha de ser sometido a una purificación más exhaustiva, para la eliminación del  $\text{CO}_2$  así como de  $\text{NH}_3$  (amoníaco) y de componentes sulfurados (Wellinger et al., 2013) ya que concentraciones altas de estos gases pueden conducir a la formación de dióxido de sulfuro ( $\text{SO}_2$ ) y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), provocando problemas de corrosión de los equipos y toxicidad. El  $\text{NH}_3$  actúa también como corrosivo, y su combustión

genera la emisión de óxidos de nitrógeno (NOx) a la atmósfera que son contaminantes.

### 1.2.2. Etapas del proceso de producción de biogás

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el cual se produce la degradación de materia orgánica compleja en ausencia de oxígeno. Más concretamente, se degradan los carbohidratos, proteínas y lípidos, en productos más simples en una serie de reacciones encadenadas que son realizadas por una población heterogénea de microorganismos bacterianos (Figura 1.11) a un pH en torno a 6,5-7,5. Como se muestra en la Figura 1.11, la digestión anaerobia de cualquier sustrato orgánico puede dividirse en cuatro fases, siendo estas la fase hidrolítica, acidogénica, acetogénica y por último, metanogénica.

- Hidrólisis: etapa en la que los biopolímeros insolubles que conforman la materia orgánica son metabolizados a sus componentes monoméricos mediante exo-enzimas (celulasas, amilasas, lipasas, y proteasas) excretadas por bacterias fermentativas que conforman los lodos anaerobios. Esta etapa puede resultar limitante cuando la biomasa empleada como sustrato de la digestión está compuesta por polímeros complejos, como es el caso de materiales lignocelulósicos (Čáter et al., 2015) o microorganismo fotosintéticos (micro y macroalgas) (González-Fernández et al., 2015). Esta etapa se realiza por bacterias hidrolíticas, encargadas de la ruptura de los polímeros y la solubilización del material particulado.

- Acidogénesis: durante esta fase se produce la fermentación microbiana de los aminoácidos, azúcares monoméricos y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, que son transformados a compuestos intermedios o ácidos grasos volátiles (AGV) (acetato, butirato, propionato, lactato, etc), así como la producción de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Las bacterias involucradas en esta etapa son bacterias fermentativas, las cuales tienen un crecimiento rápido y toleran pH más bajos (5-6) (Stamatelatou et al., 2011).

- Acetogénesis: en esta etapa tiene lugar la oxidación anaerobia de los productos intermedios (AGVs) a acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> por los microorganismos acetogénicos. En esta etapa intervienen bacterias sintróficas obligadas (Ali Shah et al., 2014) es decir,

## 1. Introducción

---

dependen de la acción de otro grupo de bacterias para realizar la degradación de estos compuestos. Son metabólicamente activas cuando la presión parcial de hidrógeno en medio es baja, dado que este resulta tóxico para ellas, y dependen, por tanto de la acción de otras especies que empleen el  $H_2$  producido (Stamatelatou et al., 2011). Si la presión parcial de hidrógeno aumenta, se produce la inhibición de las bacterias acetogénicas a pesar de que el  $H_2$  es un producto derivado de su propio metabolismo. De este modo, la acción sintrófica con otras especies que emplean este hidrógeno ayuda a mantenerlo en baja concentración. Las bacterias involucradas en el proceso de acetogénesis suelen tener tiempos de duplicación lentos, del orden de días (Stamatelatou et al., 2011).

- Metanogénesis: esta última fase es llevada a cabo por archaeas y se produce la formación de  $CH_4$  mediante dos posibles vías: por transformación del acetato en  $CH_4$  a través de microorganismos metanógenos acetoclásticos, o a partir del  $H_2$  y el  $CO_2$  realizado por los metanógenos hidrogenotrófos. Aproximadamente, un 70% de la producción de  $CH_4$  durante la digestión anaerobia viene principalmente de la vía acetoclástica (Conrad, 2007). En casos en que la materia orgánica es fácilmente degradable, esta es la etapa limitante del proceso dado el lento crecimiento de este grupo de microorganismos y la posibilidad del lavado de las archaeas en el reactor cuando los tiempos de retención son menores que la tasa de duplicación de los mismos (Lee et al., 2011).

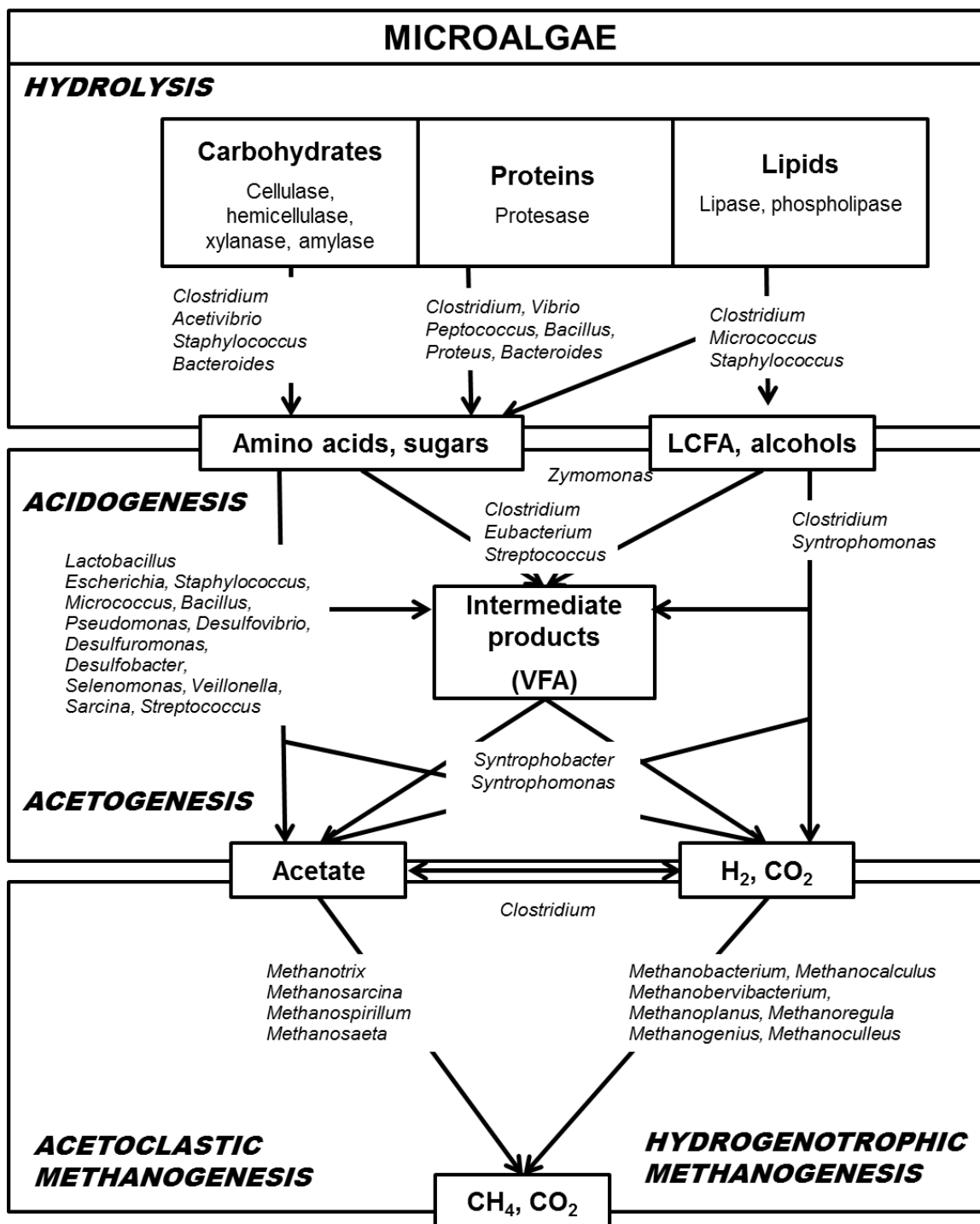


Figura 1.11. Fases de la digestión anaerobia. Fuente: González-Fernández et al. (2015).

## 1. Introducción

---

Las bacterias que intervienen en el proceso anaerobio, especialmente las archaeas productoras de CH<sub>4</sub>, son altamente sensibles a las condiciones ambientales dentro del reactor. Más concretamente, los factores que afectan en mayor medida a la digestión anaerobia son:

- Temperatura: la temperatura óptima de operación de un digestor anaerobio viene determinado por la temperatura de crecimiento de los microorganismos que componen ese lodo. Se pueden clasificar en organismos psicrófilos (cuando su temperatura óptima de crecimiento es inferior a 25 °C), mesófilos (cuando crecen entre 25-45 °C) o termófilos (cuando su temperatura óptima de crecimiento es superior a 45 °C) (Yenigün y Demirel, 2013). El proceso en el rango mesófilo es el más empleado puesto que emplea menos energía para el calentamiento del reactor anaerobio. Cuando se emplean menores temperaturas (psicrófilo), la tasa de hidrólisis del sustrato disminuye, limitando así la eficiencia del proceso (Vavilin et al., 1997). Por otro lado, la digestión anaerobia termófila se considera un proceso más eficiente en términos de eliminación de materia orgánica, y producción de energía, con el beneficio adicional de reducir en mayor medida el contenido de patógenos que en el proceso mesofílico. Sin embargo, los sistemas termofílicos son más propensos a acumular AGVs y más susceptibles ante cambios operacionales (Banks y Heaven, 2013). Además, son más sensibles a altas concentraciones de nitrógeno (Angelidaki y Ahring, 1994) ya que la disociación a NH<sub>3</sub> está muy influenciada por el incremento del pH y la temperatura.

- Nutrientes: durante el proceso de digestión anaerobia se requieren una serie de macro y micro nutrientes para garantizar el crecimiento de los microorganismos anaerobios. En cuanto a los macronutrientes, la concentración en que se encuentran disponibles ciertos elementos como el carbono y nitrógeno es de suma importancia para el correcto funcionamiento y estabilidad del proceso. De este modo, la relación óptima C/N del sustrato a degradar debe situarse en torno a 20-30 (Yen y Brune, 2007) y la relación de N/P se encuentra entre torno a 5 (Bohutskyi y Bouwer, 2013; Drosig et al., 2013). El nitrógeno y fósforo forman parte de proteínas y ácidos nucleicos de las microalgas y por lo tanto, su aporte está asegurado al emplear biomasa algal como sustrato para la producción de biogás.

## 1. Introducción

---

En lo referente a los micronutrientes, son necesarios algunos metales tales como hierro, níquel, cobalto, puesto que forman parte de enzimas involucradas en el metabolismo de las bacterias anaerobias (Choong et al., 2016).

- Ácidos grasos volátiles: Son los productos finales generados en la etapa de acidogénesis, entre los cuales se encuentran principalmente el ácido acético, propionato y butírico (Stamatelatou et al., 2011). Son productos intermedios del proceso y su acumulación se considera como un indicador de desequilibrio en el reactor, pudiendo derivar en un mal funcionamiento del proceso (Stamatelatou et al., 2011). Su aumento suele ser indicativo de un exceso en la carga orgánica alimentada al reactor o bien por una acumulación de  $\text{NH}_4^+$  (Mahdy et al., 2015a) que pueden conducir a la disminución del pH e inhibición de las bacterias metanógenas (Franke-Whittle et al., 2014).

- Tiempo de retención hidráulico (TRH): se define como el tiempo que el influente permanece en el reactor, es decir el tiempo durante el cual la materia orgánica empleada como alimentación se encuentra en contacto con los microorganismos anaerobios. El aumento del TRH se traduce en un mayor tiempo de degradación y, por tanto, en un aumento del coste energético para llevar a cabo la digestión anaerobia. Este parámetro debe ajustarse en función de las necesidades del sistema anaerobio, determinadas por el tipo de materia orgánica a degradar, el tipo de reactor empleado, las condiciones de digestión, etc. El objetivo es emplear bajos TRH para tratar mayor cantidad de materia orgánica en menor tiempo y por tanto, reducir el coste económico maximizando la producción del biogás.

- Carga orgánica (VCO): se define como la carga de materia orgánica suministrada en el influente por unidad de volumen del reactor y tiempo. Si la carga orgánica empleada para alimentar el reactor anaerobio supera la tasa de producción de  $\text{CH}_4$  de la población de metanógenas, puede conducir a una acumulación de AGV, disminuyendo el pH e inhibiendo el proceso. En el caso contrario, resultaría en una baja producción de biogás debido a una baja actividad de microorganismos anaerobios (González-Fernández y García-Encina, 2009). La carga de biomasa que puede emplearse depende del tipo de reactor empleado. Por ejemplo, en reactores de agitación continua (CSTR) se utilizan cargas de  $1\text{-}6 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ , mientras que en reactores de flujo ascendente (UASB) se emplean rangos entre  $5 \text{ y } 30 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  (González-Fernández et al., 2015), habituales en la digestión anaerobia de microalgas.

## 1. Introducción

---

- Tóxicos: Existen varios compuestos químicos que pueden resultar tóxicos para el proceso de digestión y, por tanto, inhibir el proceso. Por ejemplo, el oxígeno es un elemento inhibitorio para las bacterias metanógenas estrictamente anaerobias, mientras que las bacterias hidrolíticas y acidogénicas son microorganismos tolerantes a su presencia (Stamatelatou et al., 2011). De forma análoga, concentraciones altas de sales, como NaCl, pueden resultar inhibitorias para la producción de CH<sub>4</sub>. Concentraciones por encima de 8-10 g·L<sup>-1</sup> se ha demostrado que son inhibitorias para inóculos que no han sido aclimatados (Anwar et al., 2016; Lefebvre et al., 2007).

La presencia de metales pesados puede ser también un elemento causante de toxicidad cuando superan ciertos límites de concentración como por ejemplo Fe, Zn, Ni, Co, Mo o Cu (Chen et al., 2008).

El hidrógeno puede ser otro agente tóxico ya que su concentración afecta a la degradación de AGVs, pudiendo provocar su acumulación ya que se produce inhibición de las bacterias acetogénicas, que trabajan a presiones parciales de hidrógeno bajas (Fukuzaki et al., 1990).

El sulfato presente en el sustrato puede ser reducido en los digestores anaerobios dando lugar a sulfuros por parte de las bacterias sulfato-reductoras (SRB). La presencia de estos compuestos puede dar lugar a inhibición de los microorganismos anaerobios, bien por la competición de las SRB por el sustrato o por la toxicidad producida por los propios sulfuros (Chen et al., 2008). Existe discrepancia en la literatura con respecto a los niveles de azufre requeridos para la inhibición de la metanogénesis, estando este en el rango de 100-800 mg·L<sup>-1</sup> para su forma disociada o de 50-400 mg·L<sup>-1</sup> en su forma no disociada (H<sub>2</sub>S) (Colleran et al., 1995).

El NH<sub>3</sub> es posiblemente uno de los inhibidores del proceso de digestión anaerobia más frecuentemente mencionado (Angelidaki y Ahring, 1993; Robbins et al., 1989; Yenigün y Demirel, 2013). Su papel cobra especial relevancia cuando se emplean sustratos cuya materia orgánica contiene altas cantidades de proteínas (como ocurre en muchos casos al emplear microalgas como sustrato) (González-Fernández et al., 2011a; Mahdy et al., 2014a; Mendez et al., 2013). El equilibrio del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> puede desplazarse a NH<sub>3</sub> en función del pH (Ec. 2). La concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> que las bacterias metanógenas pueden tolerar varía entre 1,5-1,7 g·L<sup>-1</sup> (Koster y Lettinga, 1984). El NH<sub>3</sub> es considerada la principal causa de inhibición dada su alta permeabilidad al interior

## 1. Introducción

---

celular (Rajagopal et al., 2013; Yenigün y Demirel, 2013). Los mecanismos por los cuales el  $\text{NH}_3$  causa toxicidad están relacionados con el desequilibrio del pH intracelular, deficiencia de potasio e inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo (Bohutskyi y Bouwer, 2013). La concentración mínima de  $\text{NH}_3$  que resulta inhibitoria del proceso de digestión anaerobia se encuentra en el rango  $150\text{-}300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Braun et al., 1981; Yenigün y Demirel, 2013). Sin embargo, existe la posibilidad de aclimatar o adaptar a las poblaciones metanógenas, siendo así capaces de tolerar concentraciones de este compuesto de hasta  $3\text{-}4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  nitrógeno amoniacal total (TAN) (Mahdy et al., 2017; Sung y Liu, 2003).

### 1.2.3. Producción de metano a partir de microalgas sin pretratar

La composición bioquímica del sustrato determina en gran medida la cantidad y composición del biogás en el proceso de digestión anaerobia. La tabla 1.1 refleja el potencial teórico de producción de  $\text{CH}_4$  para cada una de las macromoléculas constituyentes de la materia orgánica (Angelidaki y Sanders, 2004). Los lípidos tienen mayor potencial de producción de  $\text{CH}_4$  debido a su mayor contenido energético en comparación a los carbohidratos y proteínas, confiriendo a las biomásas ricas en estas moléculas un atractivo añadido como sustratos para la producción de biogás. Sin embargo, las tasas de hidrólisis de los lípidos son mucho más lentas que la de los demás componentes (Ma et al., 2015). Estas diferencias reflejan la importancia de la composición de la biomasa empleada como sustrato en los procesos de producción de biogás.

**Tabla 1.1.** Producciones específicas de  $\text{CH}_4$  para tres tipos macromoleculares. Extraído y modificado de Angelidaki y Sanders (2004)

Sustrato	Composición	L $\text{CH}_4\cdot\text{g SV}^{-1}$
Proteínas	$\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$	0,496
Lípidos	$\text{C}_{57}\text{H}_{30,4}\text{O}_6$	1,014
Carbohidratos	$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$	0,415

## 1. Introducción

La composición macromolecular de la biomasa microalgal es muy variable (Tabla 1.2), dependiendo de la especie, de la edad del cultivo y de los parámetros y condiciones bajo las que han sido cultivadas. La composición típica de la biomasa de microalgas es 10-35% carbohidratos, 40-60% proteínas y 10-20% lípidos (Mendez et al., 2014; Passos et al., 2015b). Además de carbono, nitrógeno y fósforo, que son los principales componentes en la composición de las microalgas, también presentan una serie de oligonutrientes en cantidades suficientes para favorecer la digestión anaerobia.

**Tabla 1.2.** Composición macromolecular de diferentes especies de microalgas (Becker 2004) y el potencial de CH<sub>4</sub> teórico calculado durante la digestión anaerobia de la biomasa total. Modificado de Sialve et al. (2009)

Especies	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)	(L CH <sub>4</sub> · g SV <sup>-1</sup> )
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18	0,39-0,58
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17	0,52
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26	0,41
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17	0,44-0,58
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32	0,48
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16	0,41-0,49
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	4-9	8-14	0,3-0,46
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17	0,41-0,49

A pesar del alto potencial que tiene la biomasa microalgal para la generación de CH<sub>4</sub>, la accesibilidad de las bacterias al contenido orgánico se ve altamente dificultada por la pared celular. Esta pared obstaculiza la fase hidrolítica durante el proceso de digestión anaerobia, resultando en una reducida producción de CH<sub>4</sub> (Golueke y Oswald, 1959; González-Fernández et al., 2012b; Gruber-Brunhumer et al., 2015).

Golueke et al. (1957) comprobaron la resistencia de las microalgas al ataque bacteriano ya que continuaban intactas tras un proceso de digestión en condiciones mesófilas empleando un TRH de 30 días. Además, comprobaron que la producción de biogás al emplear como sustrato microalgas eran 1,3-1,6 veces menores que las obtenidas utilizando lodos de depuradora. Mussgnung et al. (2010) compararon la biodegradabilidad anaerobia de varias microalgas. En este estudio, se concluyó que la

mayor producción de biogás correspondía a las especies de *C. reinhardtii*, *D. salina*, *A. platensis* y *E. gracilis*, con aproximadamente 75-90% de biodegradabilidad. A pesar de no haber sido sometidas a un tratamiento de ruptura previo a la digestión, la pared celular en estas especies de microalgas no obstaculizó la acción de las bacterias hidrolíticas. Por otro lado, para las especies de *S. obliquus* y *C. kessleri*, la producción de biogás fue sustancialmente menor con un 40% de biodegradabilidad. En este estudio se destaca que la diferente resistencia a la rotura celular observada en cada especie de microalgas se debe a la composición de la pared celular, y por tanto afecta significativamente la producción de CH<sub>4</sub> que se puede alcanzar con estos sustratos.

### 1.2.4. Microorganismos anaerobios: *Bacteria* y *Archaea*

Los microorganismos involucrados en el proceso de digestión son mayoritariamente bacterias anaerobias, aunque existen otros grupos como protozoos y hongos anaerobios que también pueden estar presentes. Como se ha indicado con anterioridad, los microorganismos predominantes en la digestión anaerobia pertenecen a los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Las bacterias son las encargadas de la ruptura de los biopolímeros en sus correspondientes componentes monoméricos y la producción de productos intermedios (AGV, H<sub>2</sub>, acetato...), mientras que las arqueas son los microorganismos encargados de metabolizar estos compuestos y su posterior conversión a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

A pesar de que la microbiota de los digestores anaerobios utilizando sustratos orgánicos residuales ha sido extensamente estudiada (Ali Shah et al., 2014; Carballa et al., 2015), la información de la que actualmente se dispone acerca de la microflora de digestores alimentados con microalgas es escasa. Dada la complejidad metabólica del proceso de digestión anaerobia en el que actúan de manera sinérgica una gran variedad de microorganismo, su análisis podría ser importante para determinar los parámetros operacionales más adecuados o las posibles inhibiciones que pueden afectar a determinados grupos de microorganismos al emplear este tipo de sustratos.

En general, en relación a las bacterias anaerobias, los microorganismos más comúnmente encontrados en los digestores pertenecen a los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Chloroflexi* (Carballa et al., 2015). La composición de las poblaciones microbianas está muy influenciada, no solo por los parámetros operacionales como la temperatura o la VCO empleada, sino también, por la

## 1. Introducción

---

naturaleza del sustrato. Por ejemplo, se ha observado que las bacterias del género *Bacteroides* emplean sustratos como glucosa, xilosa, y celobiosa (Nolla-Ardèvol et al., 2015; Pobeheim et al., 2010), las bacterias del filo *Chloroflexi* tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos halogenados (Krzmarzick et al., 2012; Sun et al., 2016), o las bacterias del filo *Thermotogae* que metabolizan sustratos compuestos por carbohidratos complejos (Nguyen et al., 2008).

Recientemente se han realizado algunos estudios analizando la composición de la población microbiana de digestores anaerobios alimentados con microalgas. Wirth et al. (2015a) evaluaron la diversidad microbiana encontrada en un digestor CSTR alimentado con la microalga *Scenedesmus obliquus* y lo compararon con un digestor alimentado con ensilado de maíz. Ambos reactores fueron operados en condiciones mesófilas y en modo de fed-batch. En su estudio, en el reactor alimentado con ensilado de maíz, se observó predominancia de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, siendo más representativos los órdenes *Bacteroidales* y *Clostridiales*, respectivamente, seguido de *Bacillales*. Sin embargo, en el reactor alimentado con *S. obliquus*, se observó un claro predominio del orden *Bacteroidales* en detrimento del orden *Clostridiales*. En lo referente a las poblaciones de *Archaea*, el orden *Methanosarcinales* predominó en ambos reactores, siendo más elevado en el alimentado con microalgas, con *Methanosarcina* como claro representante. Este género, tiene como característica principal la capacidad de emplear la vía hidrogenotrofa además de la acetoclástica, por lo que es un microorganismo más tolerante a los inhibidores (De Vrieze et al., 2012).

En otro estudio similar, los mismos investigadores emplearon una mezcla de microalgas (*Scenedesmus* sp. y *Chlamydomonas* sp.) junto con bacterias del género *Rhizobium* para alimentar un digestor CSTR y otro en co-digestión con ensilado de maíz (Wirth et al., 2015b). En este caso, en el reactor alimentado con la mezcla de microalgas, hubo clara predominancia del filo de *Proteobacteria* por encima de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Así mismo, se observó una acumulación de *Rhizobium* y de secuencias de DNA eucariótico, indicando una mayor dificultad de degradación de este sustrato en comparación con el ensilado de maíz. Durante la co-digestión de ambos sustratos, también se observó un incremento de *Proteobacteria*, seguido de *Firmicutes*. En relación a las arqueas, el mayor representante fue la clase

## 1. Introducción

---

*Methanomicrobia*. Se observó prevalencia de *Methanosarcina* en todos los reactores, y en menor medida, también hubo presencia de *Methanosaeta*.

Ma et al. (2015) emplearon la microalga *Nannochloropsis salina* como sustrato para la producción de CH<sub>4</sub> en modo batch. Utilizaron biomasa nativa con alto contenido en lípidos y biomasa tras la extracción de lípidos. En las digestiones realizadas con la microalga completa, se observó dominancia de *Proteobacteria*, seguido de *Chloroflexi* y *Firmicutes*, mientras que en la digestión a partir de microalga tras extracción de lípidos, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, y *Proteobacteria* se encontraron en similares proporciones. En relación a las poblaciones de arqueas, *Methanosaeta* prevaleció en ambos digestores, seguido en inferior proporción por *Methanobacterium* y *Methanomethylovorans*.

Nolla-Ardèvol et al. (2015) alimentaron un reactor CSTR operado en semi-continuo empleando como sustrato *Spirulina* sp. en condiciones mesófilas. En este caso, *Firmicutes* fue predominante, seguido de *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* y *Thermotogae*. El orden *Clostridiales* representó un 38%, seguido de *Bacteroidales* (7%), *Thermoanaerobacterales* y *Bacillales*. En el reactor, representantes de los órdenes *Thermotogales* y *Anaerolineales* fueron relativamente abundantes. Estos órdenes incluyen bacterias que emplean sustratos proteicos, y *Spirulina* sp. tiene alto contenido en proteínas. Dentro del dominio se identificaron *Archaea*, *Methanosarcinales* y *Methanomicrobiales* con un 31% y 29%, respectivamente.

### 1.3. Pretratamiento de la biomasa de algas para aumentar la producción de metano: ruptura/solubilización de las microalgas

#### 1.3.1. Tipos de pretratamientos

La biomasa algal, en general, poseen paredes celulares cuyas características pueden hacer de ellas estructuras altamente resistentes al ataque bacteriano (González-Fernández et al., 2012a). Estas paredes dificultan la extracción de moléculas de interés (Lorente et al., 2015) o, en el caso concreto de la digestión anaerobia, actúan como barrera física y dificulta la degradación por parte de los microorganismos anaerobios (Passos et al., 2014). Como consecuencia, hay una baja accesibilidad a la materia orgánica y, por tanto, la conversión a biogás se reduce, generando así pérdidas en el rendimiento y bajas productividades. Para mejorar la digestión anaerobia de esta biomasa es recomendable establecer una etapa de pretratamiento previa a la digestión para asegurar la lisis y/o solubilización de la pared celular que dificulta la hidrólisis bacteriana.

Existe una gran variedad de pretratamientos estudiados para la ruptura de las células de microalgas (Tabla 1.3). Dado hay variaciones inter e intraespecíficas en la composición y características estructurales de la pared celular, así como variaciones dependientes del propio cultivo, no existe un único pretratamiento que sea óptimo para todos los tipos de biomasa microalgal. Así mismo, la composición de la materia orgánica liberada durante el pretratamiento puede influir sobre el resultado final del proceso, provocando un aumento en la producción final de CH<sub>4</sub> (Mendez et al., 2013) o una disminución debido a la posible formación de compuestos inhibitorios que afecta el proceso anaerobio (Mahdy et al., 2015a). Por tanto, es determinante la selección del pretratamiento más apropiado en cada caso para maximizar la accesibilidad/solubilización de la materia orgánica, y por tanto aumentar la producción de biogás, minimizando la generación de posibles sustancias inhibitorias que puedan afectar al proceso. Además, se deben buscar las alternativas de pretratamiento que sean más económicas y energéticamente más eficientes.

Mientras que para algunos sustratos más tradicionales, como pueden ser los lodos aerobios, se emplea la DQO solubilizada como indicador de la eficiencia del pretratamiento (Carvajal et al., 2013), en el caso de las microalgas se ha observado que un aumento en la solubilización de la materia orgánica no está necesariamente

## 1. Introducción

---

relacionado de forma directa con un aumento en la producción de CH<sub>4</sub> (Alzate et al., 2012; González-Fernández et al., 2012c). Se ha de resaltar que los pretratamientos pueden producir diferentes efectos en la pared celular, bien creando poros en la superficie (Cheng et al., 2013) y liberando el contenido intracelular o por solubilización de sus polímeros estructurales (Mahdy et al., 2016). La materia orgánica liberada podría tener, por tanto, diferente naturaleza según el efecto del pretratamiento utilizado (solubilización o ruptura). Para evaluar la efectividad del pretratamiento sobre la integridad de la pared celular de las microalgas se pueden emplear otro parámetro, como es la determinación del contenido de componentes macromoleculares (lípidos, proteínas y carbohidratos) antes y después del pretratamiento, dado que el proceso de generación de biogás está muy relacionado con la biodisponibilidad de estas moléculas.

Como clasificación general, los pretratamientos se pueden dividir en mecánicos y no mecánicos (Günerken et al., 2015). El primer grupo engloba aquellos métodos en los que la ruptura celular se realiza de un modo no específico, empleando fuerzas mecánicas que causan la fragmentación estructural de la materia orgánica y permitiendo la accesibilidad de esta a los microorganismos anaerobios (Tijani et al., 2015). Algunos de estos métodos se realizan mediante fuerzas de cizalla (ej. molino de bolas, homogeneización) (Montalescot et al., 2015), presión (homogeneizado a altas presiones) (Spiden et al., 2013), o transferencia de energía mediante ondas (sonicación, ultrasonidos, microondas) (Passos et al., 2013b).

El molino de bolas emplea un homogeneizador con pequeñas esferas en contacto con la biomasa y la reducción de tamaño se consigue mediante el impacto y el desgaste que estas producen cuando se aplica movimiento a la mezcla. Es un proceso complejo que abarca numerosos parámetros de funcionamiento tales como diámetro de las esferas, la densidad del material, la velocidad de agitación o la velocidad de alimentación de la muestra a tratar, entre otros. En su aplicación sobre biomasa, ha demostrado ser una técnica útil para la desintegración de células microbianas. Postma et al. (2015a) emplearon esta técnica utilizando esferas de 1 mm de diámetro sobre biomasa de *Chlorella vulgaris* a varias velocidades de agitación (6, 9 y 12 m·s<sup>-1</sup>) y concentraciones de biomasa (25, 87,5 y 145 g·kg<sup>-1</sup>). El resultado de este pretratamiento fue una desintegración celular del 99% aplicando tiempos de 500 s y entre 90-95% de ruptura tras 200-250 s. Dado que un mayor grado de alteración

## 1. Introducción

---

celular provoca un aumento de la descomposición de las células así como mayor liberación del material intracelular, la evaluación de la eficiencia de estos métodos de pretratamiento se realiza mediante la medición en la fase líquida de los componentes macromoleculares. Más concretamente, se demostró que esta técnica permitía una liberación de 40–45% de proteínas y 48–58% de carbohidratos, para una concentración de biomasa de 25 kg peso seco (PS) ·m<sup>-3</sup> (Postma et al., 2015a, 2015b). Sin embargo, la energía específica empleada en este pretratamiento es alta (7,64 KWh·Kg<sup>-1</sup> PS), haciendo necesaria la búsqueda de otros métodos con menor gasto energético.

En un estudio realizado por Gruber-Brunhumer et al. (2015) se emplearon varios métodos para romper las células de *Acutodesmus obliquus* como fase previa a la producción de CH<sub>4</sub>. En el caso del tratamiento mediante molino de bolas (con esferas de diámetro 0,35 mm, un tiempo de 20 min a 8500 RPM), se observó una eficiencia que alcanzó sólo un 30% de células fragmentadas y una DQO soluble del 11% mayor que en la biomasa control. Del mismo modo, Zheng et al. (2011) mostraron que tras el tratamiento con esferas de cristal (esferas de diámetro 0,40-0,60 mm, durante un tiempo de 20 min y velocidad de 1500 RPM), la extracción de lípidos en biomasa de *C. vulgaris* resultó únicamente en un 10% del peso seco. Cabe destacar que la eficiencia del pretratamiento utilizando molino de bolas depende de una gran variedad de condiciones operacionales y los resultados publicados sobre su eficiencia para provocar la desintegración celular son contradictorios. Además su efecto depende de las características morfológicas de la microalgas, dificultando su optimización. (Inglesby et al., 2015). Además, esta técnica lleva asociado un elevado coste energético y por tanto, económico.

El segundo pretratamiento mecánico más empleado es la aplicación de ultrasonidos. El ultrasonido es energía acústica en forma de ondas de alta frecuencia. Esta frecuencia provoca variaciones de presión y genera cavitación dentro de las células por el movimiento al que son sometidas las moléculas de líquido gracias a las ondas acústicas, formando así micro-burbujas en el interior celular (Passos et al., 2014). Como consecuencia, se generan micro-turbulencias a altas presiones y temperaturas intracelulares, dañando las paredes (Rodríguez et al., 2015). Las frecuencias de ultrasonidos aplicadas varían entre bajas (<50 kHz), las cuales favorecen los efectos mecánicos, y altas (>50 kHz) donde se favorece la formación de

## 1. Introducción

---

radicales libres (Passos et al., 2014). Lee et al. (2010) compararon el efecto de los ultrasonidos en tres especies de microalgas (*Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.) con el objetivo de extraer los lípidos. En su estudio, empleando una resonancia de 10 kHz durante 5 min, se evidenció una eficiencia de extracción de lípidos para *Botryococcus* sp. del 8.8%, y menores para *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Más concretamente, en la aplicación de microalgas pretratadas por esta técnica para su posterior uso como sustrato para la producción de biogás, se ha registrado una máxima solubilización de materia orgánica de aproximadamente el 8% sobre biomasa de *Scenedesmus* sp. cuando se aplicó ondas de ultrasonidos de una energía específica de 130 MJ Kg<sup>-1</sup> (González-Fernández et al., 2012b). Esta solubilización se tradujo en un incremento de la producción de CH<sub>4</sub> de 1.9 veces en comparación con la biomasa sin tratar (81,8 mL CH<sub>4</sub> ·g DQO<sup>-1</sup>). En este aspecto cabe destacar que *Scenedesmus* está considerada como una de las microalgas que ofrece mayor resistencia a la degradación dadas sus complejas paredes celulares. Alzate et al. (2012) analizaron el efecto de ultrasonidos empleando una energía específica de 57.000 kJ kg<sup>-1</sup> ST en tres mezclas de microalgas y obtuvieron solubilizaciones de la DQO del 32% (*Chlamydomonas* sp., *Scenedesmus* sp. y *Nannochloropsis* sp.), 60% (*Acutodesmus obliquus* y *Oocystis* sp.) y 62% (*Microspora* sp.). Sin embargo, estos incrementos de DQO soluble no se reflejaron en la posterior producción de CH<sub>4</sub>, obteniendo valores de 308 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>, 217 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> y 307 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> para las mezclas de microalgas anteriormente mencionadas. En estos estudios de pretratamiento con ultrasonidos se pone de manifiesto que el aporte de energía sobre la biomasa aumenta la extracción del material intracelular. Sin embargo, la temperatura generada por el aporte de ultrasonidos puede variar en función del tiempo y la energía aplicada, pudiendo ser un factor que influye en mayor o menor medida sobre la solubilización de la materia orgánica. (González-Fernández et al., 2012b) calcularon que la eficiencia de conversión de la energía acústica en térmica era en torno al 31-48% para una energía específica de 76,5 MJ/kg. En base a esto, compararon la solubilización producida cuando sometían la biomasa a un pretratamiento térmico o cuándo se aplicaba la misma temperatura mediante ultrasonidos (70-80 °C, 25 min). Se observaron menores solubilizaciones de DQO utilizando el tratamiento por ultrasonidos. Sin embargo, la producción de CH<sub>4</sub> obtenida con biomasa tratada térmicamente fue ligeramente inferior a la generada con la biomasa sometida a ultrasonidos (129 y 154 mL CH<sub>4</sub> ·g DQO in<sup>-1</sup>, respectivamente). Dadas las producciones de CH<sub>4</sub> obtenidas tras la aplicación de ambos pretratamientos,

## 1. Introducción

---

concluyeron que la energía empleada en la aplicación de ultrasonidos no era compensada por el incremento en la producción final de CH<sub>4</sub>, siendo posiblemente el empleo de tratamiento térmico más favorable energéticamente.

Los tratamientos de microondas se realizan mediante la aplicación de ondas cortas de energía electromagnética que suelen variar en una frecuencia de 300 MHz a 300 GHz. Este mecanismo de irradiación mediante ondas electromagnéticas aumenta la energía cinética del agua que conduce a una rápida generación de calor y a un aumento de presión en el intracelular, produciendo la hidrólisis de células y forzando la salida de compuestos de la matriz biológica. A su vez, este pretratamiento produce la polarización de las macromoléculas que se alinean con los polos del campo electromagnético, causando cambios en las estructuras. Lee et al. (2010) evaluaron la eficiencia de varios tipos de pretratamientos sobre 3 especies de microalgas (*Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.). Como resultado, obtuvieron una máxima eficiencia de extracción de lípidos cuando emplearon microondas con una irradiación de 2450 MHz y temperatura de 100 °C durante 5 minutos, para todas las especies de microalgas estudiadas. Este estudio está en concordancia con Guldhe et al. (2014) que obtuvieron mayores rendimientos de extracción lipídica de *Scenedesmus* sp (1,49 veces mayor) con el uso de microondas que con la extracción por sonicación. Passos et al. (2013b) utilizaron este pretratamiento empleando la misma frecuencia pero aplicando diferentes energías específicas sobre biomasa microalgal. En su trabajo se demostró que la solubilización de materia orgánica estaba influenciada tanto por el tiempo de exposición al tratamiento como por la potencia empleada. Para una misma energía específica se observaron incrementos de SV en la fracción soluble similares: entre 2.5-3% para 21.800 kJ kg ST<sup>-1</sup>, aumentando hasta 7-8% empleando 65.400 kJ kg ST<sup>-1</sup>. A su vez, la producción de CH<sub>4</sub> se incrementó proporcionalmente con la energía específica, presentando producciones similares, independientemente del tiempo de exposición y potencia, cuando se aplicaban las mismas energías específicas. Se obtuvo una producción de CH<sub>4</sub> de 194-220 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> para la energía específica 21.800 kJ kg ST<sup>-1</sup>, aumentando hasta un máximo de 307 mL CH<sub>4</sub> ·g SV para 65.400 kJ kg ST<sup>-1</sup>. En este caso, se observó una correlación entre la producción de biogás y la materia orgánica solubilizada. Sin embargo, el balance energético realizado entre la energía empleada para el pretratamiento y la energía producida a partir del biogás obtenido, resultó ser negativo en todos los casos analizados, es decir, se empleaba demasiada energía en

## 1. Introducción

---

comparación con la producida, haciendo de esta metodología inviable en las condiciones empleadas.

A pesar de que los métodos mecánicos son los que se emplean a gran escala dado que proporcionan una alta tasa de recuperación de productos y ofrecen un control de los parámetros sencillo (Montalescot et al., 2015), el principal problema asociado a estos métodos es su alto consumo energético (González-Fernández et al., 2012b).

Como contrapartida, los métodos no mecánicos (químicos, térmicos y biológicos) pueden proporcionar una mayor selectividad en cuanto a la selección de la macromolécula a extraer, además de presentar requerimientos energéticos menores que los mecánicos. Sin embargo, el coste asociado al uso de productos químicos (tratamientos químicos) o enzimas empleados (tratamientos biológicos), así como la necesidad de ajustar el pH previo a la digestión anaerobia, la posible corrosión de los reactores por la adición de productos químicos y la dificultad de su eliminación son aspectos que hay que considerar en el escalado de estos pretratamientos. Estos inconvenientes han limitado el uso de estos tratamientos a nivel de laboratorio (Montalescot et al., 2015).

Los reactivos ácidos y alcalinos se emplean comúnmente para solubilizar polímeros. Los pretratamientos basados en la adición de ácidos o bases se han empleado con anterioridad para el aumento en la producción de CH<sub>4</sub> sobre otros sustratos biológicos (sustratos agrícolas o fangos activos) (Dhar et al., 2011; González-Fernández et al., 2008). Los tratamientos ácidos tienen como objetivo la solubilización de carbohidratos complejos, mientras que los alcalinos actúan alterando la estructura de la lignina (McIntosh y Vancov, 2010). El empleo de tratamiento alcalino se realiza mediante el uso de distintos tipos de hidróxidos (sodio, potasio, calcio, amonio) (McIntosh y Vancov, 2010; Sambusiti et al., 2013). Más concretamente, en el área de las microalgas, este tipo de pretratamiento ha sido menos investigado que los mecánicos o térmicos (de las cuales se hablara en mayor detalle en la sección 1.3.2), debido a los problemas que pueden surgir con la biomasa pretratada durante la degradación anaerobia. Uno de los problemas asociados al empleo de este tipo de pretratamientos químicos es la posibilidad de que algunos compuestos solubilizados puedan inducir la formación de subproductos potencialmente tóxicos para las poblaciones anaerobias, así como provocar el deterioro de los reactores. Bohutskyi et

## 1. Introducción

---

al. (2014) estudiaron el efecto de varias concentraciones de álcali (0-21 g·L<sup>-1</sup> NaOH) sobre diversas especies de microalgas. El efecto de las condiciones del pretratamiento sobre las eficiencias de hidrólisis fue variado, dependiendo de la microalga tratada. Más concretamente, para la microalga *Tetraselmis* sp. se obtuvieron eficiencias de solubilización de la DQO del 61% a la mayor concentración de álcali, mientras que en *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp., las eficiencias fueron alrededor del 10-15% al ser tratadas con NaOH para la misma concentración. Las variaciones observadas fueron atribuidas a la diferente naturaleza de las paredes celulares de estos microorganismos. Por ejemplo, *Tetraselmis* sp. se caracteriza por la presencia de una pared celular de composición glicoproteica. Las proteínas son más fácilmente degradadas y desnaturalizadas bajo condiciones alcalinas (Rani et al., 2012), estando más afectada por cambios de pH, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Rani et al. (2012). Sin embargo, las paredes de *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp. son más robustas y están formadas principalmente por polisacáridos, que son más resistentes a la hidrólisis mediante tratamiento alcalino. Así mismo, Mendez et al. (2013; artículo 3.1) observaron mayor solubilización de proteínas (43% aproximadamente) sobre biomasa de *Chlorella vulgaris* cuando aplicaban pH alcalinos (pH 10; 0,4 g NaOH g PS<sup>-1</sup>) combinados con temperatura (120 °C) durante 40 min. Cho et al. (2013) emplearon una mezcla de biomásas de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. tratadas a varios pH alcalinos. En este caso, se alcanzó mayor solubilización de DQO y eficiencia de hidrólisis (20%) a pH 13 frente a pH menores de 9 y 11. Mahdy et al. (2014b) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de álcali (NaOH 0.05, 2 y 5% (g/g) sobre biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. a 50 °C durante 24 y 48 h. Las solubilizaciones de DQO obtenidas (14% y 4,5 % en *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. respectivamente) no variaron significativamente a lo largo del tiempo de exposición al álcali, pero aumentaron ligeramente (18-19% de solubilización) al aplicar la mayor dosis de NaOH para ambas especies de microalgas. En este estudio también se analizó el efecto del pretratamiento sobre la fracción de carbohidratos, y se observó un patrón de solubilización dependiente de la especie. Mientras que para *C. vulgaris* el incremento en la concentración de álcali no afectaba significativamente la solubilización de carbohidratos, en *Scenedesmus* aumentó hasta un 40%. En este caso, estas mayores solubilizaciones no se vieron reflejadas en la producción de CH<sub>4</sub>, donde alcanzaron biodegradabilidades anaerobias del 40-45%. Dados los resultados, el incremento en la solubilización de carbohidratos se atribuyó a

## 1. Introducción

---

la solubilización de exopolímeros más que a una ruptura de la pared celular y liberación de materia orgánica intracelular.

También se han investigado métodos biológicos para romper la estructura de las microalgas como fase previa a la producción de biogás. Estos métodos se presentan como una alternativa prometedora frente al alto consumo energético de otros pretratamientos. Estos pretratamientos incluyen el empleo de enzimas y microorganismos bacterianos/fúngicos que promueven la solubilización de las microalgas. La hidrólisis celular mediada por catalizadores enzimáticos tiene como ventaja la especificidad para atacar cierto tipos de enlaces, induciendo la transformación de un sólo tipo de compuesto y no de otros que se puedan encontrar en el medio de reacción. Además de tratarse de un método no agresivo, puesto que opera en condiciones suaves de pH y temperatura, no genera compuestos inhibitorios. Sin embargo, el alto coste de producción de las enzimas es una limitación para su aplicación en la generación de biocombustibles. Las enzimas más empleadas para la degradación de las paredes celulares son celulasas, hemicelulasas, pectinasas, amilasas y proteasas (Demuez et al., 2015; Mahdy et al., 2014a, 2014c). Los parámetros a tener en cuenta para la optimización del pretratamiento son la dosificación de la enzima, el tiempo de exposición, la temperatura y el pH a los que la enzima en cuestión presenta su máxima actividad. Para reducir los costes asociados con el pretratamiento enzimático se está investigando el empleo de enzimas generadas *in situ*. En el contexto de la digestión anaerobia se emplea la metodología de bioaumentación en la que se utilizan bacterias altamente especializadas para incrementar y mejorar, la capacidad de digestión total de la población bacteriana natural presente (Čater et al., 2015; He et al., 2016). Lü et al. (2013) emplearon la microalga *C. vulgaris* para la producción de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, investigando la hidrólisis de la materia orgánica producida mediante la adición de la especie bacteriana *Clostridium thermocellum*. En su estudio mostraron un incremento en la producción de biogás del 17-24% cuando empleaban condiciones termófilas de digestión (55 °C) en reactores operados en batch.

### 1.3.2. Tratamiento térmico

Los pretratamientos térmicos son aquellos en los que la solubilización de la materia orgánica se realiza mediante la aplicación de calor sobre la biomasa de microalgas. Aunque existen estudios que han empleado temperaturas mayores (Du et al., 2012), el rango de temperaturas más habitual se encuentra entre 50 a 170°C (Marsolek et al., 2014; Passos et al., 2015b; Schwede et al., 2013). Los pretratamientos térmicos se pueden clasificar según la temperatura empleada. Se denominan térmicos, cuando el rango de temperaturas empleado se encuentra por debajo de 100 °C. Cuando las temperaturas empleadas se encuentran por encima de 100 °C se denominan tratamientos hidrotérmicos y se por una disminución controlada y gradual de la presión que se ha generado en el reactor durante el tratamiento. Otro pretratamiento hidrotérmico es el denominado “explosión por vapor” del inglés “*steam explosion*”, en el que se combina el efecto de altas temperaturas(140-170 °C) con una rápida despresurización (Carrère et al., 2015). En este último tipo de pretratamientos la presión generada se libera de forma repentina.

Uno de los primeros estudios sobre pretratamiento térmico de microalgas fue realizado por Chen y Oswald, (1998) que combinaron la temperatura con un tratamiento químico con NaOH, empleando distintos tiempos de exposición. En esta investigación, la eficiencia de este pretratamiento se confirmó al comparar la producción de CH<sub>4</sub> generada con la biomasa sin tratar (0,14 L CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>) y pretratada en las distintas condiciones empleadas. A 100 °C 30 min lograron un aumento de 0,25 L CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>, y 0,3-0,25 L CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> empleando una duración de 8h en el pretratamiento. Se concluyó que el efecto beneficioso de este pretratamiento se debía principalmente a la temperatura empleada, mientras que los parámetros tiempo de exposición y cantidad de biomasa tenían un efecto muy limitado.

Alzate et al. (2012) aplicaron diferentes temperaturas (110, 140 y 170 °C) sobre tres mezclas de distintas microalgas diluidas a una concentración de 9-10 g ST kg<sup>-1</sup>, obteniendo las mayores eficiencias de solubilización de DQO con los tratamientos a 170 °C durante 15 min. Se obtuvo un 32% de solubilización en el caso de la mezcla de *Chlamydomonas* sp., *Scenedesmus* sp.; y *Nannochloropsis* sp. (mezcla A); 63% para la mezcla de microalgas de *Acutodesmus obliquus*, *Oocystis* sp., *Phormidium* y *Nitzschia* sp. (mezcla B); y 40% para biomasa de *Microspora* (mezcla C). A pesar de

## 1. Introducción

---

que estos datos son ligeramente inferiores a los mencionados previamente en el apartado de ultrasonidos, la producción de biogás posterior fue mayor, mostrando una mejora notable en la biodegradabilidad, obteniendo producciones de 398, 307 y 359 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>, para las mezclas A, B y C, respectivamente. En general, la hidrólisis térmica de las mezclas de microalgas era proporcional a la temperatura y produjo más solubilización de la DQO así como mayores producciones de CH<sub>4</sub>.

También se ha analizado el efecto de estos pretratamientos sobre biomasa de *Nannochloropsis gaditana*, antes y después de ser sometida a extracción lipídica (Alzate et al., 2014). En este estudio, ambas biomasas mostraron resultados similares de eficiencia de hidrólisis y de DQO tras la exposición a sonicación y aplicación térmica, presentando eficiencias del 21 y 19 % de solubilización para la sonicación y un 18% tras el tratamiento a 170 °C. A pesar de las similitudes en las eficiencias hidrolíticas observadas entre los dos pretratamientos, fue el térmico el que presentó mejores producciones de CH<sub>4</sub>, incrementando en un 34-39% con respecto al control (300 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>) en el caso de *N. gaditana* sin extracción lipídica. Una vez más, este estudio demostró la ausencia de relación entre la solubilización de materia orgánica en términos de DQO y la producción de CH<sub>4</sub>.

González-Fernández et al. (2012c) evaluaron el tratamiento a temperaturas suaves (70 y 90 °C) sobre biomasa de *Scenedesmus* sp. y su posterior uso como sustrato en la producción de CH<sub>4</sub>. Estos investigadores obtuvieron solubilizaciones de DQO similares a ambas temperaturas, observando un aumento de 4 y 4,4 veces (70 y 90 °C, respectivamente) con respecto a la biomasa sin tratar (aproximadamente un 7% de solubilización). No obstante en este estudio se demuestra la gran resistencia que la pared de esta microalga ofrece a la degradación. Este incremento en la materia orgánica soluble se vio reflejado en la posterior producción de CH<sub>4</sub> únicamente para la biomasa tratada a mayor temperatura, donde observaron un incremento de 2,2 veces con respecto a la biomasa sin tratar (76 ml CH<sub>4</sub> ·g DQO<sup>-1</sup>). No se observaron diferencias significativas en el caso de la biomasa pretratada a 70 °C. En un estudio posterior empleando biomasa de *Scenedesmus* sp. pretratada a 90 °C, se obtuvieron solubilizaciones de materia (DQO) de un 6-7% (González-Fernández et al., 2013) y emplearon la biomasa tratada como sustrato para la producción de CH<sub>4</sub> en reactores CSTR operados en semi-continuo. En este estudio consiguieron aumentar la producción de CH<sub>4</sub> entre 2,9 y 3,4 veces con respecto a la biomasa sin tratar,

## 1. Introducción

---

empleando cargas orgánicas (VCO) de 1 y 2.5 Kg tDQO · m<sup>-3</sup>·dia<sup>-1</sup>, respectivamente. No obstante, y a pesar de las eficiencias observadas respecto a la biomasa sin tratar, las producciones obtenidas en semi-continuo distaron de los valores observados en batch, siendo estos últimos 1,54 veces mayor. Cabe destacar que los estudios de biodegradabilidad en condiciones de operación en semi-continuo con biomasa de microalgas son muy escasos (Tabla 1.3). Una evaluación más detallada de los efectos que ejerce el pretratamiento sobre la producción de CH<sub>4</sub> y la estabilidad de los reactores alimentados con biomasa pretratada es imprescindible para su optimización.

Marsolek et al. (2014) realizaron un estudio sobre *Nannochloropsis oculata* a una concentración de 66-78 g ST · L<sup>-1</sup> en el que emplearon temperaturas en un rango de 30 a 90 °C, así como diferentes tiempos. En este caso, se obtuvo un aumento en la producción de CH<sub>4</sub> a la máxima temperatura ensayada sin necesidad de aumentar por encima de los 40 min el tiempo de reacción. Contrariamente a lo obtenido en otros estudios mencionados anteriormente, esta investigación muestra una correlación significativa entre la solubilización en términos de DQO y la producción de biogás. En este caso la temperatura empleada fue menor que la utilizada por Alzate et al. (2012, 2014), lo que sugiere la formación de otros compuestos por reacciones secundarias que se producen a altas temperaturas. La presencia de estos compuestos puede explicar que, a pesar de aumentar la solubilización del material orgánico de la microalga, puedan ser inhibitorios de la digestión anaerobia.

La variabilidad de resultados encontrados en la bibliografía sobre el pretratamiento térmico de la biomasa algal deja constancia de la importancia que tiene la naturaleza de la biomasa empleada, así como las diferencias que pueden surgir con respecto a los parámetros empleados en el pretratamiento.

Tabla 1.3. Relación de pretratamientos y producciones de CH<sub>4</sub>.

Pretratamiento	Biomasa	Hidrólisis de materia orgánica	Modo de operación	Producción de metano	Estudio
<b>Biológico</b>					
Onozuka R-10 + Macerozyme R-10	<i>C. vulgaris</i>	n.d.	BMP	414 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	(Wieczorek et al., 2014)
Viscozyme		28% tDQO solubilizada		306 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	
Alcalasa	<i>C. vulgaris</i>	56% tDQO solubilizada	BMP	439 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	
75 °C+Viscozyme + Alcalasa		67% tDQO solubilizada		457 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	(Mahdy et al., 2014a)
Viscozyme		48% tDQO solubilizada		392 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	
Alcalasa	<i>C. reinhardtii</i>	72% tDQO solubilizada	BMP	445 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	
75 °C+Viscozyme + Alcalasa		84% tDQO solubilizada		478 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>C. vulgaris</i>	n.d.	BMP	403 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	(Lü et al., 2013)
<i>Bacillus icheniformis</i>	<i>C. vulgaris</i>	43% incremento en sDQO	BMP	416 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	(He et al., 2016)
<b>Ultrasonidos</b>					
39, 117; 234 KJ g VS <sup>-1</sup>	<i>Chlorella</i> + <i>Scenedesmus</i>	2.1%; 7.8%; 13.4% (en base a DQO)	BMP	356, 368, 385 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	(Cho et al., 2013)
67 MJ kg TS <sup>-1</sup>	Mixture of <i>Monoraphidium</i> sp., <i>Stigeoclonium</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp., <i>Amphora</i> sp.	91% VS (en base a SV)	BMP	196.4 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	(Passos et al., 2014a)
10.000; 27.000; 40.000; 57.000 kJ kg ST <sup>-1</sup>	<i>N. salina</i>	17%, 17%, 19%, 21% tDQO solubilizado	BMP	281, 274, 342, 361 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	(Alzate et al., 2014)
	40% <i>Chlamydomonas</i> sp. 20% <i>Scenedesmus</i> sp. 40% <i>Nannochloropsis</i> sp	14%, 28%, 30%, 32% tDQO solubilizado		310, 309, 309, 305 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	
10.000; 27.000; 40.000; 57.000 kJ kg ST <sup>-1</sup>	58% <i>Acutodesmus obliquus</i> , 36% <i>Oocystis</i> sp., 1% <i>Phormidium</i> , 5% <i>Nitzschia</i> sp.	24%, 48%, 53%, 60% tDQO solubilizado	BMP	209, 214, 223, 223 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	(Alzate et al., 2012)
	<i>Microspora</i>	30%, 56%, 57%, 62% tDQO solubilizado		314, 301, 301, 310 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	
130 MJ kg ST <sup>-1</sup>	<i>Scenedesmus</i> sp.	8% tDQO solubilizado	BMP	275 mL CH <sub>4</sub> :g SV <sup>-1</sup>	(González-Fernández et al., 2012b)

# 1. Introducción

Pretratamiento	Biomasa	Hidrólisis de material orgánica	Modo de operación	Producción de metano	Estudio
<b>Microondas</b>					
65.400 KJ kg ST <sup>-1</sup>	<i>Scenedesmus</i> sp. + <i>Chlorella</i> sp	8% (en base a SV)	BMP	210 mL CH <sub>4</sub> , g SV <sup>-1</sup>	(Passos et al., 2013b)
70 MJ kg VS <sup>-1</sup>	<i>Monoraphidium</i> sp., <i>Stigeoclonium</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp	n.d n.d	CSTR	TRH 15 días 170 mL CH <sub>4</sub> , g SV <sup>-1</sup> TRH 20 días 270 mL CH <sub>4</sub> , g SV <sup>-1</sup>	(Passos et al., 2014b)
<b>Químico</b>					
	<i>Nannochloropsis</i> sp	10% tDQO solubilizado		Inhibición	
NaOH 21 g L <sup>-1</sup>	<i>Chlorella</i> sp	10% tDQO solubilizado	BMP	No presenta incremento remarcable	(Bohutskyj et al., 2014)
	<i>Tetraselmis</i> sp	32.2% tDQO solubilizado		No presenta incremento remarcable	
NaOH pH 9; pH 11; pH 13	<i>Chlorella</i> + <i>Scenedesmus</i>	5.4; 5.0; 20% tDQO solubilizado	BMP	363, 327, 213 mL CH <sub>4</sub> , g SV <sup>-1</sup>	(Cho et al., 2013)
<b>Termoquímico</b>					
	<i>Nannochloropsis</i> sp	50% tDQO solubilizado		40% incremento	
NaOH 21 g L <sup>-1</sup> , 121 °C, 30 min	<i>Chlorella</i> sp	63% tDQO solubilizado	BMP	30% incremento	(Bohutskyj et al., 2014)
	<i>Tetraselmis</i> sp	45% tDQO solubilizado		No presenta incremento remarcable	
NaOH (0.05, 2, 5 % (p/p))+ 50 °C 24h	<i>Chlorella vulgaris</i>	16,16,18 % tDQO solubilizado / 15, 17, 9 % carbohidratos solubilizados	BMP	115-150 mL CH <sub>4</sub> , g DQO in <sup>-1</sup>	(Mahdy et al., 2014b)
	<i>Scenedesmus</i> sp	4, 5, 16% tDQO solubilizado / 14, 26, 40 % carbohidratos solubilizados	BMP	150-165 mL CH <sub>4</sub> , g DQO in <sup>-1</sup>	
NaOH pH 10, 120 °C 20-40 min	<i>Chlorella vulgaris</i>	5-veces carbohidratos solubles/1.7-1.9 veces proteínas solubles	BMP	238-240 mL CH <sub>4</sub> , g DQO in <sup>-1</sup>	(Mendez et al., 2013)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 2, 120 °C, 20-40 min		5-7 veces carbohidratos solubles/ ligera solubilización de proteínas	BMP	222-228 mL CH <sub>4</sub> , g DQO in <sup>-1</sup>	

# 1. Introducción

Pretratamiento	Biomasa	Hidrólisis de materia orgánica	Modo de operación	Producción de metano	Estudio
<b>Térmico</b>					
50 °C; 80 °C; 120 °C	<i>Chlorella</i> + <i>Scenedesmus</i>	1.5%; 16.9%; 28.9%	BMP	351, 384, 405 mL CH <sub>4</sub> ;g SV <sup>-1</sup>	(Cho et al., 2013)
110 °C; 140 °C; 170 °C, 15 min	<i>N. gaditana</i>	4%, 7%, 18% tDQO solubilizado	BMP	399, 417, 403 mL CH <sub>4</sub> ;g SV <sup>-1</sup>	(Alzate et al., 2014)
	40% <i>Chlamydomonas</i> sp, 20% <i>Scenedesmus</i> sp; 40% <i>Nannochloropsis</i> sp	9%, 16%, 32% tDQO solubilizado	BMP	323, 362, 398 mL CH <sub>4</sub> ;g SV <sup>-1</sup>	
110 °C; 140 °C; 170 °C, 15 min	58% <i>Acutodesmus obliquus</i> , 36% <i>Oocystis</i> sp., 1% <i>Phormidium</i> , 5% <i>Nitzschia</i> sp.	22%, 37%, 63% tDQO solubilizado	BMP	219, 260, 307 mL CH <sub>4</sub> ;g SV <sup>-1</sup>	(Alzate et al., 2012)
	<i>Microspora</i>	38%, 39%, 40% tDQO solubilizado	BMP	413, 382, 359 mL CH <sub>4</sub> ;g SV <sup>-1</sup>	
120 °C 20 min	<i>Chlorella vulgaris</i>	Incremento de 4 veces en carbohidratos	BMP	180 mL CH <sub>4</sub> ;g DQO in <sup>-1</sup>	(Mendez et al., 2013)
120 °C 40 min		Incremento de 4.5 veces en carbohidratos	BMP	267 mL CH <sub>4</sub> ;g DQO in <sup>-1</sup>	
No tratado		no solubilización	CSTR TRH 15 días	VCO 1 kg tDQO m <sup>-3</sup> día <sup>-1</sup> 33 mL CH <sub>4</sub> ;g SV <sup>-1</sup>	(González-Fernández et al., 2013)
90 °C, 1 h	<i>Scenedesmus</i> sp	6-7% tDQO solubilizado		VCO 1 kg tDQO m <sup>-3</sup> día <sup>-1</sup> 97 mL CH <sub>4</sub> ;g SV <sup>-1</sup> VCO 2.5 kg tDQO m <sup>-3</sup> día <sup>-1</sup> 111 mL CH <sub>4</sub> ;g SV <sup>-1</sup>	
30 °C; 60 °C; 90 °C, 4 h		Incremento de 1,3 veces sDQO (90 °C)	BMP	283, 269, 391 mL CH <sub>4</sub> ;kg SV <sup>-1</sup>	(Marsolek et al., 2014)
1h; 3.5h; 12 h, 90 °C.	<i>N. oculata</i>	Incremento de 1,4 veces sDQO (12 h)	BMP	407, 434, 436 mL CH <sub>4</sub> ;kg SV <sup>-1</sup>	
100 °C; 2 h/ 8 h	<i>N. salina</i>	22% / 39% disminución numero de células	BMP	0,5 m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> ;kg SV <sup>-1</sup>	(Schwede et al., 2013)
			BMP		





## ***2. Objetivos***



### 2.1. Justificación de la Tesis

La investigación y desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de energía y biocombustibles a partir de fuentes renovables es una de las prioridades establecidas por la Comisión Europea en el Plan Estratégico de Investigación de Energía. Este hecho se justifica por el aumento constante de la demanda global de energía, especialmente en el sector del transporte, que es abastecida en su mayor parte mediante combustibles fósiles. Esto conlleva al agotamiento de las reservas naturales, así como una creciente emisión de gases de efecto invernadero.

Durante el siglo pasado, el CH<sub>4</sub> ha sido uno de los combustibles más utilizados para calefacción y la generación de energía eléctrica. La mayor parte del CH<sub>4</sub> utilizado en la sociedad actual se presenta en forma de gas natural. El biogás es un gas producido por bacterias durante el proceso de biodegradación de material orgánico en condiciones anaerobias que supone una alternativa renovable que podría reemplazar parcialmente el gas natural. La producción de biogás por descomposición anaeróbica es un modo considerado útil para tratar residuos biodegradables, ya que produce un combustible de valor además de generar un efluente que puede aplicarse como acondicionador de suelo o abono genérico. Además de los residuos agroindustriales habituales como sustratos en la digestión anaerobia (agroalimentarios, lodos de depuradora, etc.), en los últimos años existe un interés creciente por el empleo de microorganismos fotosintéticos como materia orgánica para la obtención de biogás. La producción de este tipo de biomasa no sólo sería aplicable como sustrato de la digestión anaerobia para la generación de biogás si no que, dada su capacidad fotosintética, pueden ser una herramienta eficiente para la mitigación de GEIs (puesto que asimilan dióxido de carbono durante la fotosíntesis) y producción de oxígeno.

Así mismo, los microorganismos fotosintéticos están adquiriendo un papel cada vez más relevante en los procesos de tratamiento de aguas residuales debido a su gran potencial para la eliminación/recuperación de contaminantes. En este sentido, los contaminantes del agua residual (que deben eliminarse antes de que el agua pueda ser vertida a los cauces naturales), pueden utilizarse como nutrientes para el cultivo de microorganismos fotosintéticos.

De este modo, el cultivo de microalgas en aguas residuales es un proceso de biorremediación que puede combinarse con la producción de biocombustibles a partir

## **2. Objetivos**

---

de esta biomasa algal mediante digestión anaerobia. Sin embargo, uno de los principales problemas asociados al uso de esta biomasa en la digestión anaerobia es la baja digestibilidad de esta biomasa que hace necesario el empleo de pretratamientos que aseguren el aprovechamiento de toda la materia orgánica. Las paredes celulares de algunas microalgas están compuestas por polímeros que les confieren alta resistencia frente a la degradación anaerobia. Además, la composición química de estos microorganismos presenta una relación de C/N baja debido a su alto contenido proteico, lo cual puede conllevar una acumulación de compuestos nitrogenados en el reactor anaerobio disminuyendo su eficiencia. La distribución macromolecular de las microalgas (carbohidratos, proteínas y lípidos) influye de manera determinante en la producción de biogás y este puede variar en función de las condiciones empleadas en el cultivo. Por todo ello, para optimizar la producción de biogás a partir de microalgas es necesario seguir avanzando en la investigación de los factores que afectan su crecimiento y composición, así como su degradación mediante el proceso de digestión anaerobia.

### 2.2. Objetivos de la Tesis Doctoral

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general el estudio de la producción de biogás a partir de microorganismos fotosintéticos (microalgas y cianobacterias), evaluando su potencial metanogénico con y sin el empleo de pretratamientos. Así mismo se evaluó su capacidad de depuración y su crecimiento sobre efluentes residuales.

Para alcanzar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos.

- 1) Estudio del efecto de pretratamientos térmicos y termoquímicos sobre la solubilización de la materia orgánica de biomasa de microalgas y sus diferentes componentes macromoleculares. Evaluación de la producción de CH<sub>4</sub> mediante digestión anaerobia a partir de la biomasa pretratada.
- 2) Selección del pretratamiento más adecuado para la producción de biogás y análisis de su contribución al balance energético global del proceso: evaluación del efecto del pretratamiento térmico a altas concentraciones de biomasa.
- 3) Estudio del proceso de digestión anaerobia para la producción de biogás en modo de alimentación semi-continuo a partir de biomasa de microalgas pretratadas térmicamente: identificación de posibles inhibiciones.
- 4) Análisis de la evolución de las poblaciones microbianas provenientes de los digestores anaerobios alimentados con biomasa de microalgas pretratadas y sin pretratar.
- 5) Empleo de bacterias fotosintéticas (cianobacterias) en el tratamiento de aguas residuales y su posterior valorización mediante digestión anaerobia como alternativa a las microalgas. Análisis comparativo del crecimiento en condiciones óptimas de cultivo (medio sintético) y en aguas residuales en cultivos en batch y en semi-continuo.

### 2.3. Desarrollo de la Tesis

Basándose en los objetivos expuestos anteriormente, la presente Tesis se ha desarrollado en una compilación de artículos publicados con el análisis de los resultados científicos más relevantes obtenidos durante el trabajo de investigación realizado.

Para lograr los objetivos 1 y 2, se empleó biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* para la evaluación de una selección de pretratamientos, para los cuales se aplicaron reactivos ácidos o alcalinos a pH definidos, así como pretratamientos térmicos a distintos tiempos de reacción, y sus combinaciones. De este modo, se analizó el efecto producido sobre la solubilización de materia orgánica, en términos de carbohidratos y proteínas en cada caso, con respecto a la composición presentada por la misma biomasa sin pretratar. La biomasa resultante tras los tratamientos se empleó para la producción de CH<sub>4</sub> analizándose las posibles inhibiciones derivadas del pretratamiento de la biomasa de microalgas. El pretratamiento más favorable fue un pretratamiento térmico a 120 °C durante 40 minutos de reacción. Se procedió a optimizar las condiciones de dicho pretratamiento, mediante la variación de tiempos de reacción y empleo de temperaturas superiores con el objetivo de maximizar la producción de CH<sub>4</sub> (**Artículos 1 y 2**).

Tras un análisis energético preliminar sobre el coste del pretratamiento térmico, se comprobó la necesidad de aumentar la concentración de biomasa a pretratar para intentar alcanzar un balance energético más positivo. En este sentido, el **artículo 3** muestra los resultados obtenidos en el estudio del efecto que tiene emplear diferentes concentraciones de biomasa en el pretratamiento térmico sobre la producción de CH<sub>4</sub>. Una vez verificada la posibilidad de emplear el pretratamiento asumiendo cargas mayores de biomasa en ensayos de potencial metanogénico en modo discontinuo, se procedió a investigar la posibilidad de emplear el pretratamiento térmico para alimentar un reactor anaerobio operado en semi-continuo. La evaluación se realizó en términos de rendimiento de CH<sub>4</sub> y eliminación de materia orgánica, así como la mineralización de nitrógeno producida durante la digestión del sustrato (**Artículo 4**).

Debido a las bajas concentraciones de CH<sub>4</sub> obtenidas en los reactores CSTR, se analizaron las poblaciones anaerobias de los reactores operados en modo semi-continuo mediante secuenciación de ADN empleando métodos de pirosecuenciación

## 2. Objetivos

---

(**Artículo 5**). Las poblaciones de microorganismos que conforman el fango anaerobio pueden ser de gran relevancia puesto que sus funciones metabólicas son determinantes para metabolizar el sustrato y la producción de CH<sub>4</sub>.

Como alternativa al empleo de microalgas, cuyo uso supone una etapa y un coste adicional en el proceso de digestión anaerobia debido a la necesidad de una etapa de pretratamiento, se planteó la utilización de cianobacterias (**Artículos 6 y 7**). De forma similar a las microalgas, estos microorganismos realizan también la fotosíntesis, pero presentan diferentes características estructurales. Este hecho es debido a su similitud a las paredes de bacterias Gram-negativas, cuyas paredes están formadas por peptidoglicano. De este modo, y como parte del objetivo 5, se evaluaron varias cianobacterias en términos de tasa de crecimiento y productividad en condiciones de cultivo favorables (medio de cultivo sintético) y el potencial de producción de CH<sub>4</sub> de dichas biomasas generadas. Finalmente, se evaluaron las especies con mejores rendimientos obtenidos previamente (en medio sintético), para estudiar su crecimiento en condiciones de limitación de nutrientes, empleando para ello agua residual urbana, y comparar su crecimiento con una microalga verde modelo (*Chlorella vulgaris*) en las mismas condiciones. De este modo, se analizó su capacidad de biorremediación en términos de eliminación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, tanto en condiciones de cultivo en batch como en semi-continuo. Así mismo, se evaluó el potencial de producción de CH<sub>4</sub> de la biomasa obtenida bajo condiciones de crecimiento en semi-continuo.



### ***3. Resultados publicados***



# **Artículo 1**

## **Enhancing methane production of Chlorella vulgaris via thermochemical pretreatments**

Lara Mendez<sup>a</sup>, Ahmed Mahdy<sup>a,b</sup>, Rudolphus A. Timmers<sup>c</sup>, Mercedes Ballesteros<sup>a,d</sup>,  
Cristina González-Fernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup>IMDEA Energy, Avda. Ramón de la Sagra 3, 28935 Móstoles, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Agricultural Microbiology, Zagzig University, 44519 Sharkia, Egypt

<sup>c</sup> Department of Chemical and Energy Technology, Rey Juan Carlos University, 28933 Móstoles, Spain

<sup>d</sup> CIEMAT, Avda. Complutense, 28040 Madrid, Spain

*Bioresource Technology journal*, 149 (2013) 136–141

Doi: 10.1016/j.biortech.2013.08.136

Reproduced with permission from Elsevier

ABSTRACT

To enhance the anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*, thermochemical pretreatments were conducted. All pretreatments markedly improved solubilisation of carbohydrates. Thermal treatments and thermal treatments combined with alkali resulted in 5-fold increase of soluble carbohydrates while thermal treatment with acid addition enhanced by 7-fold. On the other hand, proteins were only solubilized with thermo-alkaline conditions applied. Likewise, all the pretreatments tested improved methane production. Highest anaerobic digestion was accomplished by thermal treatment at 120 °C for 40 min without any chemical addition. As a matter of fact, hydrolysis constant rate was doubled under this condition. According to the energetic analysis, energy input was higher than the extra energy gain at the solid concentration employed. Nevertheless, higher biomass organic load pretreatment may be an option to achieve positive energetic balances.

Keywords: Microalgae; Methane; Pretreatment; Anaerobic digestion; *Chlorella vulgaris*

## 1. Introduction

The rapidly growing bioenergy industry is driven by government policies promoting the use of low carbon energy and waste recycling. Currently, microalgae biomass is given full attention to meet this target (Parmar et al., 2011). Due to their high photosynthetic efficiencies (Cuaresma et al., 2011), high growth rates and ability to grow in saline and wastewater (Molinuevo-Salces et al., 2010), microalgae biomass appears as an optimum feedstock for bioenergy production. Opposite to biodiesel and bioethanol production, where only small fractions of the cell (lipids or sugars) are used, methane production may use all three macromolecules (including proteins in addition to the lipids and sugars) as a substrate. In this manner, methane produced during anaerobic digestion seems to be the most straightforward process.

Microalgae composition affects markedly their anaerobic digestion potential. Even though their composition is strain specific, microalgae organic matter is mainly composed of proteins and carbohydrates (González-Fernández et al., 2010). Proteins and carbohydrates specific methane yield range 0.851 and 0.415 L CH<sub>4</sub> •g VS<sup>-1</sup>, respectively (Angelidaki and Sanders, 2004). Although lipids exhibit the highest energy content (1.014 L CH<sub>4</sub> •g VS<sup>-1</sup>), this macromolecule represent a small fraction of microalgae biomass. Not only the chemical composition determines microalgae anaerobic digestion, the cell wall was pointed out repetitively as one of the main issues for an efficient digestion (González-Fernández et al., 2012a, 2012b, 2013). Microalgae cells are protected by a semi-rigid structure that hinders the hydrolysis of organic matter. In order to release the intracellular organics and increase the efficiency of the digestion process, microalgae cell walls should be disrupted prior anaerobic digestion. Pretreatments to open up the cell wall structure have been widely studied in lignocellulosic biomass, however there is not so much information regarding the effect of those pretreatments on microalgae. Even though microalgae does not contain lignin which would render this substrate easier to degrade, this biomass exhibit some other compounds, such as algaenans and sporopollenin, which confer the cell wall a high resistance to bacterial attack (Burczyk and Dworzanski, 1988). Most pretreatments are done through thermal, physical or chemical (González-Fernández et al., 2012a, 2012c; Passos et al., 2013). Thermal pretreatments affect weak hydrogen bonds when mild temperatures are applied while cellulose and hemicellulose solubilizes when higher

temperatures are employed (Garrote et al., 1999; González-Fernández et al., 2012c). Physical pretreatment involves the reduction of particle size and increase surface/volume ratio available for hydrolysis. Chemical pretreatment solubilize polymers favouring microbial degradation. However, the drawbacks of using concentrated chemicals include material corrosion and formation of by-products that could result in digestion inhibition. The purpose of this study was to investigate the effect of thermal pretreatment on the anaerobic biodegradability of *Chlorella vulgaris*. In an attempt of further enhancing *C. vulgaris* biodegradability, sodium hydroxide and sulphuric acid were also combined with the thermal pretreatment. Special attention was focused on the solubilisation of proteins and carbohydrates to identify if the solubilisation of any of these macromolecules could be linked to the methane production.

## 2. Methods

### 2.1. Microorganisms

#### 2.1.1. Substrate and pretreatments

*Chlorella vulgaris* was grown in a lab-scale photobioreactor of 50 L. *C. vulgaris* was cultivated in mineral salt medium. This medium was composed of (per liter of distilled water): 0.4 g NH<sub>4</sub>Cl, 75 mg MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 25 mg CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 11.42 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4.98 mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50 mg EDTA, 31 mg KOH, 0.175 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25mg NaCl, 2.42 g Tris (diluted together with 10 mL diluted acetic acid (1:20)), and 2mL of a trace elements solution (L<sup>-1</sup>): 8.82 g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.44 g MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.71 g MoO<sub>3</sub>, 1.57 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.49 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O. Culture broth was maintained at 25 °C under continuous agitation supplied by air bubbling. The alga was cultivated under continuous illumination. *C. vulgaris* characterization is shown in Table1. Microalgae suspension was adjusted to 24.9 (±2.1) g tCOD · L<sup>-1</sup>.

**Table 1.** *Chlorella vulgaris* characterisation used as substrate

	Average (±standard deviation)
<b>TS (g·L<sup>-1</sup>)</b>	16 ± 0.1
<b>Total COD (g·L<sup>-1</sup>)</b>	26.2 ± 0.2
<b>Total carbohydrates (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	177.1 ± 23.2
<b>Soluble carbohydrates (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	25.6 ± 3.5
<b>Total proteins (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	638.7 ± 40.3
<b>Soluble proteins (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	184.5 ± 14.3

Acid and alkali pretreatment was carried out by adding 4M sulphuric acid or 4M sodium hydroxide stepwise until the required pH was achieved as measured by an electronic probe (Crison). Once the required pH was achieved, namely pH 2 for the acid and pH 10 for the alkali treatment, the samples were subjected to the thermal pretreatment. An autoclave (PRESOCLAVE-II) was used to achieve the desired temperature (120 °C). Microalgae biomass underwent thermal pretreatment for 20 and 40 min. The time at which the desired temperature was reached in the autoclave was considered as time 0. After thermal pretreatment, all the samples were neutralised and subsequently loaded into the serum flasks. Likewise, biomass samples without any pretreatments were also evaluated. All the trials were conducted in duplicates. After the thermochemical pretreatments, solubilisation of carbohydrates was calculated as:

$$\left[ \frac{sCH - sCH_0}{tCH_0 - sCH_0} \right] * 100 \quad (1)$$

where sCH refers to soluble carbohydrates after pretreatment, tCH refers to total carbohydrates and the subscript “o” stands for before pretreatment. Same calculation was applied for proteins solubilisation.

### 2.1.2. *Inoculum*

Anaerobic sludge employed as inoculum was collected at the wastewater treatment plant of Valladolid (Spain). Anaerobic bio- mass presented a total solids (TS) concentration of 16 g·L<sup>-1</sup> and VS (volatile solids)/TS of around 67%.

### 2.2. Anaerobic digestion

#### 2.2.1. *Biomethane production assay*

Anaerobic biodegradability test was performed in serum bottles. Fermentation broth quantities were calculated to get a final volume of 80 mL of liquid mixture, allowing a headspace for the gas of approximately 40 mL. To avoid digestion imbalances, the substrate COD/biomass VS ratio was set at 0.5 (González-Fernández and García-Encina, 2009). The pH was adjusted to 7.5 in all cases. After the set-up of each reactor, the headspace was flushed with helium. Then, the reactors were placed in a constant room temperature at 35 °C and constant agitation provided by a shaker (120 rpm). The volume of biogas produced by the substrates was calculated by measuring the pressure of the bottle's headspace. For the determination of endogenous methane production, blanks containing only anaerobic sludge were run. The incubation time was approximately 30 days.

#### 2.2.2. *Hydrolysis constant in the biochemical methane potential*

Hydrolysis is frequently the limiting step in the anaerobic digestion of complex biomasses (microalgae and lignocellulosic material). Assuming the overall anaerobic digestion process conforms to first-order kinetics, the hydrolysis rate constant was determined by using the following model (Eq. (2)):

$$B(t) = B_0(1 - \exp(-k_h t)) \quad (2)$$

where  $B(t)$  is the cumulative methane yield (mL CH<sub>4</sub> ·g COD initial<sup>-1</sup>) obtained experimentally,  $B_0$  is the ultimate methane yield,  $K_h$  (d<sup>-1</sup>) is the first order kinetic constant and  $t$  (d) is the digestion time.

#### 2.2.3. *Energy requirement consideration*

In an attempt to estimate whether the pretreatment cost would be balanced by the extra gains obtained by the improved methane production from the pretreatment, an energy requirement study was carried out. The specific heat requirement for the thermal pretreatments was calculated according to Eq. (3):

$$H_s = \left( \left( \frac{1}{TS} \right) * C_p * (T_f - T_i) \right) \quad (3)$$

where  $H_s$  is the specific heat required for the thermal pretreatment,  $TS$  is the total solid content of the substrate pretreated,  $C_p$  is the specific heat capacity of water, and  $T_f$  and  $T_i$  refers to the final and initial temperature of the pretreatments, respectively. The electric and thermal efficiencies of the hypothetical combined heat and power systems using the biogas produced were assumed to be 40%.

### 2.3. Analytical determination

Total solids (TS), volatile solids (VS) and total Kjeldahl nitrogen (TKN) were measured according to Standard Methods (Eaton et al., 2005). Proteins were calculated by multiplying TKN results by 5.95 (González López et al., 2010). The carbohydrate content was analysed by phenol-sulphuric acid method (DuBois et al., 1956). Soluble fractions were obtained after centrifugation of microalgae cultivation broth (mini-spin Eppendorf, 15 min, 12,100 x g). Sugars concentration was quantified by high-performance liquid chromatography in an Agilent 1260 chromatograph equipped with a refractive index detector. A CarboSep CHO-682 carbohydrate analysis column (Transgenomic, San Jose, CA) operated at 80 °C with ultrapure water as a mobile phase (0.4 mL·min<sup>-1</sup>) was used for the separation. COD was analysed by a colorimetric method using Hach 0–1500 mg·L<sup>-1</sup> vials. Biogas composition was determined by gas chromatography (Agilent 7820A) equipped with HP-PLOT Q column and thermal conductivity detector.

## 3. Results and discussion

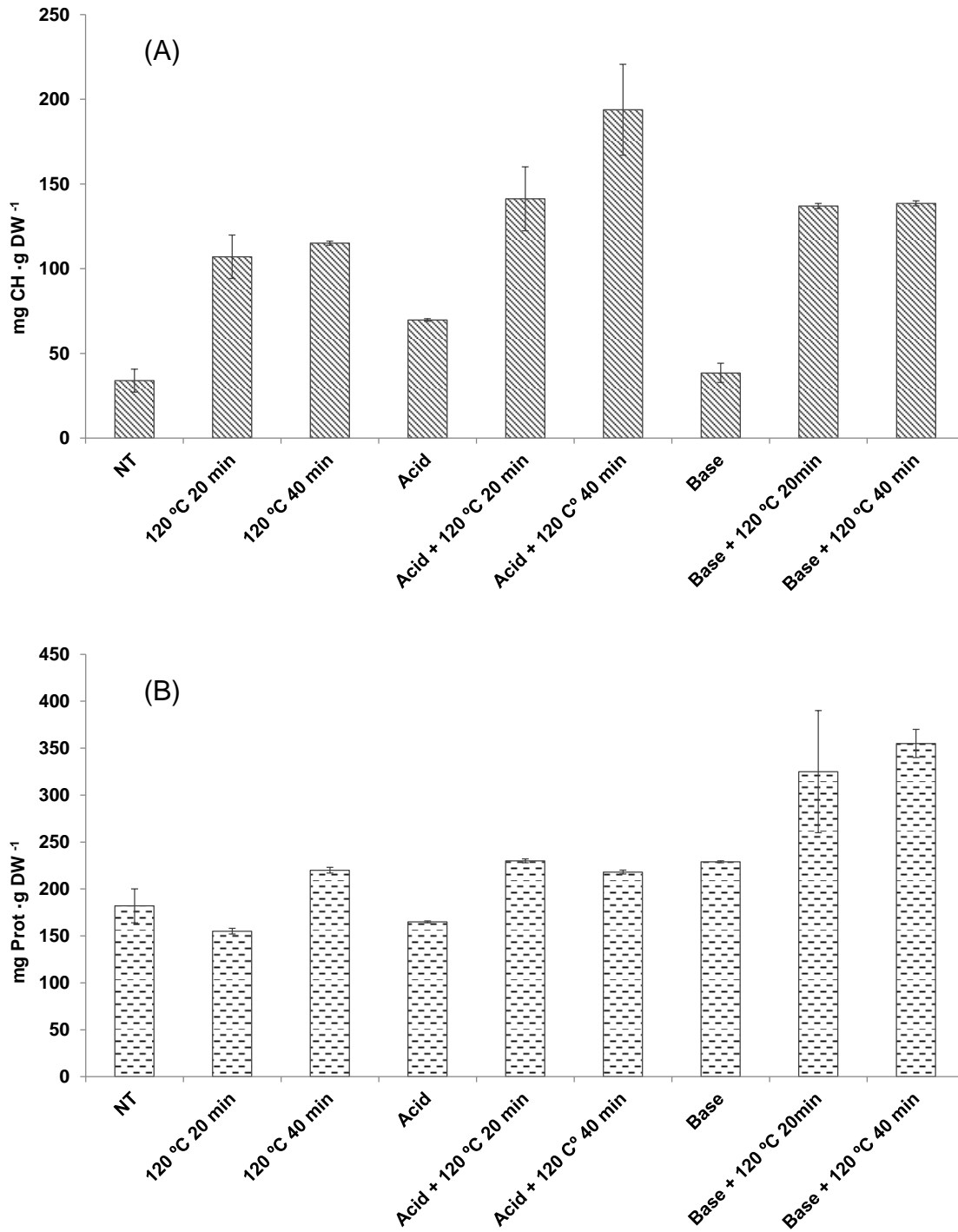
### 3.1. Organic matter solubilisation

The effects of the different pretreatments (thermal and thermochemical) were determined in terms of carbohydrates and proteins solubilisation. These two macromolecules were chosen since both components are key-macromolecules for an appropriate anaerobic digestion. Carbohydrates are forming part of the cellulose-based cell wall and hence limiting the first hydrolysis step of anaerobic digestion. Likewise degradation of proteins may result in high ammonia concentration. This later feature together with high pH may inhibit anaerobic digestion.

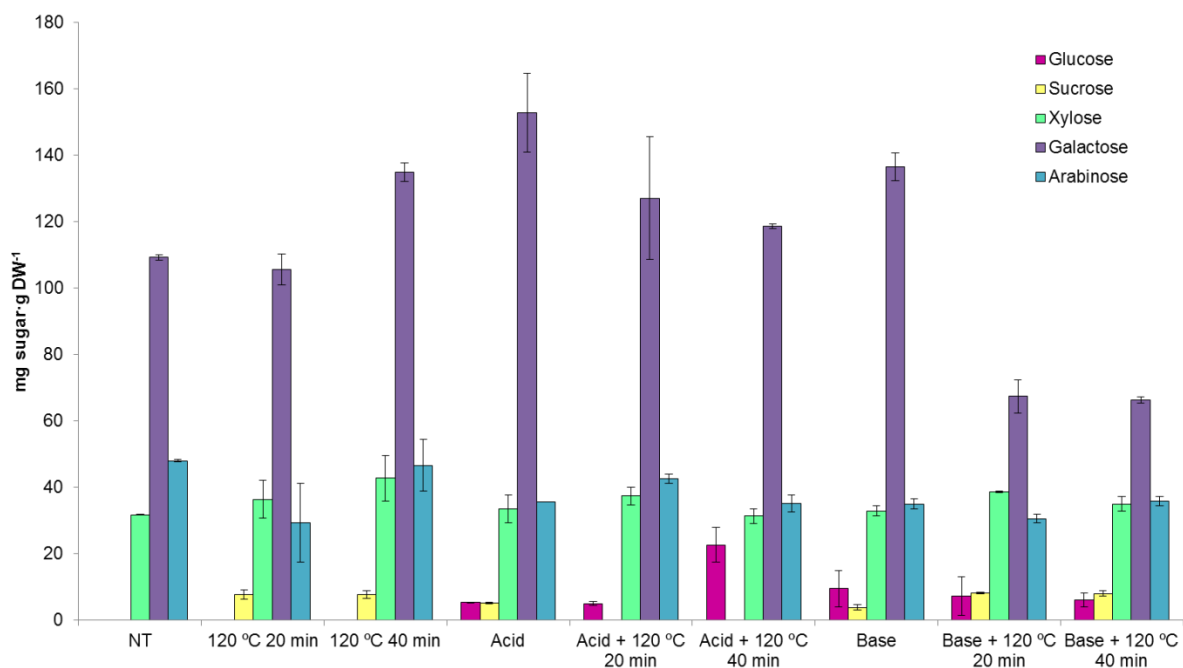
### 3.1.1. Carbohydrates solubilisation

Organic matter release is due to the disruption of chemical bonds of the cell walls and membranes. Fig. 1.A shows the carbohydrate concentration in the soluble phase obtained after the different pretreatment conditions tested. Carbohydrate concentration in the soluble phase increased with the thermochemical pretreatments. Subjecting the biomass to 120 °C for 20 and 40 min increased 4 and 4.5-fold the carbohydrates content in the soluble phase. The addition of sulphuric acid to reach pH 2 enhanced the solubilisation of carbohydrates by 5 and 7-fold for 20 and 40 min of thermal application, respectively. In order to estimate the effect of the acid addition alone, the acidified biomass (not thermally pretreated) was also analysed and exhibited an increase of 2.3-fold. Opposite, the addition of sodium hydroxide alone did not show any relevant carbohydrates solubilisation. When combining the sodium hydroxide with thermal application, carbohydrates were increased by 5-fold regardless the time of thermal application.

In order to identify if cellulose and/or hemicellulose was degraded with those thermochemical pretreatments, the soluble fractions were analysed for monomers (glucose, xylose, arabinose and mannose). Mannose was not detected during any pretreatment. Sugars in the soluble phase of the untreated sample were mainly represented by galactose, arabinose and xylose. Since no cell disruption method was employed for that sample, the presence of these sugars is ascribed to the release of exopolysaccharides. These sugars profile changed slightly upon pretreatments (Fig. 2). With regard to xylose and arabinose, hemicellulose components sugars (Petersson et al., 2007), no changes were recorded despite the pretreatment applied. In this manner, microalgae hemicellulose content was low and not affected by any of the thermochemical pretreatments. This result is in agreement with Zhou et al. (2011) who reported hemicellulose and cellulose content of 10.2% and 35.3% of dry *Chlorella* biomass, respectively.



**Figure 1.** Carbohydrates (A) and proteins (B) solubilised upon the different thermochemical pretreatments tested on *Chlorella vulgaris*.



**Figure 2.** Monomers released upon the different thermochemical pretreatments tested on *Chlorella vulgaris*

When the biomass was subjected to thermal pretreatment small quantities of sucrose were released. This feature was also observed for the alkali and acid pretreatments; however the acid addition combined with thermal pretreatment degraded sucrose and was not present in the soluble fraction. The harsh conditions applied on those two later mentioned pretreatment mediated the degradation of sucrose. Sucrose is the starting substrate for cellulose synthesis (Kimura and Kondo, 2002) since this sugar is located intracellularly and it can be concluded that the pretreatment tested disrupted the microalgae cell wall. Glucose, derived from cellulose, was only present in the soluble phases of the thermochemically pretreated biomasses. These results were expected since the temperature at which hemicellulose start to solubilize is around 150 °C (Garrote et al., 1999) while cellulose is presenting even higher thermochemical stability than hemicellulose (Winandy, 1995). Overall, these monomers identified accounted for approximately 55-70% of the soluble carbohydrates measured by the phenol-sulphuric method.

3.1.2. *Proteins solubilisation*

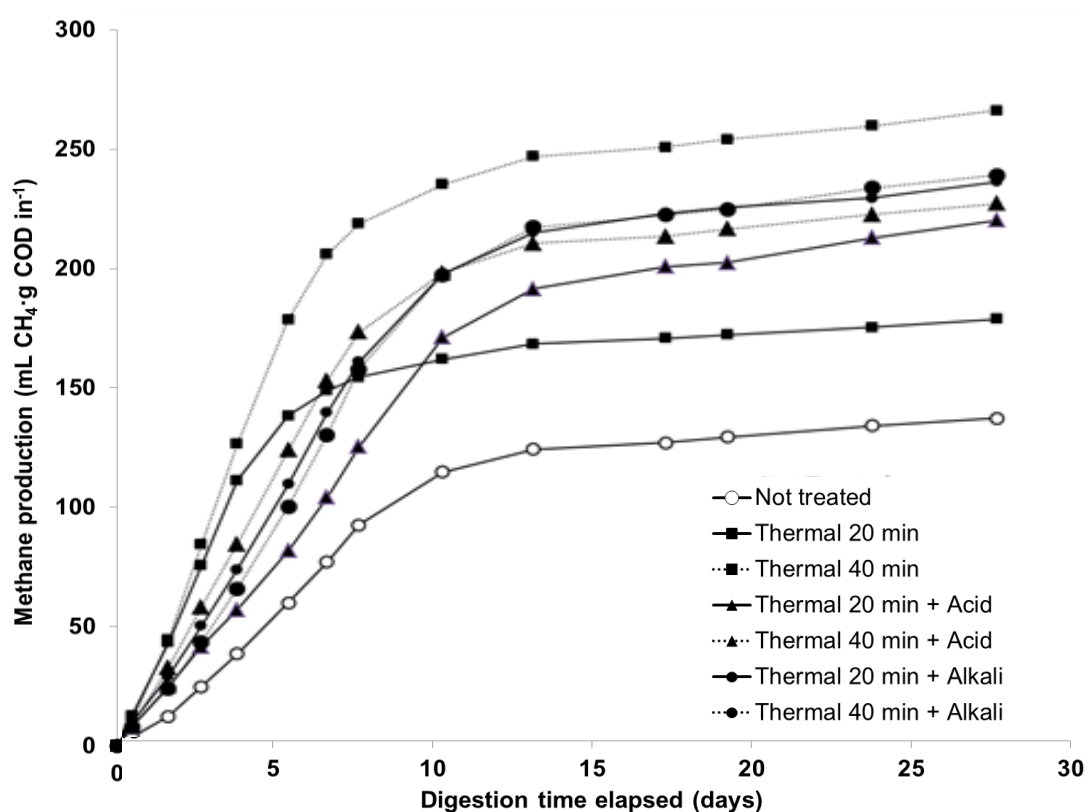
Protein solubilisation showed a different profile than carbohydrates solubilisation (Fig. 1.B). Slight changes in soluble proteins were observed for the thermally pretreated samples and samples in which acid and thermal treatments were combined. More specifically, those pretreatments solubilized around 8% of the particulate proteins. The only remarkable effect was attained for samples in which thermal pretreatments was combined with alkaline conditions. Under this scenario, proteins in the soluble phase were increased by 1.7 and 1.9- fold when pretreating the microalgae for 20 and 40 min, respectively. Similar behaviour was observed in other type of microbial biomass. Spent biomass obtained from an industrial plant resulted in 8-fold protein concentration enhancement when pretreated with 26 g NaOH ·L<sup>-1</sup> (Penaud et al., 1999). Generally, proteins are released to a higher extent compared to carbohydrates under alkaline conditions when pretreating sludge (Liu and Fang, 2002; Rani et al., 2012). Literature regarding other biomasses reported 3-fold increase of proteins concentration when decreasing waste activated sludge pH to 2 (Devlin et al., 2011). In this study, the solubilisation of proteins and carbohydrates was accelerated by the addition of chemicals together with thermal application. Acid conditions prevailed the carbohydrates released into the medium while under alkaline conditions proteins were solubilized in a greater extent. Taking into consideration similar treatments applied to other biomasses, the results obtained for proteins solubilisation under acid concentration were surprising. The low solubilisation obtained was attributed to the occurrence of Maillard reaction. In this context, the available reducing sugars and amino acids reacted leading to the formation of complex molecules. Maillard reaction course is strongly affected by factors such as temperature, heating duration, water content, pH and amino acid to sugar ratio. In this study, the low solubilisation of proteins measured was attributed to this type of reaction taking place when proteins and carbohydrates are soluble at high temperatures. As proteins react with reducing sugars, the amount of carbohydrates and proteins solubilized was indeed higher than determined. Nevertheless, the polymerization of the solubilized macromolecules reduced their solubility.

### 3.2. Anaerobic digestion

The effect of the thermochemical pretreatments was also evaluated by determining the increase of methane production and the hydrolysis constant rates obtained through biodegradability assays.

#### 3.2.1. Methane production

Methane yield obtained for the pretreated samples was higher than for the untreated biomass (138.9 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup>, Fig. 3). Methane production obtained from the raw *C. vulgaris* was in good agreement with other studies performing anaerobic digestion of this microalga in similar conditions (Ras et al., 2011). Samples in which only the chemicals were added (without thermal application) resulted in similar methane productivities. More specifically, the samples subjected to acid and alkali addition attained 113.1 ± 8.8 and 119.8 ± 4.9 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup>, respectively. Methane yield obtained from the biomass pretreated at 120 °C for 20 min resulted in 180.3 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup>, while the biomass pretreated for 40 min enhanced methane yield up to 267.7 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup> (Table 2). This later pretreatment provided the highest anaerobic biodegradability (76%) of the tested pretreatment. In this manner, the addition of chemicals to this thermal pretreatment did not improve methane production. The addition of sulphuric acid and sodium hydroxide exhibited anaerobic biodegradabilities of 65.4% and 68.8%, respectively. Chemicals supplementation combined with 40 min at 120 °C hindered the methane production probably mediated by unidentified side-product released during this prolonged pretreatment. Opposite tendency was observed for the pretreatments that lasted 20 min. While thermal treatment alone displayed methane production of 180.3 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup>, the addition of chemicals resulted on methane production enhancement. More specifically, the addition of acid and base increased methane productivity up to 221.8 and 237.9 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup>, respectively. The experimental data showed that the addition of chemicals improved the digestion process when the pretreatment lasted 20 min while the same was not observed for longer pretreatment periods (40 min). Even though the highest anaerobic biodegradability was achieved with the longest thermal pretreatment, the addition of chemicals diminished methane production.



**Figure 3.** Cumulative methane yield achieved by the different pretreatments applied in *Chlorella vulgaris*

Regarding methane content of biogas, no differences were observed among pretreatments and raw material. The percentage of methane in the biogas ranged 67-70% (Table 2). These values were within the same range of previous studies dealing with anaerobic digestion of microalgae (González-Fernández et al., 2012a, 2012c). Opposite to easily degradable substrate, in which methane production may be hampered by accumulation of intermediates, hydrolysis is a crucial step in complex substrates such as microalgae. Microalgae biomass is characterized by a hard cellulosic cell wall that hampers digesters performance. The rate-limiting step of microalgae biodegradation is the hydrolysis stage and therefore special attention was given to the hydrolysis constant ( $K_h$ ) obtained during the anaerobic assay.  $K_h$  is different for each biomass since it depends on its composition (content of cellulose, hemicellulose and lignin), digestion parameters, etc. In this study,  $K_h$  were calculated in

accordance with Eq. (2) (Table 2). Except for thermally pretreated samples, values obtained ranged 0.08–0.14 for the pretreated samples and raw biomass. With regard to the thermally pretreated samples  $K_h$  was enhanced to 0.17 and 0.23  $d^{-1}$  for 20 and 40 min, respectively. The hydrolysis rate constant of cellulose is quite low (0.09  $d^{-1}$ , Myint et al., 2007), and therefore the low  $K_h$  were expected. The kinetic rate constant obtained for microalgae biomass were within the ranges reported for other biomasses (Gunaseelan, 2004; Yang et al., 2010). Unfortunately, no comparison could be made with other studies digesting microalgae since microalgae hydrolysis constant has not been previously calculated. Overall, this study doubled the hydrolysis constant of raw biomass by pretreating the sample at 120 °C for 40 min, which finally resulted in enhanced degradation. Instead of pretreatments, the hydrolysis constants of this type of cellulosic biomass may also be enhanced by supplementing cultures exhibiting cellulolytic activity (Yen and Brune, 2007).

**Table 2.** Anaerobic digestion of the pretreated microalgae biomass

	<i>Methane production</i> ( $mL CH_4 \cdot g COD in^{-1}$ )	<i>Biogas % <math>CH_4</math></i>	<i>Hydrolysis</i> <i>constant, <math>K_h (d^{-1})</math></i>
<b>Not treated</b>	138.9 ± 8.8	69.9	0.10
<b>Thermal 20 min</b>	180.3 ± 18.4	67.3	0.23
<b>Thermal 40 min</b>	267.7 ± 35.8	68.3	0.17
<b>Thermal 20 min + acid</b>	221.8 ± 13.7	70.6	0.08
<b>Thermal 40 min + acid</b>	228.8 ± 13.7	66.3	0.14
<b>Thermal 20 min + alkali</b>	237.9 ± 6.9	68.8	0.11
<b>Thermal 40 min + alkali</b>	240.6 ± 6.5	70.1	0.10

### 3.2.2. Pretreatment energetic costs

Even though all the pretreatments showed enhanced anaerobic biodegradability with regard to the raw material, the energetic analysis was performed only with the pretreatment which showed the highest methane yield increase. In this context, the thermal pretreatment at 120 °C for 40 min was selected for this calculation. According to the results presented herein, the pretreatment of *C. vulgaris* at 120 °C for 40 min resulted in 267.7 L CH<sub>4</sub> ·kg COD in<sup>-1</sup>. Taking into consideration that the COD/TS ratio was 0.64, this would result in a methane production of 416.4 L CH<sub>4</sub> ·kg TS in<sup>-1</sup>. Combined heat and power engines convert biogas into heat and electricity. Electricity has a higher economic value compared to heat since electricity can be used via electric grid. In a typical situation, the efficiency of electricity generation for CHP engines varies from 30% to 40% while thermal efficiency ranges 35–55%. Assuming best case scenario of 40% electricity generation, the electricity that may be generated with the thermally pretreated biomass resulted in 1657.4 kWh ·kg TS<sup>-1</sup>. On the other hand, the heat required for this pretreatment was calculated in accordance to Eq. (3). The specific energy needed to treat 1 kg of TS was calculated to be around 6894 kWh. Thus, the energy required and the energy produced was unbalanced. More specifically, the energy required was 4-fold higher than the energy produced. Nevertheless, the specific energy required is highly dependent on the solid load to be pretreated (Eq. (3)). In this manner, if the solid concentration would be increased for instance 8-fold, the specific energy required would decrease. The energy produced under this hypothetical scenario would be double than the energy required, and therefore the pretreatment would be a success. Obviously, this hypothesis remains to be assessed since it cannot be assumed that the thermal pretreatment efficiency will be the same when thermally hydrolysing a substrate 8-fold more concentrated.

## 4. Conclusion

*C. vulgaris* carbohydrates solubilisation was enhanced by all pretreatments and achieved the maximum when combining acid conditions with thermal treatment. Proteins were only solubilized under alkaline conditions combined with thermal pretreatment. Even though all the pretreatments improved methane production, thermal treatment at 120 °C for 40 min led to the highest anaerobic biodegradability. This pretreatment doubled methane production compared to that of the raw microalgae.

Nevertheless, the energetic input was higher than the extra energy gain. In order to obtain a positive energy balance, more studies are required to assess the effect of thermal pretreatment at higher solids concentration.

## **Acknowledgement**

The authors thank the Wastewater Treatment Plant of Valladolid (Spain) for supplying the anaerobic sludge.

## **References**

Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3, 117–129.

Burczyk, J., Dworzanski, J., 1988. Comparison of sporopollenin-like algal resistant polymer from cell wall of *Botryococcus*, *Scenedesmus* and *Lycopodium clavatum* by GC-pyrolysis. *Phytochemistry* 27, 2151–2153.

Cuaresma, M., Janssen, M., van den End, E.J., Vilchez, C., Wijffels, R.H., 2011. Luminostat operation: a tool to maximize microalgae photosynthetic efficiency in photobioreactors during the daily light cycle? *Bioresour. Technol.* 102, 7871–8.

Devlin, D.C., Esteves, S.R.R., Dinsdale, R.M., Guwy, a J., 2011. The effect of acid pretreatment on the anaerobic digestion and dewatering of waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* 102, 4076–82.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.

Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh- und Werkst.* 57, 191–202.

González-Fernández, C., García-Encina, P.A., 2009. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass Bioenerg.* 33, 1065–1069.

González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B., García-González, M.C., 2010. Open and enclosed photobioreactors comparison in terms of organic matter utilization, biomass chemical profile and photosynthetic efficiency. *Ecol. Eng.* 36, 1497–1501.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2013. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresour. Technol.* 129, 219–23.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012a. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresour. Technol.* 110, 610–6.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012b. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 6, 205–218.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012c. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenerg.* 40, 105–111.

González López, C.V., Cerón García, M. del C., Acien Fernández, F.G., Segovia Bustos, C., Chisti, Y., Fernández Sevilla, J.M., 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour. Technol.* 101, 7587–91.

Gunaseelan, V.N., 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass Bioenerg.* 26, 389–399.

Kimura, S., Kondo, T., 2002. Recent progress in cellulose biosynthesis. *J. Plant Res.* 115, 297–302.

Liu, H., Fang, H.H.P., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* 95, 249–256.

Molinuevo-Salces, B., García-González, M.C., González-Fernández, C., 2010. Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. *Bioresour. Technol.* 101, 5144–5149.

Myint, M., Nirmalakhandan, N., Speece, R.E., 2007. Anaerobic fermentation of cattle manure: Modeling of hydrolysis and acidogenesis. *Water Res.* 41, 323–332.

Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A., Gnansounou, E., Madamwar, D., 2011. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresour. Technol.* 102, 10163–10172.

Passos, F., Solé, M., García, J., Ferrer, I., 2013. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Appl. Energy* 108, 168–175.

Penaud, V., Delgenès, J., Moletta, R., 1999. Thermo-chemical pretreatment of a microbial biomass: influence of sodium hydroxide addition on solubilization and anaerobic biodegradability. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 258–263.

Petersson, A., Thomsen, M.H., Hauggaard-Nielsen, H., Thomsen, A.-B., 2007. Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. *Biomass Bioenerg.* 31, 812–819.

Rani, R.U., Kumar, S.A., Kaliappan, S., Yeom, I.-T., Banu, J.R., Uma Rani, R., Adish Kumar, S., Kaliappan, S., et al., 2012. Low temperature thermo-chemical pretreatment of dairy waste activated sludge for anaerobic digestion process. *Bioresour. Technol.* 103, 415–424.

Ras, M., Lardon, L., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2011. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 102, 200–6.

Winandy, J., 1995. Effects of fire retardant treatments after 18 months of exposure at 150°F (66°C). U.S. Dept. of Agriculture Forest Service Forest Products Laboratory, Madison WI.

Yang, Q., Luo, K., Li, X., Wang, D., Zheng, W., Zeng, G., Liu, J., 2010. Enhanced efficiency of biological excess sludge hydrolysis under anaerobic digestion by additional enzymes. *Bioresour. Technol.* 101, 2924–2930.

Yen, H.-W., Brune, D.E., 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* 98, 130–134.

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>, *Bioresource Technology*.





# **Artículo 2**

## **Effect of high pressure thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: organic matter solubilisation and biochemical methane potential**

Lara Mendez<sup>a</sup>, Ahmed Mahdy<sup>a,b</sup>, Marie Demuez<sup>a</sup>, Mercedes Ballesteros<sup>a,c</sup>, Cristina González-Fernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup>IMDEA Energy, Avda. Ramón de la Sagra 3, 28935 Móstoles, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Agricultural Microbiology, Zagzig University, 44519 Sharkia, Egypt

<sup>c</sup> CIEMAT, Avda. Complutense, 28040 Madrid, Spain

*Fuel*, 117 (2014) 674–679

Doi: 10.1016/j.fuel.2013.09.032

Reproduced with permission from Elsevier

ABSTRACT

This study investigates the effect of high pressure thermal hydrolysis on organic matter solubilisation and biogas production from *Chlorella vulgaris* biomass. Microalgae biomass was subjected to three temperatures, namely 140, 160, and 180 °C, and two heating times (10 and 20 min). Results showed that carbohydrates release prevailed over proteins. Carbohydrates were solubilised concomitantly with increasing temperatures. According to the infrared spectra and monomeric sugars determined in the pretreated medium, temperatures applied clearly affected the solubilisation of structural carbohydrates of the microalgae cell wall. Likewise, thermal pretreatment provided enhanced methane production with regard to the raw algal biomass. Enhanced hydrolysis rate constant supported faster biogas production. Regardless the heating time employed, increasing temperatures depicted increasing methane production. Even though, organic matter solubilisation was greater at 180 °C, the anaerobic biodegradability did not show the same trend. This fact was ascribed to the formation of reaction products that hampered methane production. Best case scenario was achieved by subjecting biomass to 160 °C which resulted in 64% methane yield enhancement.

Keywords: *Chlorella vulgaris*; Microalgae; Anaerobic digestion; Methane; Pretreatment

## 1. Introduction

Photosynthetic microorganisms, including cyanobacteria and microalgae, are nowadays studied as potential feedstock for next-generation biofuels. This kind of feedstock not only provides biomass to produce energy but also present several advantages. More specifically, they contribute to reduce CO<sub>2</sub> emission by carbon uptake taking place during photosynthesis and remove nutrients from wastewater [1–3]. In this manner, algae are emerging as one of the most promising sustainable biomass sources. In addition to biomass for bioenergy production, this type of feedstock can be cultivated for feed, food and value added-products [4].

Coupling wastewater treatment and energy production by means of microalgae biomass would decrease biomass production cost [5]. Sturm and Lamer [6] achieved a positive net energy ratio when evaluating microalgae biomass production coupled with nutrient removal from open ponds fed with wastewater. In this manner, it seems rather logical that bioenergy research mainly focuses on microalgae strains commonly found in wastewater treatment plants. Even though some cyanobacteria are also studied lately [7], microalgae strains more frequents include *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Oocystis* sp. and *Chlamydomonas* sp. [2,8,9].

In the biofuel context, biogas production seems to be the least complex. Opposite to biodiesel and bioethanol production, where only small fractions of the cell (lipids or sugars) are used, methane production may use all three macromolecules (including proteins in addition to the lipids and sugars) as a substrate. Although anaerobic digestion is a well-known biological process, the use of new feedstock and their behaviour upon pretreatments may lead to unexpected results. Microalgae biomass as substrates for anaerobic digestion was firstly studied in the 1960s [10]. However, it is only in this last decade when an important effort has been spent developing fundamental and applied research on this topic. Microalgae macromolecular distribution, as well as their cell walls, renders anaerobic digestion efficiency difficult to predict. A detailed review on microalgae digestion and strategies to improve methane production may be found elsewhere [11]. The main disadvantage is the slow initial hydrolysis rates of complex substrates such as microalgae biomass. Pretreatments investigated on this matter are adapted from studies dealing with activated sludge. Particularly, in the case of *Chlorella* biomass, among several thermochemical

pretreatments tested, thermal pretreatment showed highest methane enhancement [12].

Microalgae biomass subjected to low temperature (90 °C, 2 h) resulted in 48% *Scenedesmus* anaerobic biodegradability enhancement [13]. In this case, microscopic analysis confirmed cell wall damage. Likewise, an ecosystem composed of *Chlamydomonas* and *Nitzschia* treated at 95 °C for 10 h resulted in 60% methane yield enhancement [8]. While low temperatures are responsible for breakage of cell wall hydrogen bonds linking cellulose and hemicellulose, high temperatures in the range of 150-180 °C, are pointed out for solubilisation of cellulose and hemicellulose [14]. Solubilisation of these two biopolymers is of crucial importance for enhancing biogas production, since those polymers confer the cell wall a high resistance to bacterial attack.

The purpose of the current work was to study high temperatures pretreatment to enhance methane production of *Chlorella vulgaris*. Microalgae high pressure thermal hydrolysis was studied at 140, 160 and 180 °C. Biomass was held in the thermal reactor at the studied temperatures for 10 and 20 min. The effectiveness of these pretreatments was assessed by evaluating the organic matter solubilisation and methane production.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological materials

Microalgae biomass was obtained from the wastewater treatment plant of Valladolid (Spain). Following the Utermohl method [15], the great majority of microalgae were identified *C. vulgaris*. Microalgae biomass was grown with synthetic inorganic medium under constant illumination with fluorescent lamps and incubated at 25 °C. This medium was composed of (per litre of distilled water): 0.4 g NH<sub>4</sub>Cl, 75 mg MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 25 mg CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 11.42 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4.98 mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50 mg EDTA, 31 mg KOH, 0.175 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25mg NaCl, 2.42 g Tris (diluted together with 10 mL diluted acetic acid (1:20)), and 2mL of a trace elements solution (L<sup>-1</sup>): 8.82 g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.44 g MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.71 g MoO<sub>3</sub>, 1.57 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.49 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O. Biomass was periodically collected and concentrated by centrifugation. Thickened biomass was stored at 4 °C until usage (less than 15 days).

Microalgae biomass characterisation showed COD (chemical oxygen demand)/total solids (TS) ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) of 1.72 and VS (volatile solids)/TS of around 91%.

Anaerobic sludge employed as inoculum was collected at the wastewater treatment plant of Valladolid (Spain). Anaerobic biomass presented a total solids (TS) concentration of  $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and VS/TS of around 67%.

### 2.2. High pressure thermal pretreatment

High pressure thermal hydrolysis was performed using a laboratory-scale stirred autoclave (Model EZE-Seal; Autoclave Engineers, Erie, PA) with a Hastelloy C tank. The stainless-steel reactor had a total volume of 0.5 L, with an electric jacketed heater and magnetic agitator. Microalgae biomass subjected to thermal pretreatments was adjusted to COD concentration of  $32.1 \pm 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A volume of 0.2 L of biomass was placed inside the reactor and sealed. Constant stirring rate of 350 rpm was provided in order to avoid temperature gradients. Temperatures for the different assays were 140, 160 and 180 °C, with a heating rate between 3 and 8 °C/min. Once the desired temperature was achieved, biomass was held inside the reactor for 10 and 20 min. Pressures achieved were approximately 3, 6 and 10 bar for 140, 160, 180 °C, respectively. After thermal pretreatment, the reactor was cooled down to ambient temperature with an ice-bath.

### 2.3. Anaerobic digestion

The anaerobic digestion was conducted in batch mode. Digesters employed were glass bottles with a capacity of 0.120 L and closed with butyl rubber seals and aluminum caps. Digesters were run in parallel and inoculated with the raw and pretreated biomass derived from the different pretreatments. In addition, anaerobic sludge and deionized water were combined in order to obtain a ratio COD substrate/VS inoculum of 0.5 ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) [16]. As blanks for endogenous gas quantification only anaerobic inoculum was used, while the good performance of the anaerobic sludge was evaluated using ethanol as substrate. A liquid volume of 0.070 L was used for each bottle, allowing 42% head space for gas production. Temperature was regulated at 35 °C in an orbital shaker. pH was adjusted at 7-7.5 prior anaerobic digestion. Oxygen was removed by purging the headspace of the bottles with helium. Digesters pressure was measured periodically with a manual manometer. Headspace of the digesters was

analysed for biogas composition using gas chromatography (Agilent 7820A) equipped with HP-PLOT Q column and thermal conductivity detector. All the experiments were carried out in duplicates and the duration of assay was 29 days.

### 2.4. Hydrolysis constant in the biochemical methane potential

Hydrolysis is frequently the limiting step in the anaerobic digestion of complex biomasses, such as microalgae and lignocellulosic material. Assuming the overall anaerobic digestion process conforms to first-order kinetics, the hydrolysis rate constant was determined by using the following model (Eq. (1)):

$$B(t) = B_0(1 - \exp(-k_h t)) \quad (1)$$

where  $B(t)$  is the cumulative methane yield ( $\text{mL CH}_4 \cdot \text{g COD initial}^{-1}$ ) obtained experimentally,  $B_0$  is the ultimate methane yield,  $K_h$  ( $\text{d}^{-1}$ ) is the first order kinetic constant and  $t(\text{d})$  is the digestion time.

### 2.5. Analytical methods

Total Kjeldahl nitrogen (TKN), TS and VS of sludge and microalgae biomass were analysed in accordance to standard methods [17]. COD was measured using COD Cell Test kit (Merk, ISO 15705). Carbohydrates content was determined by phenol- sulphuric method [18] and proteins were calculated by multiplying TKN results by 5.95 [19]. To obtain soluble fractions, the samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min (Eppendorf 5424).

Identification and quantification of the monosaccharide was determined by HPLC (Agilent 1260), using a CARBOSep CHO-682 LEAD column with refraction index detector. The column temperature was set to 80 °C and the volume of the injection was 20  $\mu\text{L}$ . The solution used as eluent was degasified milliQwater at a flow of 0.4  $\text{L min}^{-1}$ .

### 2.6. Fourier transform infrared (FT-IR)

Changes in the composition of the structural components of untreated and treated biomass were analysed by Fourier transform infrared spectrometer (Thermo Scientific Nicolet 6700 spectrometer) using an attenuated total reflection accessory and deuterated triglycine sulphate detector. Spectra were collected in the 4000-400  $\text{cm}^{-1}$

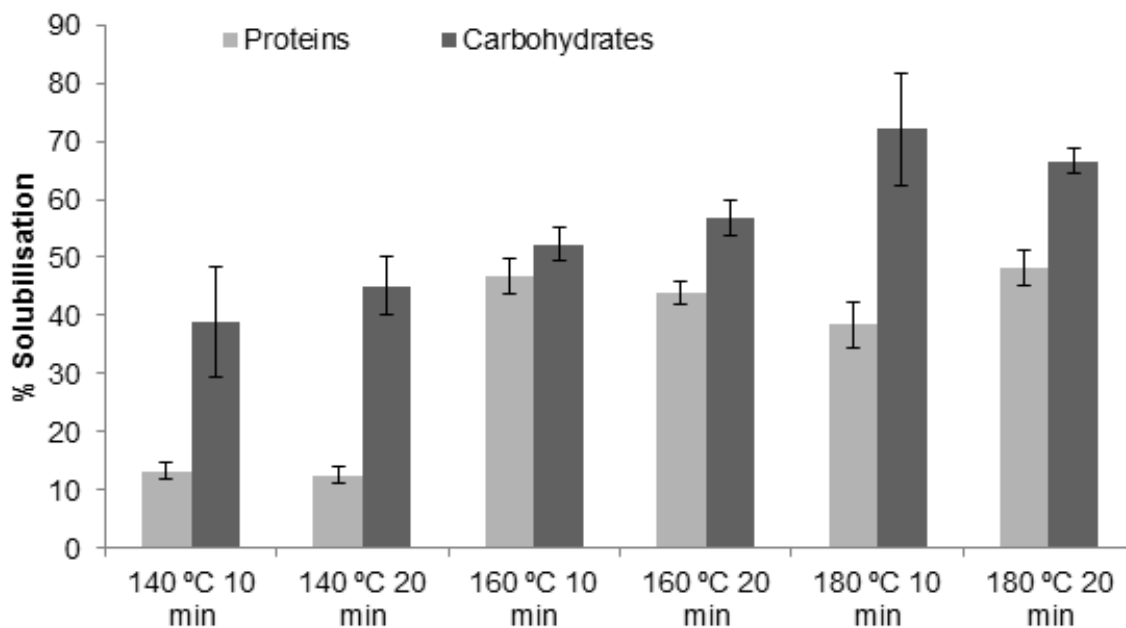
range, with a  $4\text{ cm}^{-1}$  interval and 64 scans at room temperature. Samples preparation for spectra collection was carried out with milled KBr and 0.3% of dry biomass.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Organic matter solubilisation during pretreatments

Firstly, thermal treatments were assessed in terms of total COD and VS. These results showed an average removal % of  $46.4 \pm 7.2$  for COD and  $30.6 \pm 6.7$  for VS with regard to the untreated counter partner biomass. This feature was observed previously in similar treatments in which high pressure was applied to different biomasses. González-Fernández et al. [20] reported removals of 53% and 36% COD and VS removal, respectively, when pretreating swine manure at  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  (7 bar). This fact can be ascribed to organic matter volatilisation taking place during thermal pretreatments.

In the attempt of further understanding the organic matter solubilisation, carbohydrates and proteins released during thermal treatments were studied. These two fractions account for 94% of the total dry weight. More specifically, the biochemical determination of *Chlorella* biomass revealed a protein content of 58.4% and carbohydrates content of 36.3%. Out of these percentages, approximately 20% proteins and 5% carbohydrates were in the soluble fraction at the beginning of the experimentation. After the hydrothermal pretreatment, the solubilisation achieved by each pretreatment is shown in Fig. 1. Carbohydrates solubilisation prevailed over proteins solubilisation. During the thermal pretreatments, soluble carbohydrates increased by 4-6-fold while proteins solubilisation was enhanced by 1-2-fold. Same trend was observed for activated sludge subjected to thermal hydrolysis. Wilson and Novak [21] showed an increase of soluble protein and carbohydrates by a factor of 5 and 10, respectively. In this context, it may be suggested that this type of pretreatment affects markedly to carbohydrates rather than proteins. Proteins exhibited 12% solubilisation at  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ , while this value was increased up to 45% for samples pretreated at 160 and  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 4.** Carbohydrates and proteins solubilisation upon the different thermal pretreatments

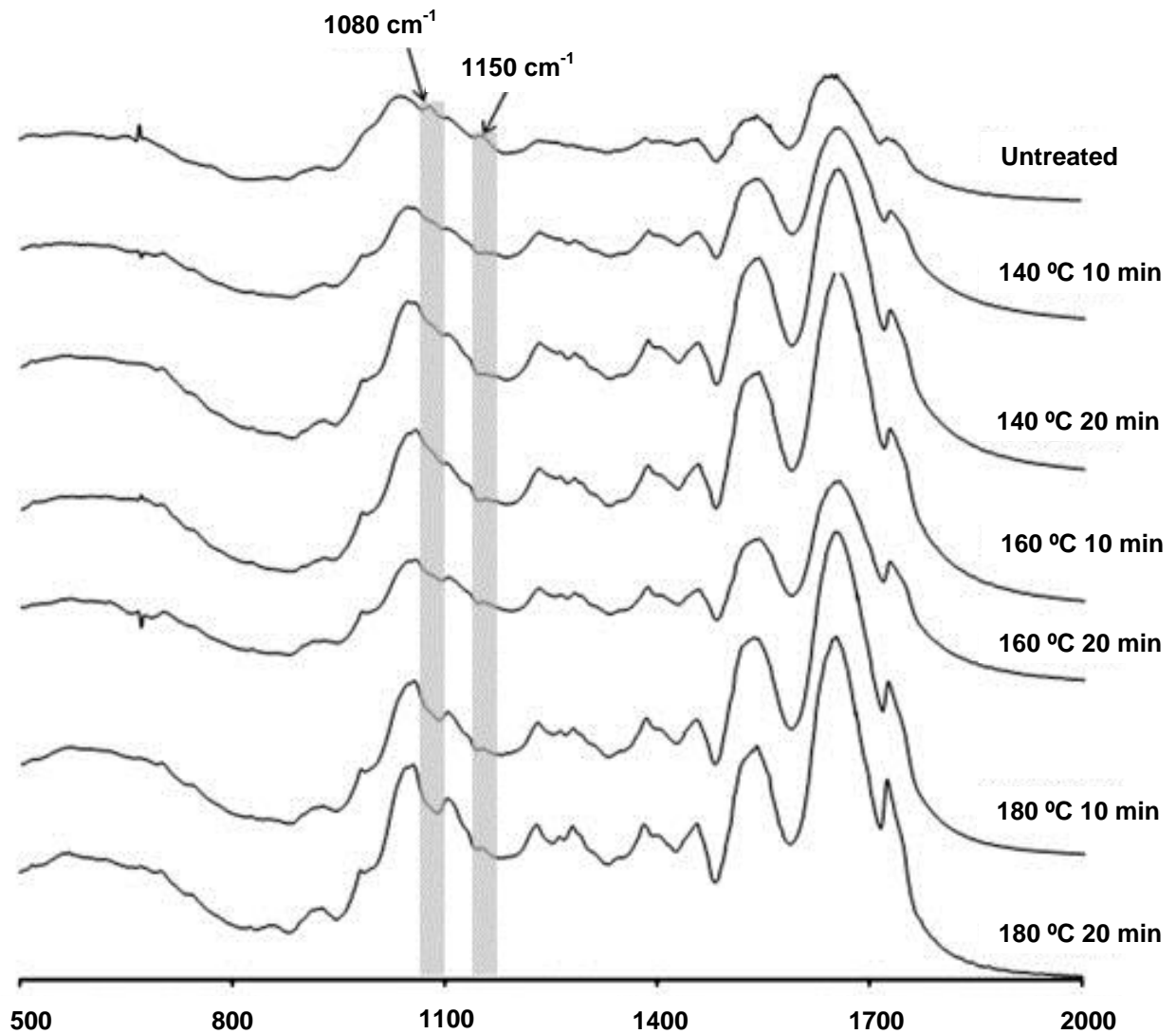
In the case of carbohydrates, solubilisation occurred stepwise with increasing temperatures applied. In this manner, carbohydrates solubilisation averaged 42%, 54% and 69% at temperatures of 140, 160 and 180 °C, respectively (Fig. 1). Those results are in agreement with previous observed values reported by Mendez et al. [12]. Thermal pretreatment of *Chlorella vulgaris* biomass at 120 °C for 20 min resulted in 35.2% carbohydrates solubilisation [12]. Similarly, duration of pretreatments did not show a marked effect on solubilisation.

In order to study the extent of carbohydrates solubilisation, the supernatants obtained were analysed for sugar monomers. This analysis revealed that only 2% of the soluble carbohydrates were monomers. Galactose and arabinose were the two main monomers. Glucose presence in the soluble fraction was only detected when microalgae biomass was subjected at 160 and 180 °C treatments, but still at low proportion compared to galactose. The concentration attained in the soluble fractions for the different monomers were  $46.8 \pm 5.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for arabinose,  $99.0 \pm 11.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for galactose and  $24.5 \pm 2.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for glucose. These results are in good accordance with those presented by Fernández-Cegrí et al. [22]. Those researchers observed cellulose and hemicellulose hydrolysis above 150 °C. While hemicellulose is mainly composed of xylose, mannose, galactose and arabinose, cellulose is a glucose-based polymer [23].

Thus, it can be inferred that cellulose was degraded to its monomer at the higher temperatures tested.

### 3.2. FT-IR characterisation of pretreated microalgae biomass

The fingerprint regions of the FT-IR spectra of raw and pretreated microalgal biomass are presented in Fig. 2. This analysis has been widely used for obtaining information about biomass structure and chemical changes taking place during pretreatments [24,25]. Thermal instability of the proteins was registered by changes on the amide band ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ). More specifically, this band range is associated by C-N groups of the amide [26]. Comparing spectra obtained upon pretreatments, and up-shift of this peak was observed at increasing temperatures. However, rearrangement of the protein structure upon temperature increase was not the main focus on the FTIR spectra. Particularly in this study, FTIR spectra were used to elucidate whether or not cellulose was affected by the thermal pretreatments since this component has been pointed out to be the main fraction hampering microalgae cell hydrolysis. Spectra and band assignment is quite broad in literature and greatly depends on the biomass analysed. As a matter of fact, only one study was found regarding microalgae FTIR spectra and presented high resemblance with the spectra attained herein. In this manner, the bands were tentatively identified in accordance to Duygu et al. [27]. The bond C-O-C of polysaccharides was assigned to wavenumber range 1134-1174 and 1072-1099  $\text{cm}^{-1}$ . As shown in Fig. 2, untreated sample showed two small bands within those ranges (1080 and 1150  $\text{cm}^{-1}$ ). The intensity of these peaks diminished at increasing temperatures, thus pretreatments affected carbohydrates structure. Nevertheless, cellulose degradation could not be concluded since bands obtained with this type of feedstock were too weak. Therefore, even though this technique may be suitable for some other feedstock presenting high fraction of cellulose, the presence of this polymer in the cell wall of microalgae is too low to determine any structural changes.

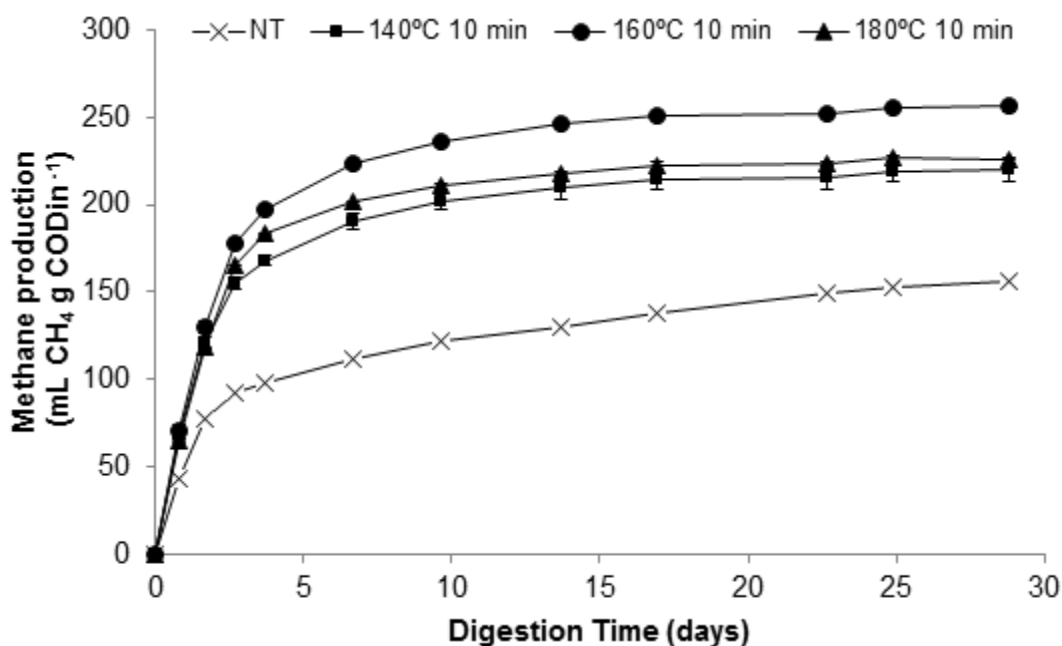


**Figure 5.** Infrared absorption spectra ( $\text{cm}^{-1}$ ) of *Chlorella vulgaris* raw biomass and thermally pretreated biomass

### 3.3. Methane production yields

Anaerobic digestion was carried out over 29 days to evaluate the methane production of *Chlorella* biomass pre-treated at high temperatures for different heating times (10 and 20 min). All the pretreatments showed a fast increase of methane yield during the first days of digestion with marked differences between the raw biomass and those subjected to high temperatures (Fig. 3). At this point, it should be stressed that no differences were detected between samples treated for 10 and 20 min, regardless the temperature applied. Note that Fig. 3 only shows methane production profile

obtained for samples pretreated for 10 min since similar results were attained for samples pretreated for 20 min. The maximum rate ( $22.7 \text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$ ) was obtained within the 3 first days of digestion for biomass treated at  $160^\circ\text{C}$  for 10 min. This methane production rate was 1.5-fold higher than the value obtained for the untreated biomass.



**Figure 6.** Cumulative methane yield achieved by the different pretreatments applied in *Chlorella vulgaris*

The rate-limiting step of microalgae biodegradation is the hydrolysis stage and therefore special attention was given to the hydrolysis constant ( $K_h$ ) obtained during the anaerobic assay.  $K_h$  was calculated in accordance with Eq. (1). While raw biomass exhibited  $K_h$  of  $0.37 \text{ d}^{-1}$ , the pretreated biomasses ranged  $0.43\text{-}0.47 \text{ d}^{-1}$ . These results were contradictory with those of Keymer et al. [28] who did not register  $K_h$  changes when applying high pressure thermal pretreatment to microalgae biomass. Even though the present study and the investigation of Keymer et al. [28] presented the same high pressure thermal pretreatment applied to microalgae biomass, the strains were different. In this context, the later study worked with *Scenedesmus* sp. while here *Chlorella* sp. was used. In addition, *Scenedesmus* biomass has been reported to display a harder cell wall than *Chlorella* with respect to anaerobic digestion [29]. In the

present study, thermal pretreatments enhanced  $K_h$  by 1.3-fold. The  $K_h$  of the raw biomass was considerably higher than the calculated by Mendez et al. [12]. Employing the same anaerobic digestion set-up conditions, those authors determined  $K_h$  of  $0.10 \text{ d}^{-1}$  for *C. vulgaris* biomass. Those differences on  $K_h$  were ascribed to the different hydrolytic activity of the anaerobic sludge used as inoculum.

This enhanced hydrolysis rate constant achieved by thermal application resulted in faster methane production. In this manner, raw biomass required 16 days digestion to provide 90% of the total methane produced while the thermally pretreated biomasses required an average of 8 days. These results show the benefits of thermal treatment towards the overall energy balance of the system. Accordingly, thermally pretreated biomass not only provided the highest methane yield but also the fastest. This feature has a direct effect on the biomass that can be digested and the energy required for anaerobic mesophilic conditions. Pretreated biomass would require lower hydraulic residence time with regard to the not treated biomass and hence, energy input would be decreased.

As previously mentioned, no remarkable differences were observed among methane yield reached by samples treated for different time (10 vs. 20 min). In contrast to that, increasing temperatures applied showed enhanced biogas production. The methane content in the biogas averaged 66-68%. Raw biomass presented methane yield of  $156.4 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g COD in}^{-1}$ , while for the pretreated biomass this value was enhanced to 223, 257 and 228  $\text{mL CH}_4 \cdot \text{g COD in}^{-1}$  for temperatures of 140, 160, and 180 °C, respectively. Methane production improvement ranged 1.4-1.6 times higher than the raw biomass. These values are quite higher than the observed by Cho et al. [30]. In this later study, the pretreatment of a microalgae mixture (*Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.) at 120 °C for 30 min resulted in 1.2-fold enhancement. The differences may be attributed not only to the highest temperature employed during the pretreatment but also the targeted microalgae strain. Methane produced largely depends on the strains used as feedstock. *Scenedesmus* sp. was highlighted as the hardest microalgae to digest since its cell wall presents some polymers that confer this microalgae high resistance to bacterial attack [11,13]. Nevertheless, *Chlorella* sp. repeatedly showed higher biodegradability than *Scenedesmus* sp. The anaerobic biodegradability obtained for the raw microalgae used in this study is in good accordance with values reported in literature [31].

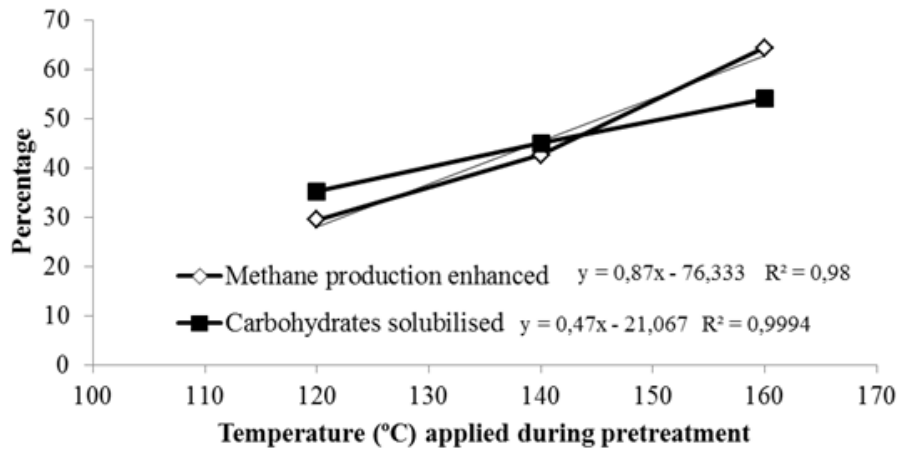
As it can be seen in Table 1, the highest anaerobic biodegradability was provided by biomass subjected at 160 °C. Taking into consideration data provided by Mendez et al. [12] and data obtained in the present study, the carbohydrates solubilised percentage seems to provide a fairly close estimation for the methane production enhancement that can be expected during thermal pretreatment (Fig. 4).

**Table 3.** Anaerobic digestion parameters of raw and pretreated *Chlorella vulgaris* biomass.

<b>Temperature applied</b>	<b>140 °C</b>		<b>160 °C</b>		<b>180 °C</b>	
<b>Time of thermal application</b>	10 min	20 min	10 min	20 min	10 min	20 min
<b>Biogas (% CH<sub>4</sub>)</b>	65.9	66.7	65.6	65.8	67.3	67.5
<b>Methane production (ml CH<sub>4</sub> · g COD in<sup>-1</sup>)</b>	219.8	225.8	256.3	258.9	226.5	231.8
<b>Biodegradability (%)</b>	62.8	64.2	73.2	74.0	64.7	66.2

Even though, carbohydrates and proteins solubilisation was greater at 180 °C, the anaerobic biodegradability did not show the same trend. This fact was ascribed to Maillard and caramelisation reactions. In this context, the available reducing sugars and amino acids react leading to the formation of complex molecules. Maillard reaction course is strongly affected by factors such as temperature, heating duration, water content, pH and amino acid to sugar ratio. It seems likely that the highest temperature solubilised organic matter that was not readily to be converted to biogas or some product delayed methane production (slight inhibition).

Overall, anaerobic digestion resulted in a significant increase with pretreated samples. This type of feedstock showed similar behaviour to other biomasses in which this pretreatment was tested (Table 2). The best case scenario was achieved by subjecting biomass to 160 °C. This temperature resulted in 64% methane yield enhancement.



**Figure 7.** Relationship between carbohydrates solubilisation and methane production enhancement using data of the present study for temperatures of 140 and 160 °C and data provided in Mendez et al. [12] for 120 °C.

**Table 4.** Effect of thermal pretreatment on methane production applied on different types of biomasses

<b>Biomass</b>	<b>Temperature applied (°C)</b>	<b>Methane enhancement (%)</b>	<b>Reference</b>
<b>Wheat straw</b>	120 (1 h)	64	[32]
<b>Rice straw</b>	120 (1 h)	32	[32]
<b>Barley straw</b>	120 (1 h)	41	[32]
<b>Chlorella vulgaris</b>	120 (20 min)	30	[12]
<b>Chlorella vulgaris</b>	120 (40 min)	93	[12]
<b>Chlorella vulgaris</b>	140 (20 min)	43	This study
<b>Scenedesmus</b>	170 (30 min)	81	[28]
<b>Chlorella vulgaris</b>	180 (20 min)	48	This study

## 4. Conclusion

High pressure thermal pretreatment resulted in enhanced anaerobic biodegradability of *C. vulgaris*. At the moderate temperatures tested, carbohydrate release prevailed over protein during hydrolysis. As a matter of fact, carbohydrates solubilised provided a fairly close estimation for methane production. Highest anaerobic biodegradability (74%) was provided by the biomass subjected to 160 °C, while higher temperatures did not enhance methane production. With regard to the methane production of the substrates and the parameters studied, heating time effect was negligible in comparison to the temperature applied.

## Acknowledgements

The authors thank the Wastewater Treatment Plant of Valladolid (Spain) for supplying the anaerobic sludge. Lucia Lopez is acknowledged for her practical assistance. Ahmed Mahdy appreciates his PhD scholarship funded by the Ministry of Higher Education of Egypt.

## References

- [1] Anjos M, Fernandes BD, Vicente AA, Teixeira JA, Dragone G. Optimization of CO<sub>2</sub> biomitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 2013;139:149–54.
- [2] Molinuevo-Salces B, García-González MC, González-Fernández C. Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. *Bioresour Technol* 2010;101:5144–9.
- [3] de Godos I, González C, Becares E, García-Encina PA, Muñoz R. Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;82:187–94.
- [4] Wijffels RH, Barbosa MJ, Eppink MHM. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2010;4:287–95.
- [5] Olguín EJ. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnol Adv* 2012;30:1031–46.
- [6] Sturm BSM, Lamer SL. An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production. *Appl Energy* 2011;88:3499–506.

- [7] Markou G, Angelidaki I, Georgakakis D. Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-methane production through anaerobic digestion. *Fuel* 2013;111:872–9.
- [8] Passos F, García J, Ferrer I. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresour Technol* 2013;138:79–86.
- [9] de Godos I, Blanco S, García-Encina PA, Becares E, Muñoz R. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresour Technol* 2009;100:4332–9.
- [10] Golueke CG, Oswald WJ, Gotaas HB. Anaerobic digestion of Algae. *Appl Microbiol* 1957;5:47–55.
- [11] González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2012;6:205–18.
- [12] Mendez L, Mahdy A, Timmers RA, Ballesteros M, González-Fernández C. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour Technol* 2013;149:136–41.
- [13] González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenerg.* 2012;40:105–11.
- [14] Garrote G, Domínguez H, Parajó JC. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Als Roh- Und Werkst* 1999;57:191–202.
- [15] Sournia A. *Phytoplankton Manual*. Musée Natl. d'Histoire Nat., Paris: United Nations Educational Scientific and Cultural Organization UNESCO; 1978.
- [16] González-Fernández C, García-Encina PA. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass Bioenerg.* 2009;33:1065–9.
- [17] Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21st ed. Washington DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation; 2005.
- [18] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 1956;28:350–6.
- [19] González López CV, Cerón García M del C, Acién Fernández FG, Segovia Bustos C, Chisti Y, Fernández Sevilla JM. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour Technol* 2010;101:7587–91.

- [20] González-Fernández C, León-Cofreces C, García-Encina PA. Different pretreatments for increasing the anaerobic biodegradability in swine manure. *Bioresour Technol* 2008;99:8710–4.
- [21] Wilson CA, Novak JT. Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. *Water Res* 2009;43:4489–98.
- [22] Fernández-Cegrí V, Ángeles De la Rubia M, Raposo F, Borja R. Effect of hydrothermal pretreatment of sunflower oil cake on biomethane potential focusing on fibre composition. *Bioresour Technol* 2012;123:424–9.
- [23] Takeda H, Hirokawa T. Studies on the cell wall of *Chlorella* I. Quantitative changes in cell wall polysaccharides during the cell cycle of *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Cell Physiol* 1978;19:591–8.
- [24] Monlau F, Barakat A, Steyer JP, Carrere H. Comparison of seven types of thermochemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresour Technol* 2012;120:241–7.
- [25] Salehian P, Karimi K, Zilouei H, Jeihanipour A. Improvement of biogas production from pine wood by alkali pretreatment. *Fuel* 2013;106:484–9.
- [26] Ramos ÓL, Reinas I, Silva SI, Fernandes JC, Cerqueira MA, Pereira RN, et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocoll* 2013;30:110–22.
- [27] Duygu DY, Udoh AU, Ozer TB, Akbulut A, Acikgoz I, Yildiz K, et al. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833. *African J Biotechnol* 2012;11:3817–24.
- [28] Keymer P, Ruffell I, Pratt S, Lant P. High pressure thermal hydrolysis as pre-treatment to increase the methane yield during anaerobic digestion of microalgae. *Bioresour Technol* 2013;131:128–33.
- [29] Mussgnug JH, Klassen V, Schlüter A, Kruse O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J Biotechnol* 2010;150:51–6.
- [30] Cho S, Park S, Seon J, Yu J, Lee T. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microbial biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresour Technol* 2013;143:330–6.

- [31] Ras M, Lardon L, Sialve B, Bernet N, Steyer JP. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 2011;102:200–6.
- [32] Menardo S, Airoidi G, Balsari P. The effect of particle size and thermal pre-treatment on the methane yield of four agricultural by-products. *Bioresour Technol* 2012;104:708–14.





# **Artículo 3**

## **Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads**

Lara Mendez<sup>a</sup>, Ahmed Mahdy<sup>a,b</sup>, Mercedes Ballesteros<sup>a,c</sup>, Cristina González-  
Fernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IMDEA Energy, Avda. Ramón de la Sagra 3, 28935 Móstoles, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Agricultural Microbiology, Zagzig University, 44519 Sharkia,  
Egypt

<sup>c</sup> CIEMAT, Avda. Complutense, 28040 Madrid, Spain

*Applied Energy*, 129 (2014) 238-242

Do: 10.1016/j.apenergy.2014.04.110

Reproduced with permission from Elsevier

ABSTRACT

Anaerobic digestion of microalgae has been enhanced by several pretreatments; however the reported net energy ratio was negative. In order to cope with this issue, this investigation focused on thermal pretreatment (120 °C for 40 min) at increasing biomass loads of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. During that thermal pretreatment, carbohydrates solubilisation prevailed over proteins for both strains. Regardless the biomass load pretreated, anaerobic biodegradability of *C. vulgaris* was enhanced by 50% and therefore, pretreatments of high biomass loads was suggested to counterbalance the energy input. On the other hand, thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass supported an enhancement of 21-27%. The specific cell wall composition was suggested as a potential reason for the differences registered on their anaerobic biodegradabilities.

Keywords: Microalgae; Methane; Pretreatment; Anaerobic digestion; *Chlorella vulgaris*; *Scenedesmus*

## 1. Introduction

Due to the rapid fossil fuels depletion and the global climate change, there is an enhanced policy-driven demand for biofuels. Under these circumstances, the development of third generation biofuel technologies (biodiesel, bioethanol and biogas) has been a matter of growing interest. Research regarding not only technological advances but also the most appropriate feedstock is of crucial importance. In the last years, microalgae have been established as a potential source for biofuel production since this feedstock has many advantages over conventional energy crops. They have features which proved them to be advantageous, namely their ability to grow in different water sources (fresh, saline or wastewater [1,2]) or their capacity to uptake greenhouse gases as CO<sub>2</sub> by photosynthetic means. Additionally, some strains have been reported to accumulate determined macromolecules, such as carbohydrate or lipids, which have high energy value for bioethanol or biodiesel [3][4].

Opposite to bioethanol or biodiesel, anaerobic digestion is a process where all the organic matter (carbohydrates, lipids and proteins) is biologically degraded for methane production. Furthermore, a recently published investigation showed the potential of integrating microalgae biomethane production on existing biogas plants. This strategy would provide an increase of almost 10% annual biomethane output [5]. However, one of the main disadvantages of using microalgae biomass as feedstock is their cell wall. Microalgae have a rigid protective cell wall that confers them a high resistance to bacterial attack. In this manner, one of the main issues for methane production using microalgae is the disruption of the cell wall. Appropriate methods are under development nowadays in order to facilitate the bio-availability of these organic compounds for bacterial degradation and therefore optimise the ultimate methane production. For this purpose, methods applied to other biomasses (such as activated sludge) are being adapted to microalgae biomass, however the response has not been as expected due to the differences among substrates [6] and strains cell wall specificity. When proposing the most appropriate pretreatment, special attention should be given to the formation of side-metabolites that may hamper anaerobic digestion [7–9]. In addition to cell wall disruption, pretreatments may also result in undesired by-products such as degradation reaction of proteins which can result in complex molecules difficult to degrade (Maillard reaction) or high ammonium concentration.

High ammonium concentration has been reported to be inhibitory to anaerobic microorganisms [10] and therefore methane production may be lowered or inhibited.

Previous studies have demonstrated the efficiency of several pretreatments for an enhanced methane conversion [11–14]. Nevertheless, these studies were performed at low substrate concentrations and the net energy ratio (energy returned on energy invested) has been repeatedly negative. However, this unbalance can be solved by increasing the initial biomass concentrations during the pretreatment. The effect of pretreatment at increasing biomass load and its impact on methane production has not been addressed yet. The pretreatment efficiency may be affected by the biomass consistency (biomass to water ratio) and thus this previous stage of anaerobic digestion deserve further examination.

The purpose of the current study is to investigate the effect of thermal pretreatment at increasing biomass loads of two different microalgae strains, namely *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. Additionally the impact of the thermal pretreatment was investigated with regard to the proteins and carbohydrates solubilisation. Finally, methane production of the different pretreated biomass loads was assessed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Substrate and pretreatment

Biological substrates used for thermal pretreatment were two different microalgae strains, namely *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. These biomasses were grown in a lab-scale photobioreactor of 50 L. Those two microalgae were selected as model microorganisms due to their easiness to be cultivated outdoors and robustness (hard cell wall). Microalgae were cultivated in Modified Basal medium. This medium was composed of (per L of distilled water): 0.4 g NH<sub>4</sub>Cl, 75 mg MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 25 mg CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 11.42 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4.98 mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50 mg EDTA, 31 mg KOH, 0.175 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mg NaCl, 2.42 g Tris (diluted together with 10 mL diluted acetic acid (1:20)), and 2 mL of a trace elements solution (L<sup>-1</sup>): 8.82 g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.44 g MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.71 g MoO<sub>3</sub>, 1.57 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.49 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O. Culture broth was maintained at 25 °C under continuous agitation supplied by air bubbling and continuous illumination. Microalga were periodically collected and concentrated by centrifugation (Heraeus Thermo Scientific) at 5,000 rpm for 10 min.

Table 1 shows the initial composition of the two raw biomass microalgae strains studied.

**Table 5.** Characterization of microalgae biomasses (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp.) subjected to thermal pretreatment and subsequent anaerobic digestion.

---

	<i>Scenedesmus</i> sp.		<i>Chlorella vulgaris</i>	
<b>TS (g·L<sup>-1</sup>)</b>	161.6	±0.3	134.3	±0.6
<b>VS (g·L<sup>-1</sup>)</b>	131.3	±0.3	123.3	±0.3
<b>Total carbohydrates (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	221.5	±70	171.1	±36.8
<b>Total proteins (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	304.4	±41.1	407.6	±23.5
<b>Total COD (g·L<sup>-1</sup>)</b>	188.5	±5.8	250	±8.5

---

*C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass were diluted to reach 1.6%, 3.2%, 6.5% and 13% (w/v) and subjected to thermal pretreatment. Thermal pretreatment conditions were selected in accordance to Mendez et al. [8, 12]. Briefly, thermal pretreatment was carried out by autoclaving the biomasses at 120 °C for 40 min. After that reaction time, samples were cooled down in a water bath until room-temperature. This pretreatment was carried out in duplicates for the different biomass loads.

#### 2.2. Anaerobic inoculum

Anaerobic sludge employed was collected at the wastewater treatment plant of Valladolid (Spain). Anaerobic biomass presented a total solids (TS) concentration of 21.1 g·L<sup>-1</sup> and volatile solids (VS)/TS of around 60%.

#### 2.3. Biomethane potential assays

Anaerobic digestion was conducted in batch mode. Fermenters were glass bottles with 0.120 L capacity incubated at 35 °C. To keep anaerobic conditions, oxygen was removed from digesters purging the headspace with helium, and closed with butyl

rubber seals and aluminum caps. Calculations were set to achieve a final volume of 0.070 L of liquid fraction for each bottle, and thus allowing 42% of the total volume for biogas production. Anaerobic sludge was mixed with the tested biomasses in order to obtain COD/VS ratio of 0.5 ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) [15]. Digesters were run in parallel and inoculated with raw and pretreated biomass of the two strains, *Chlorella* and *Scenedesmus*, at different solid loads (1.6%, 3.2%, 6.5% and 13% (w/v)). In addition, bottles containing only anaerobic sludge were run as blanks for quantification of endogenous methane production, and controls using ethanol as substrate to check the correct performance of the anaerobic microorganisms.

#### 2.4. Hydrolysis constant in the biochemical methane potential

Hydrolysis is frequently the rate limiting step in the anaerobic digestion of complex biomasses, such as microalgae and lignocellulosic material. Assuming the overall anaerobic digestion process conforms to first-order kinetics, the hydrolysis rate constant was determined by using the following model (Eq. (1)):

$$B(t) = B_0(1 - \exp(-k_h t)) \quad (1)$$

where  $B(t)$  is the cumulative methane yield ( $\text{mL CH}_4 \cdot \text{g COD initial}^{-1}$ ) obtained experimentally,  $B_0$  is the ultimate methane yield,  $K_h$  ( $\text{d}^{-1}$ ) is the first order kinetic constant and  $t(d)$  is the digestion time.

#### 2.5. Analytical methods

Total solids (TS), volatile solids (VS) and total Kjeldahl nitrogen (TKN) were measured according to Standard Methods [16]. Proteins were calculated by multiplying TKN results by 5.95 [17]. The carbohydrates content was analysed by phenol-sulphuric acid method [18]. COD was analysed by a colorimetric method using Hach vials. Biogas composition was measured by gas chromatography (Agilent 7820A) equipped with HP-PLOT Q column and thermal conductivity detector.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Organic matter solubilisation after thermal pretreatment

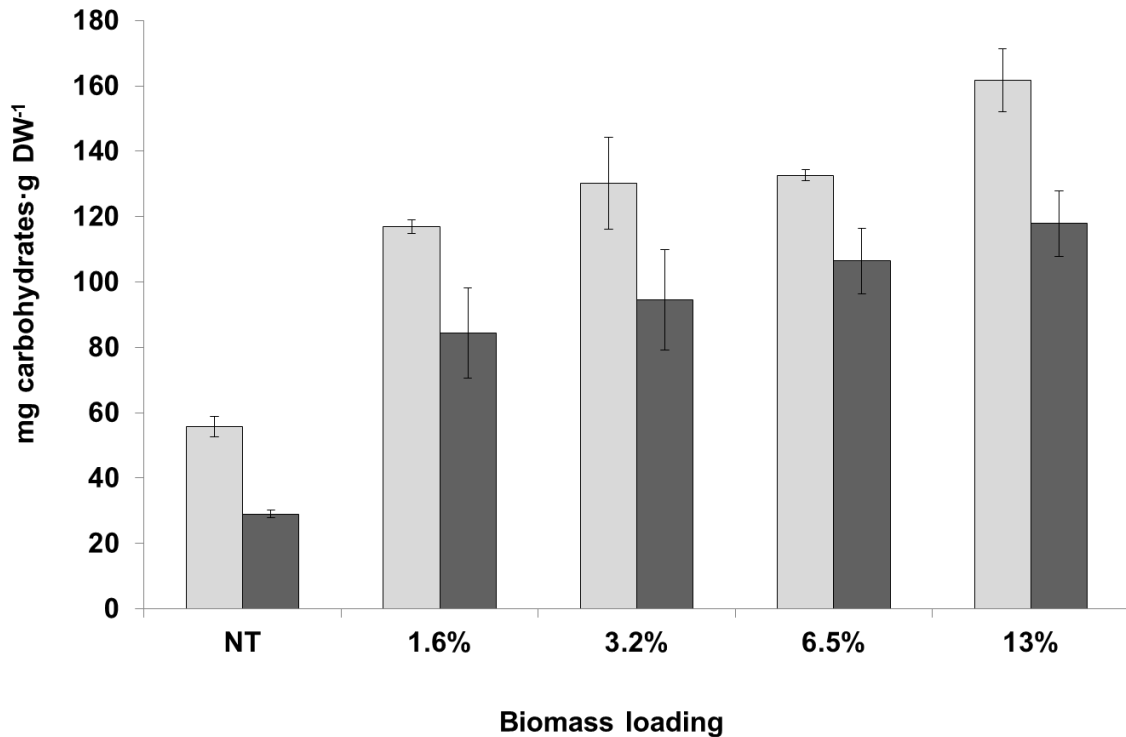
In order to assess the effect of the thermal pretreatment at increasing biomass loads, soluble fractions were analysed for carbohydrates and proteins. These two macromolecules are major components of the microalgae cell wall and therefore cell wall disruption or degradation during the hydrolysis step results in carbohydrates and proteins release to the medium [8]. Furthermore, a detailed study of the macromolecules (proteins, carbohydrates and lipids) fate upon pretreatment can help understanding anaerobic microorganism's performance. Usually, microalgae biomass is rich in proteins [19,20] and pretreatments applied for cell wall disruption may result on degradative reactions that can rise up ammonium concentration. This initial ammonium concentration together with the organic nitrogen mineralised during anaerobic digestion may lead to high ammonium concentration [7,9]. High ammonium concentration combined with slightly alkali pH has been reported to be inhibitory to anaerobic microorganisms [10]. In this manner, substrates rich in proteins (such is the case of microalgae) should be carefully evaluated prior anaerobic digestion due to potential inhibitions than would hinder the optimum performance of anaerobic microorganisms.

Fig. 1 shows the soluble carbohydrates profile attained for the different biomass loads thermally pretreated and the raw biomass. In the case of *Chlorella* biomass, the raw material revealed initial soluble carbohydrates content of 28.9 mg·g DW<sup>-1</sup>. Thermal pretreatment of the lowest biomass load (1.6% w/v) released 39% of the carbohydrates to the medium. This value is in good agreement with data provided by Mendez et al. [8]. When analysing the results obtained for the pretreated biomass at 120 °C for 40 min, soluble carbohydrate content in the medium increased together with increasing biomass loads. In fact, maximum solubilisation was achieved by the highest biomass load (13% w/v). Soluble phases corresponding to 3.2%, 6.5% and 13% (w/v) rose by 3.3, 3.7 and 4-fold carbohydrates content, respectively. Carbohydrates solubilisation from the particulate fraction of *Chlorella* biomass ranged 39–64%. Similar trend was observed for *Scenedesmus* sp. biomass (Fig. 1). *Scenedesmus* sp. raw biomass resulted in initial soluble carbohydrates content of 55.6 mg·g DW<sup>-1</sup>. Thermal treatment of the lowest biomass load (1.6% w/v) solubilised 37% of the total carbohydrates. As observed for *Chlorella*, *Scenedesmus* biomass also exhibited increasing carbohydrates

solubilisation at increasing biomass loads. More specifically, carbohydrates achieved 45%, 46% and 64% solubilisation at biomass loads of 3.2%, 6.5% and 13% biomass, respectively. In this manner, both microalgae presented a quite similar profile regarding carbohydrates hydrolysed during thermal pretreatment. Both strains exhibited an enhanced carbohydrates solubilisation of 1.4-fold when comparing the highest biomass loads thermally pretreated (13% w/v) with regard to the lowest (1.6% w/v).

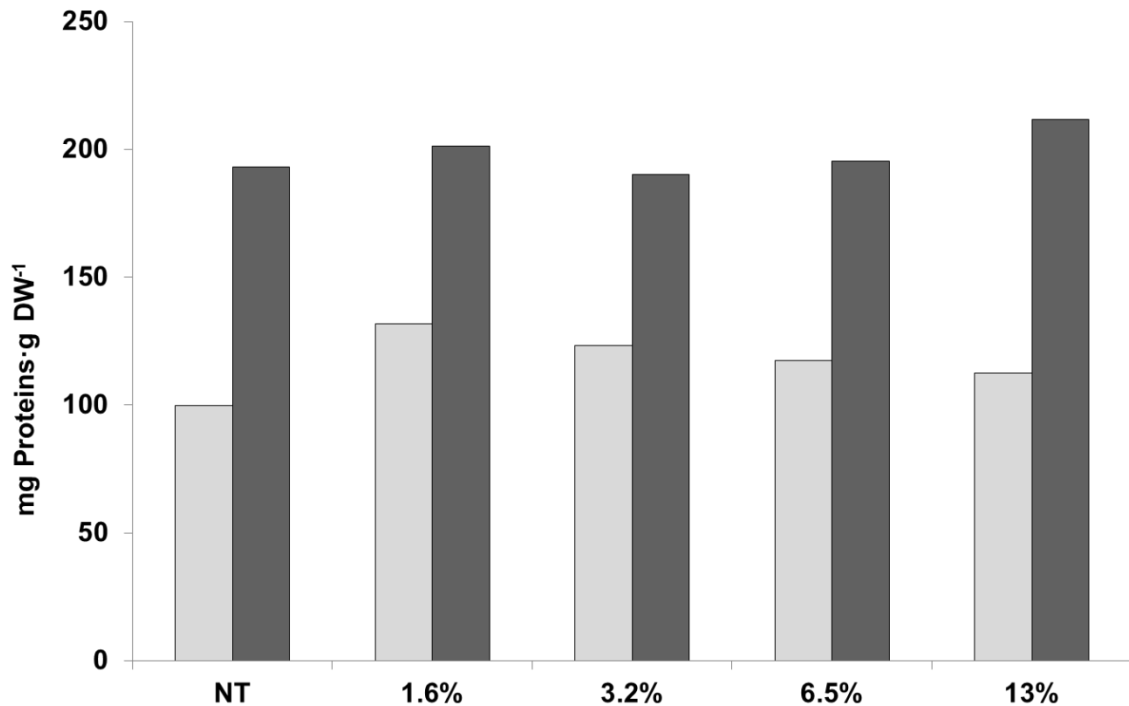
At this point it should be stressed out that the lowest biomass load studied herein is the most common solids level found in literature. Other investigations checked for comparison purposes also dealt with diluted microalgae biomass. For instance, Jard et al. [21] employed *Palmaria palmata* at 5%w/v and Passos et al. [11] used a mixture of microalgae at 2% biomass load to thermal treatment with the final goal of increasing the biomass anaerobic biodegradability. Since microalgae culture broth presents low dry weight content together with the fact that only preliminary investigation are addressed in literature regarding this topic, the lack of data concerning high biomass loads made the comparison with higher biomass loads impossible. To the best of our knowledge, this is the first study in which the pretreatment efficiency was evaluated for different microalgae biomass loads. Most studies found in literature are conducted at a constant biomass load (normally diluted) while changing pretreatment conditions such as temperature [11,22] or length of the thermal treatment [7].

As stated above, increasing solid loads resulted in increasing carbohydrate solubilisation. The lowest biomass load (1.6% w/v) provided similar results (35.2% solubilisation) to the ones obtained by Mendez et al. [8]. Likewise, higher solid load (6.5% w/v) enhanced carbohydrates solubilisation to 54.5 and 46.4% for *Chlorella* and *Scenedesmus* biomass, respectively. These data is in good agreement with the results obtained for thermal pretreatment at 85 °C of *P. palmata* at 5% w/v that released 50% of the total carbohydrate [21]. The fact that carbohydrates solubilisation was enhanced concomitantly with increasing biomass load was ascribed to the nature of the carbohydrates release. In this manner, certain carbohydrates would have reacted with other released products to form complex molecules (as described later) while another fraction would have not reacted and thus, accounted for the solubilised carbohydrates content. At this point, it seems of relevant importance to characterise the carbohydrate fractions released upon thermal pretreatment in order to gain insights on the effect that this disruption method has on the microalgae cell wall.



**Figure 8.** Carbohydrates solubilisation at increasing biomass load of *Chlorella vulgaris* (dark columns) and *Scenedesmus* sp. (light columns) biomass during thermal pretreatment.

Proteins solubilisation showed a different profile than carbohydrates (Fig. 2). No remarkable differences were observed among the different biomass loads thermally pretreated when compared to the non-treated material. Raw biomass was composed by 30% and 40.8% total protein content of the dry weight for *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* biomass, respectively (Table 1). Proteins are quickly hydrolysed at high temperature conditions. Nevertheless, aminoacids (building blocks of proteins) released can undergo further decarboxylation and deamination that generates side-product that may repolymerize [23]. In the present study, proteins soluble fraction increased by 1.1-fold for *Chlorella* biomass and 1.3-fold for *Scenedesmus* biomass. This behaviour can be attributed to Maillard reactions [8]. More specifically, solubilised proteins react with reducing sugars present in the medium, leading to complex molecules and thus not accounting for soluble proteins.



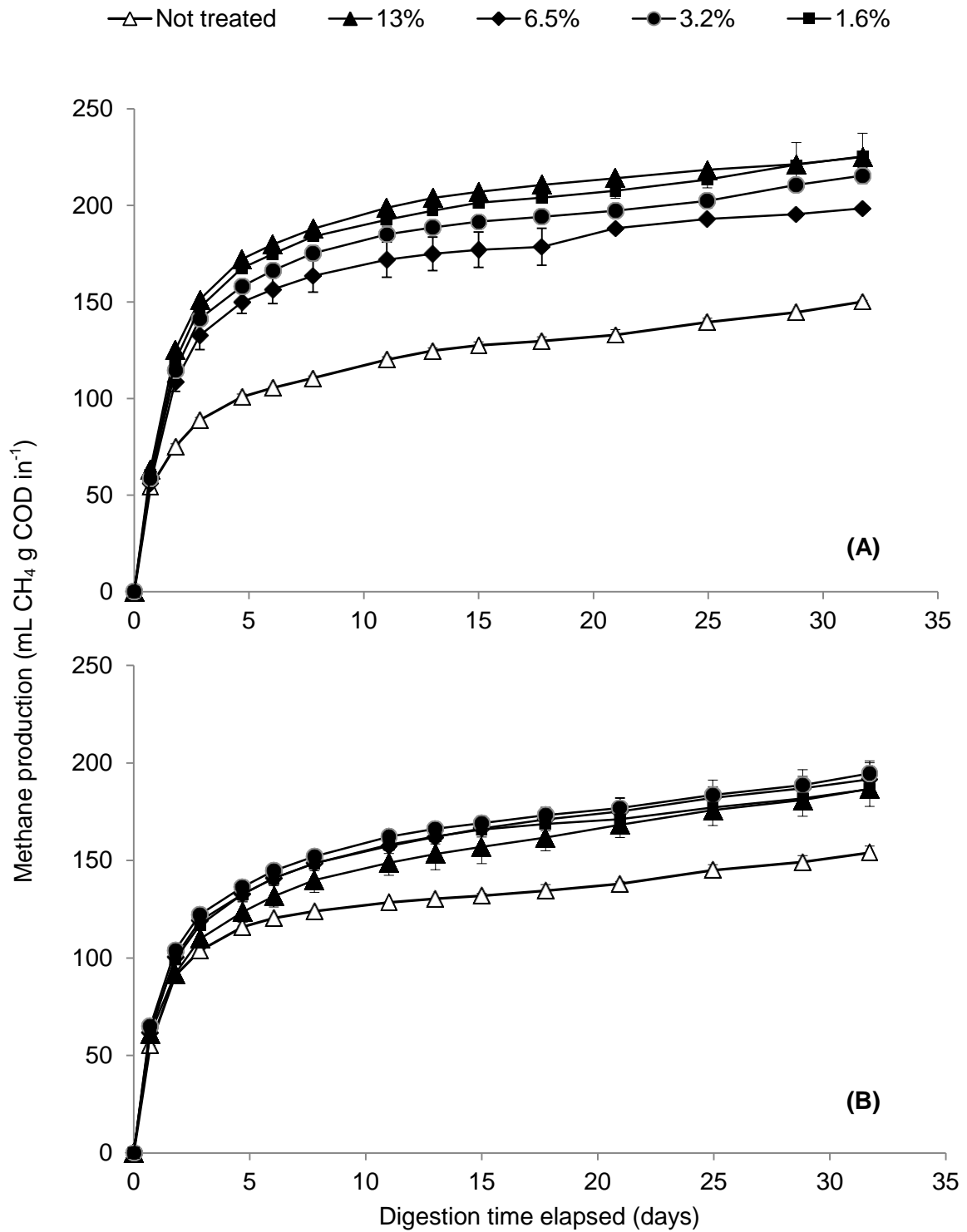
**Figure 9.** Proteins solubilisation at increasing biomass load of *Chlorella vulgaris* (dark columns) and *Scenedesmus* sp. (light columns) biomass during thermal pretreatment.

### 3.2. Biochemical methane potential test

In order to determine the effect of thermal treatment at increasing biomass loads of *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. Biomass on methane production, anaerobic digestion assays were carried out over 32 days. Fig. 3A. shows the methane production achieved by raw and thermally pretreated *Chlorella* biomass. Raw biomass reached a maximum methane production of 150.2 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup> at the end of the digestion experimental time (Table 2). The anaerobic biodegradability of the raw biomass (42.8%) was in the same range of other reported studies [9, 24, 25]. More specifically, digestion of *C. vulgaris* conducted in continuous digester produced methane yields of 110-180 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup> at hydraulic retention times of 16 and 28 days [9]. The data obtained here showed methane production yield enhancement of 1.33-1.5-fold of pretreated biomass with regard to the raw biomass. No clear tendency was observed among the thermally pretreated biomass loads (1.6-13% w/v) anaerobic digestion (Fig. 3A). In this manner, even though the highest biomass load exhibited higher carbohydrate content in the soluble fraction, this organic matter was not

favouring methane production. The same feature was observed for microalgae biomass thermally pretreated in combination with acid catalysts [8]. Anaerobic biodegradability ranged 57.1-64.3% for all the biomass loads of *C. vulgaris* thermally pretreated. Similar thermal pretreatment applied to this biomass provided methane yield enhancement of 42-90% [8,12]. Those enhancements were supported by an increased hydrolysis rate taking place during the first days of the anaerobic digestion assay. As it is shown in Table 2, the hydrolysis constant rate calculated was higher for those samples thermally pretreated than for the raw biomass of *Chlorella*. While no differences were observed for the pretreated biomass at increasing biomass loads, the  $K_h$  corresponding to the raw biomass was similar to values reported previously [12].

*Scenedesmus* sp. biomass presented different methane production profile (Fig. 3B). Similarly to *Chlorella* biomass, anaerobic digestion of raw *Scenedesmus* exhibited a methane yield of 154 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g CODin}^{-1}$ , which corresponded to an anaerobic biodegradability of 44% (Table 2). The different biomass loads pretreated thermally enhanced their methane production to approximately 190 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g CODin}^{-1}$ , regardless the biomass load pretreated. Once again, as observed for *Chlorella* biomass, the higher carbohydrates solubilisation registered at increasing biomass loads did not provide an enhanced methane production. In this case, thermal pretreatment increased methane yield by 21-27%. Even though carbohydrates profile for *Scenedesmus* biomass showed similar solubilisation to *Chlorella* biomass, the methane yield enhancement was lower than the ones observed for this later biomass. These results could be due to the high strength of this particular strain cell wall. *Scenedesmus* cell wall has been described as a rigid wall constituted by glucose, mannose and galactose [26]. Together with the cellulose and hemicellulose, the presence of sporopollenin-like biopolymer confers to this biomass a high resistance to bacterial degradation [27]. This could indicate that the thermal pretreatment damaged at some extent *Scenedesmus* biomass cell wall while the damaged caused in *Chlorella* biomass was greater. Nevertheless, the calculated hydrolysis rate constant showed that this parameter was higher in the case of *Scenedesmus* sp. than in *Chlorella* biomass (Table 2). At this point it should be stressed out that the *Scenedesmus* biomass was observed microscopically and the morphological shape did not fit with *obliquus* specie, but rather with *rubescens* or *vacuolatus* species. Additionally, the methane yield attained with the raw biomass was considerably higher than the yields reported in literature for *Scenedesmus obliquus* [22,28].



**Figure 10.** Cumulative methane yield achieved by the fresh biomass (not treated) and the different biomass loads pretreated thermally of *Chlorella vulgaris* (A) and *Scenedesmus sp.* (B).

Even though all *Scenedesmus* species are characterised by a trilaminar structure formed by resistant components, their fate upon anaerobic digestion seems to be specie-dependent. Hydrolysis rate constants calculated for the thermally pretreated *Scenedesmus* biomass were lower than the calculated for the fresh biomass. As a matter of fact, the hydrolysis rate constant decreased from  $0.41 \text{ d}^{-1}$  for thermally pretreated biomass load of 1.6% (w/v) to  $0.36 \text{ d}^{-1}$  for 13% (w/v). According to the macromolecules solubilisation described previously, carbohydrates solubilisation concomitantly increased with biomass load during thermal pretreatment and therefore a limited hydrolysis at high biomass load was discarded. It can be thus assumed that some molecule released during pretreatment affected the hydrolysis stage. As it can be seen in Fig. 3B, the methane profile attained the first days of digestion were quiet close among them and no marked difference between pretreated and raw biomass was observed. Nevertheless, this difference was appreciable after 8 days of digestion. It can be inferred that the delay registered during hydrolysis did not affect the overall methane production of *Scenedesmus* biomass. According to the different results obtained between both strains, it can be concluded that pretreatment should be tailor-designed in accordance to the microalgae to be digested. It is thus of crucial importance to study the microalgae cell wall composition in order to propose the most suitable disruption method.

In the case of *C. vulgaris* biomass, thermal pretreatment at increasing biomass loads did not diminished methane yield. The hypothesis suggested by Mendez et al. [8] was confirmed and therefore methane production of thermally pretreated *Chlorella* at high biomass load can counterbalance the energy input required during pretreatment. Noteworthy to mention that these preliminary results were conducted in batch mode and the following step will require determining the optimal performance of anaerobic digester operating in continuous mode. More specifically, due to low C/N ratio of algal biomass, ammonia accumulation may further inhibit the performance of anaerobic microorganisms and thus resulting in process failure [29].

**Table 6.** Anaerobic digestion parameters of raw and pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* biomass.

	Not treated Biomass	Thermally pretreated biomass (w/v)			
		1.6%	3.2%	6.5%	13%
<b><i>Chlorella vulgaris</i></b>					
Methane production (mL CH <sub>4</sub> ·g COD in <sup>-1</sup> )	150.2	225.4	215.5	198.5	225.1
Hydrolysis constant rate (d <sup>-1</sup> )	0.38	0.41	0.42	0.43	0.43
Anaerobic biodegradability (%)	42.9	64.4	61.6	56.7	64.3
<b><i>Scenedesmus sp.</i></b>					
Methane production (mL CH <sub>4</sub> ·g COD in <sup>-1</sup> )	154.0	186.6	194.7	191.6	186.7
Hydrolysis constant rate (d <sup>-1</sup> )	0.55	0.41	0.42	0.40	0.36
Anaerobic biodegradability (%)	44.0	53.3	55.6	54.8	53.3

#### 4. Conclusion

Thermal pretreatment of *C. vulgaris* and *Scenedesmus sp.* biomass enhanced carbohydrates solubilisation concomitantly with increasing biomass loads. Opposite, the low proteins solubilisation observed was ascribed to the occurrence of Maillard reactions during pretreatment.

When compared to fresh *Chlorella* biomass, the anaerobic biodegradability of pretreated *Chlorella* was enhanced by 50% regardless the biomass load subjected to thermal treatment. On the other hand, *Scenedesmus* pretreated biomass achieved only 21-27% enhancement when compared to raw biomass. This difference was attributed to the different cell wall composition of both strains. Further studies on cell wall characterisation are crucial in order to propose the most suitable pretreatment method.

## Acknowledgement

The authors thank the Wastewater Treatment Plant of Valladolid (Spain) for supplying the anaerobic sludge.

## References

- [1] Frigon J-C, Matteau-Lebrun F, Hamani Abdou R, McGinn PJ, O'Leary SJB, Guiot SR. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Appl Energy* 2013;108:100–7.
- [2] Cai T, Park SY, Racharaks R, Li Y. Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production. *Appl Energy* 2013;108:486–92.
- [3] Markou G. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresour Technol* 2012;116:533–5.
- [4] Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB, Wijffels RH. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour Technol* 2012;124:217–26.
- [5] Wang X, Nordlander E, Thorin E, Yan J. Microalgal biomethane production integrated with an existing biogas plant: A case study in Sweden. *Appl Energy* 2013;112:478–84.
- [6] González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2012;6:205–18.
- [7] González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresour Technol* 2013;129:219–23.
- [8] Mendez L, Mahdy A, Timmers RA, Ballesteros M, González-Fernández C. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour Technol* 2013;149:136–41.
- [9] Ras M, Lardon L, Sialve B, Bernet N, Steyer JP. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 2011;102:200–6.
- [10] Hansen KH, Angelidaki I, Ahring BK. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Res* 1998;32:5–12.

- [11] Passos F, García J, Ferrer I. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresour Technol* 2013;138:79–86.
- [12] Mendez L, Mahdy A, Demuez M, Ballesteros M, González-Fernández C. Effect of high pressure thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: Organic matter solubilisation and biochemical methane potential. *Fuel* 2014;117:674–9.
- [13] Alzate ME, Muñoz R, Rogalla F, Fdz-Polanco F, Pérez-Elvira SI. Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresour Technol* 2012;123:488–94.
- [14] Passos F, Solé M, García J, Ferrer I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Appl Energy* 2013;108:168–75.
- [15] González-Fernández C, García-Encina PA. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass Bioenerg* 2009;33:1065–9.
- [16] Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation; 2005.
- [17] González López CV, Cerón García M del C, Acién Fernández FG, Segovia Bustos C, Chisti Y, Fernández Sevilla JM. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour Technol* 2010;101:7587–91.
- [18] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 1956;28:350–6.
- [19] Romero García JM, Acién Fernández FG, Fernández Sevilla JM. Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol* 2012;112:164–70.
- [20] González-Fernández C, Molinuevo-Salces B, García-González MC. Open and enclosed photobioreactors comparison in terms of organic matter utilization, biomass chemical profile and photosynthetic efficiency. *Ecol Eng* 2010;36:1497–501.
- [21] Jard G, Dumas C, Delgenes JP, Marfaing H, Sialve B, Steyer JP, et al. Effect of thermochemical pretreatment on the solubilization and anaerobic biodegradability of the red macroalga *Palmaria palmata*. *Biochem Eng J* 2013;79:253–8.
- [22] González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenerg* 2012;40:105–11.
- [23] Sato N, Quitain AT, Kang K, Daimon H, Fujie K. Reaction Kinetics of Amino Acid Decomposition in High-Temperature and High-Pressure Water. *Ind Eng Chem Res* 2004;43:3217–22.

- [24] González-Fernández C, Molinuevo-Salces B, García-González MC. Evaluation of anaerobic codigestion of microalgal biomass and swine manure via response surface methodology. *Appl Energy* 2011;88:3448–53.
- [25] Prajapati SK, Malik A, Vijay VK. Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. *Appl Energy* 2014;114:790–7.
- [26] Takeda H. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry* 1996;42:673–5.
- [27] Burczyk J, Dworzanski J. Comparison of sporopollenin-like algal resistant polymer from cell wall of *Botryococcus*, *Scenedesmus* and *Lycopodium clavatum* by GC-pyrolysis. *Phytochemistry* 1988;27:2151–3.
- [28] Mussgnug JH, Klassen V, Schlüter A, Kruse O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J Biotechnol* 2010;150:51–6.
- [29] Schwede S, Rehman Z-U, Gerber M, Theiss C, Span R. Effects of thermal pretreatment on anaerobic digestion of *Nannochloropsis salina* biomass. *Bioresour Technol* 2013;143:505–11







# **Artículo 4**

## **Biomethane production using fresh and thermally pretreated *Chlorella vulgaris* biomass: A comparison of batch and semi-continuous feeding mode**

Lara Mendez<sup>a</sup>, Ahmed Mahdy<sup>a,b</sup>, Mercedes Ballesteros<sup>a,c</sup>, Cristina González-Fernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IMDEA Energy, Avda. Ramón de la Sagra 3, 28935 Móstoles, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Agricultural Microbiology, Zagzig University, 44519 Sharkia, Egypt

<sup>c</sup> CIEMAT, Avda. Complutense, 28040 Madrid, Spain

*Ecological Engineering*, 84 (2015) 273-277

Doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.09.056

Reproduced with permission from Elsevier

## ABSTRACT

The main challenge for an efficient anaerobic digestion using microalgal substrates is the optimization of cell wall disruption pretreatments. The objective of this work was to assess methane yield improvement using thermally pretreated *Chlorella vulgaris* in semi-continuous feeding operation. After thermal pretreatment, organic matter hydrolysis was confirmed by a 10-fold increase in soluble chemical oxygen demand (COD). Total COD removals ranged 36.5-49.7% for reactors fed with raw and thermally pretreated biomass, respectively. Despite the high nitrogen mineralization registered (52 and 78% for raw and thermally treated *C. vulgaris*), no ammonium/ammonia inhibition was detected. The reactor fed with thermally pretreated biomass resulted in 50% methane yield enhancement compared with the reactor fed with raw biomass. Even though no common inhibitions were detected, methane yield values attained were comparably lower than that obtained in batch mode digestion. This study highlighted the need of further testing promising pretreatments in semi-continuous mode anaerobic digestion before claiming their effectiveness.

Keywords: Microalgae; *Chlorella vulgaris*; Pretreatment; Anaerobic digestion; Continuous stirred tank reactor (CSTR)

## 1. Introduction

Photosynthetic microorganisms, such as microalgae, are nowadays studied as potential feedstock for next generation biofuels as an alternative to fossil fuels. Even though the upstream benefits of cultivating microalgae are clear (wastewater bioremediation, carbon dioxide mitigation and nutrients recovery, (Ji et al., 2013)), the problem encountered nowadays are related to the downstream biomass processing. Among biofuel production processes using this kind of biomass, biogas generation seems to be the least complex since all the organic macromolecules (proteins, carbohydrates and lipids) are used. Microalgae cell wall provides resistance to bacterial degradation and thereby hinders or inhibits hydrolytic phase of the anaerobic digestion process (Mendez et al., 2013). The main challenge is the optimization of pretreatments intended for cell wall disruption prior to anaerobic digestion (Cho et al., 2013; González-Fernández et al., 2012; Mendez et al., 2013). However, pretreatments can lead to by-products, such as those generated during the reactions of proteins and carbohydrates degradation (Mendez et al., 2013; Monlau et al., 2014) that can also reduce the methane yield. Previous studies have reported the use of several pretreatments, such as heat application on biomass, for an enhanced methane production in batch tests (Mendez et al., 2013, 2014a; Passos and Ferrer, 2015). Data obtained in batch assays can provide guidance, but assessing the benefits of pretreatments in semi-continuously fed reactors (continuous stirred tank reactors, CSTR) is highly required in order to study in-depth the performance of anaerobic microorganisms fed with pretreated microalgae biomass. As a matter of fact, only few investigations have moved forward to CSTR (González-Fernández et al., 2013; Passos and Ferrer, 2015; Schwede et al., 2013). The performance of CSTRs fed with microalgae is still very limited and required to further confirm the beneficial effect of pretreatments. In this context, thermal pretreatment applied to *Chlorella vulgaris* has been shown beneficial in batch mode anaerobic digestions (Mendez et al., 2013, 2014a) by solubilizing polymeric cell structures (Mendez et al., 2014b), but confirming these in CSTR digestion mode is required. The aim of the present study was to compare the performance of two CSTRs digesting raw and thermally pretreated *C. vulgaris* in terms of methane production, organic matter degradation, nitrogen mineralization and potential inhibitors.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms

The selected microalga, namely *C. vulgaris*, was grown in a lab-scale photobioreactor under continuous artificial light (fluorescent, 6,000 luxes) and agitation supplied by air bubbling. This microalga was selected as model microorganisms due to its easiness to cultivate outdoors and its robustness (hard cell wall). This biomass was cultivated on Modified Bold Basal Medium (Mendez et al., 2014a). Culture broth was periodically collected and microalgae were concentrated by centrifugation (Heraeus Thermo Scientific) at 5,000 rpm for 10 min. Chemical characterization of the microalgae used as substrates can be seen in Table 1. On the other hand, the anaerobic sludge employed as inoculum for the CSTRs was collected at the wastewater treatment plant of Valladolid (Spain). Anaerobic biomass presented a total solids (TS) concentration of 21.1 g·L<sup>-1</sup> and volatile solids (VS)/TS of around 60%.

**Table 7.** Chemical characterization of the different batches employed to feed the CSTRs.

<b>Chemical parameter</b>	<i>Not treated biomass</i>		<i>Thermally pretreated biomass</i>	
	Average	St D	Average	St D
<b>TS (g·L<sup>-1</sup>)</b>	59.7	5.1	65.2	0.4
<b>VS (g·L<sup>-1</sup>)</b>	55.1	4.3	60.2	0.8
<b>tCOD (g·L<sup>-1</sup>)</b>	103.4	9.4	99.1	11.6
<b>sCOD (g·L<sup>-1</sup>)</b>	1.9	0.5	19.9	3.5
<b>TKN (g·L<sup>-1</sup>)</b>	5.7	0.3	7.0	0.5
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (g·L<sup>-1</sup>)</b>	0.4	0.3	0.3	0.5

### 2.2. Semi-continuous CSTRs

Anaerobic digestion was conducted in two CSTRs with a total volume of 1.5 L (1 L liquid volume and 0.5 L headspace volume). The reactors worked under mesophilic conditions (35 °C) using a water jacket connected to a water bath. Constant mixing of the digesters was accomplished with magnetic stirrers at 250 rpm. Biogas production was measured by water displacement. Methane content was analysed by gas chromatography. Reactors were operated on semi-continuous mode, i.e. the same volume was withdrawn and fed in a daily basis using plastic syringes. To verify the enhancement of biogas production after pretreatment, one reactor was fed with raw *C. vulgaris* biomass (non-treated) and the other one was fed with thermally pretreated biomass. The organic loading rate (OLR) was set at 1.5 g COD ·L<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> for both reactors. Previous studies performed in batch mode showed that methane productivity was almost negligible after 15 days of digestion (González-Fernández et al., 2013; Passos and Ferrer, 2015), thus a hydraulic retention time (HRT) of 15 days was selected for the present study. After three HRT, the system was considered at steady state.

### 2.3. Analytic procedures

Total solids (TS), volatile solids (VS) and total Kjeldahl nitrogen (TKN) were measured according to Standard Methods (Eaton et al., 2005). Proteins were calculated by multiplying TKN results by 5.95 (González López et al., 2010). Carbohydrates content was measured by phenol-sulphuric acid method (DuBois et al., 1956). Colorimetric methods were used for COD (Merck, ISO 15705) and ammonium (Merck, ISO 7150-1) determination. Soluble fractions were obtained after centrifugation at 14,600 rpm for 5 min (Mini-spin Eppendorf 5424).

Biogas composition was measured by gas chromatography (Agilent 7820A) equipped with 19095P-Q04 30 m column (HP-PLOT Q) connected to a flame ionization detector and thermal conductivity detector at 250 °C and H<sub>2</sub> at 4.5 mL·min<sup>-1</sup> as carrier gas. Volatile fatty acids (VFAs) were analysed in soluble phase by high-performance liquid chromatography in an Agilent 1260 chromatograph equipped with Aminex HPX-87H column and UV-Vis detector.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. *C. vulgaris* used as a substrate: characterization and hydrolysis after thermal pretreatment

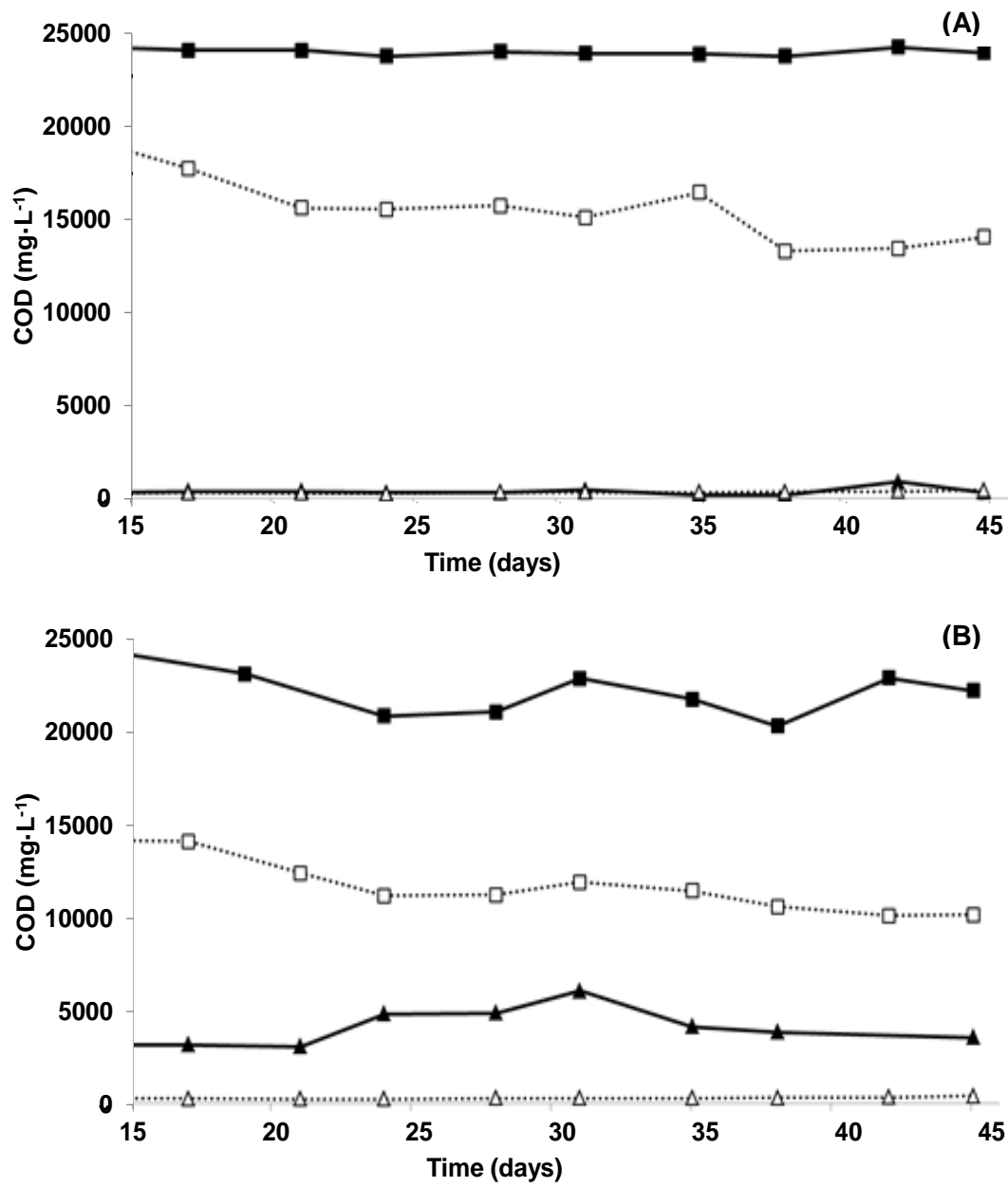
The characterization of fresh and thermally pretreated biomass is shown in Table 1. 92% of the TS were represented by VS and hence only 8% of the dry matter was inorganic material (ash). The freshness of the biomass can be observed by the low soluble COD in the non-pretreated biomass with regard to the total COD. The total COD/VS ratio ranged 1.70-1.88 for both biomass. This value is in good agreement with other microalgae biomass characterized previously (González-Fernández et al., 2013; Ramos-Suárez and Carreras, 2014). The total COD/TKN ratio was approximately 15. This value can change depending on the protein content of the microalgae which at the same time depends on microalgae growth conditions. Microalgae grown in wastewater or synthetic media provided similar values (Mendez et al., 2013; Passos and Ferrer, 2015), and therefore this value was considered to be in the conventional range. As a matter of fact, microalgae biomass composition studied herein exhibited  $64.2 \pm 3.4\%$  w/w TS of proteins and  $20.1 \pm 3.2\%$  w/w TS of carbohydrates. Taking these values into consideration together with the ash content, the remaining lipid fraction was estimated to be around 10%. This macromolecular profile is quite similar to other reported microalgae biomasses grown in non-stressed conditions (Mendez et al., 2013, 2014a).

In view of the promising results obtained by Mendez et al. (2013) in terms of organic matter solubilisation and methane yield, *C. vulgaris* biomass was pretreated thermally at 120 °C for 40 min. With regard to that of raw biomass, thermal pretreatment of *C. vulgaris* led to an increase in the soluble phase of 4.5-fold for carbohydrates and 1.9-fold for proteins (Mendez et al., 2013). This solubilisation of complex macromolecules was attributed to the cell wall disruption taking place during thermal pretreatment. In the present study, the hydrolysis efficiency resulted in an enhancement of soluble COD of 10-fold. This value is similar to previous reports where 6-fold enhancement was registered when treating a mixture of 70% *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. at 120 °C for 30 min (Cho et al., 2013). Thus, the effectiveness of the thermal pretreatment was proven.

### 3.2. CSTRs semi-continuous anaerobic digestion

#### 3.2.1. *Organic matter fate*

In order to investigate the digestion of *C. vulgaris* biomass in semi-continuous mode, two CSTRs were run in parallel (not treated and thermally treated biomass). Methane yield measured in the CSTR fed with raw *C. vulgaris* ranged  $85 \pm 15$  mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup> while the total COD and VS removal averaged  $36.5 \pm 6.0\%$  and  $31.9 \pm 4.0\%$ , respectively (Fig. 1). The values of soluble COD removed after anaerobic digestion, were negligible due to the low quantity of organic matter present in the soluble phase of the untreated biomass. As soon as the hydrolytic bacteria were solubilizing the organic matter, it was used and converted to methane and thus, no soluble COD was measured. It is worth mentioning that these values were markedly lower than the values attained in batch anaerobic digestion ( $138$  mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup>, (Mendez et al., 2013)). However, when compared to other studies conducted in CSTR mode, these results are in accordance with the study of Ras et al. (2011) dealing with the anaerobic digestion of raw *C. vulgaris*. In that study, total COD removal of 33% was achieved under HRT 16 days and OLR of  $1$  g COD ·day<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup>.



**Figure 11.** Inlet (closed symbols) and outlet (open symbols) concentrations of total COD (squares) and soluble COD (triangles) of the CSTRs fed with raw biomass (A) and thermally pretreated biomass (B).

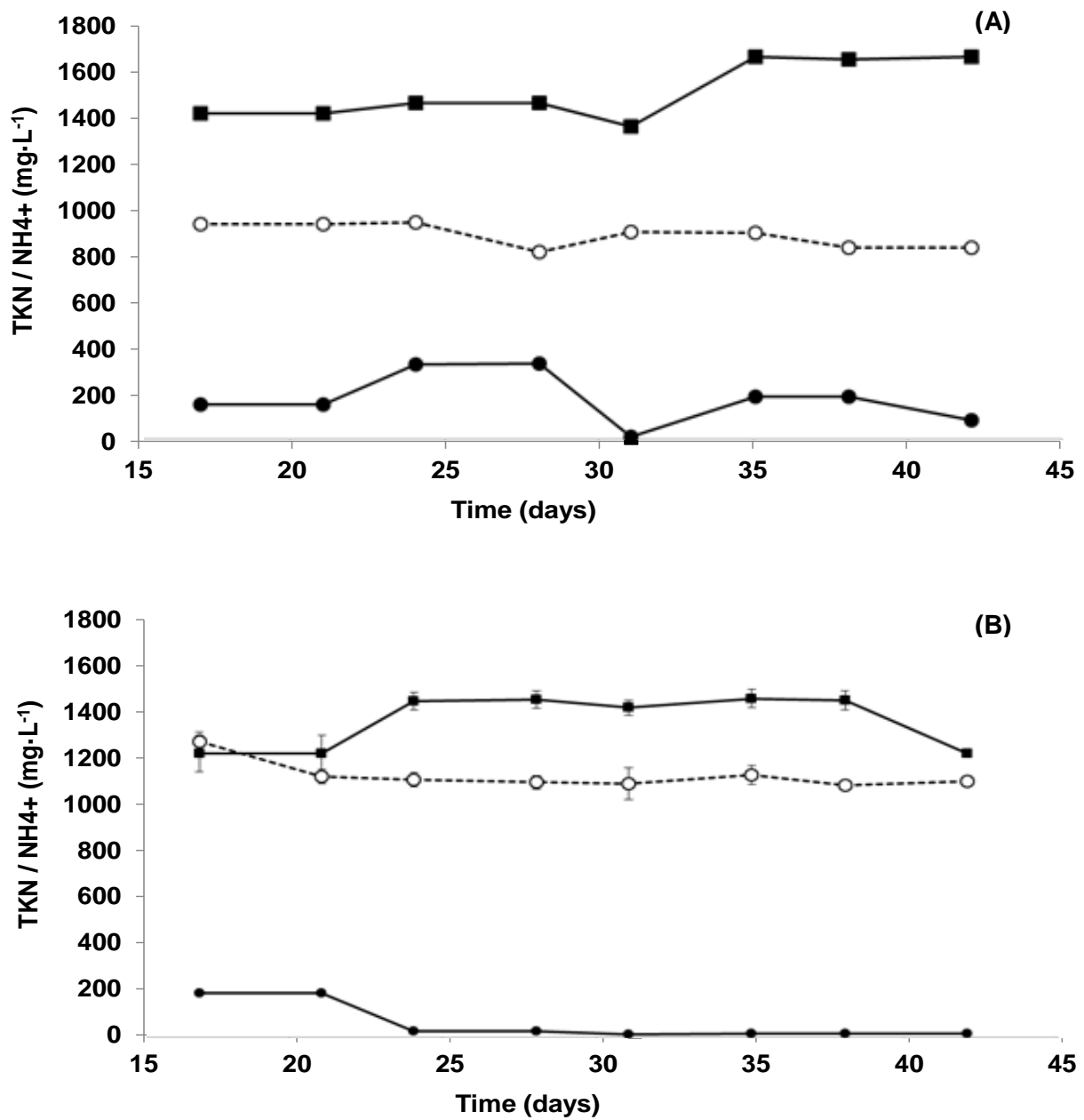
It has been previously shown that anaerobic digestion in batch mode of thermally pretreated *C. vulgaris* could lead to 1.93-fold methane yield enhancement with regard to that obtained from raw biomass (Mendez et al., 2013). This improvement was attributed to the cell wall disruption and organic matter solubilisation. When the CSTR was fed with the thermally pretreated biomass at the same OLR, 1.5-fold methane yield enhancement was reached in comparison with the CSTR fed with untreated biomass. The methane yield of this CSTR achieved  $126 \pm 25 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g CODin}^{-1}$ . The methane content of the biogas was around 72%. In this CSTR, total COD and VS removal was enhanced to  $49.7 \pm 3.8\%$  and  $41.5 \pm 3.5\%$ , respectively. These values were in agreement with other investigations dealing with similar microalgal biomass (Passos and Ferrer, 2015). Similarly to the CSTR fed with raw biomass, the CSTR fed with thermally treated biomass also provided lower methane yield than previously found in batch mode digestion. More specifically, in batch mode, thermal pretreatment enhanced methane yield by 1.93-fold while in semi-continuous operated reactors this value decreased to 1.5-fold. Overall, methane yield decreased 2-fold when results from batch digestion were compared to data obtained in CSTR. Passos and Ferrer (2015) determined a methane yield enhancement of 1.42-fold when digesting *Oocystis* sp. in CSTR operated at OLR of  $2.5 \text{ g tCOD} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  and HRT of 20 days. These results were fairly comparable to the values attained for the batch mode digestion. Nevertheless, other studies have also shown a decrease on methane yield when evaluating thermal pretreatment of microalgae in CSTRs. González-Fernández et al. (2013) reported methane yield of  $33 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g CODin}^{-1}$  and  $97 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g CODin}^{-1}$  with untreated and thermally pretreated *Scenedesmus* sp. respectively, when working at OLR  $1 \text{ g tCOD L}^{-1} \text{ day}^{-1}$  and HRT 15 days. However, when methane yield attained in batch mode was compared with the value obtained in CSTR, methane yield also decreased 1.54-fold. In the same line, Schwede et al. (2013) also observed a 2-fold decrease in methane yield when comparing the digestion of *Nannochloropsis salina* in batch and semi-continuous mode. In this sense, the scarce information available comparing digestion modes seem to merge to the conclusion of lower methane yield obtained in semi-continuous mode when compared to batch mode. Imbalances in the microbial population may lead to diminished methane yields since their optimal interaction is crucial for the maintenance of biogas production (Talbot et al., 2008). In order to elucidate the reasons for the differences observed in the different digestion modes, the interrelations between microbial ecology and the performance of anaerobic digesters are highly required. Up to now there is no significant information concerning

microbial population (*Bacteria* and *Archaea*) of digesters fed with this biomass. The main reason for that is related to the inappropriate separation of nucleic acids of eukaryotic and prokaryotic microorganisms and thus, DNA co-amplification may preclude the analysis (Bakke et al., 2011).

Regarding the soluble organic matter,  $92.4 \pm 2.3\%$  soluble COD removal was observed in the effluent of the CSTR fed with the pretreated biomass. Thereby, organic matter solubilisation taking place during the pretreatment plays an important role on methane production since it is readily available for anaerobic bacteria. In order to identify if this soluble organic matter corresponded to intermediate products, VFAs were also measured in the CSTRs effluents. However, no VFAs accumulation was observed. Both CSTRs exhibited a soluble COD of approximately  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , indicating that this soluble organic matter remaining in the effluent was recalcitrant to anaerobic digestion.

### 3.2.2. Nitrogen fate

An efficient conversion of organic matter into biogas entails as well a high nitrogen mineralization. During anaerobic digestion, the proteins of the substrate get degraded into ammonium. Taking into consideration the biomass protein content, the initial biomass used as substrate and the final ammonium concentration determined in the effluents of the anaerobic digesters, the organic nitrogen converted to ammonium (nitrogen mineralization) can be observed in Fig. 2. In the present study, nitrogen mineralization ranged  $52.4 \pm 9.4\%$  for the raw *C. vulgaris* biomass. This percentage is higher than the one reported by Ras et al. (2011). In this later study, the anaerobic digestion of raw *C. vulgaris* in a CSTR operated at HRT of 16 days resulted in 19% nitrogen mineralization while when operated at 28 days HRT, this value increased to 69%. In comparison, the CSTR fed with thermally pretreated biomass exhibited  $78.1 \pm 5.5\%$  nitrogen mineralization. Similarly to the trend observed for COD degradation, thermally pretreated biomass improved organic nitrogen degradation. Even though the ammonium concentration in the inlet of the reactor was not increased by the thermal treatment (Table 1), the pretreatment facilitated nitrogen mineralization. It is important to highlight this feature since a high nitrogen mineralization mediates a high ammonium concentration in the digestate which ultimately can be used again to grow microalgae.



**Figure 12.** Inlet (closed symbols) and outlet (open symbols) for TKN (squares) and ammonium (circles) concentration of the CSTRs fed with raw biomass (A) and thermally pretreated biomass (B).

Given the high nitrogen mineralization, special care should be given to the ammonium concentration in the reactors. As a result of the proteins breakdown, ammonium accumulation can inhibit the anaerobic digestion. Both forms ammonium and ammonia, have been reported powerful methanogens inhibitors. Particularly, free ammonia can inhibit the process at low concentrations ranging  $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Mc Carty and McKinney, 1961). The dissociation of ammonium into ammonia is highly affected by the pH and temperature. The effluent ammonium concentration ranged  $828.8 \pm 48.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $1141.1 \pm 66.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for the CSTRs fed with raw and pretreated biomass, respectively (Fig. 2). The pH measured in the outlets of the CSTRs averaged  $7.2 \pm 0.1$ . Given the acidification constant and the temperature at which the reactors were operated ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ), the ammonia concentration can be calculated. The obtained values were  $13.3 \pm 2.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for the reactor fed with fresh microalgae and  $23.2 \pm 4.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for the reactor fed with the thermally pretreated biomass. Therefore, no ammonia inhibition was detected. Despite the high protein content of the biomass used as substrate and the high nitrogen mineralization, the constant pH measured throughout the digestion helped avoiding ammonia inhibition. Similar results were observed previously in other studies working on batch assays and CSTRs (González-Fernández et al., 2013; Ras et al., 2011).

Overall, the follow up of common anaerobes inhibitors did not provide any evidence. One strategy can be the follow up of known inhibitors but when unknown, another useful approach is the analysis of the anaerobic microbiome. It is thus highlighted the need to further investigate microbial communities developed in digesters fed with microalgae and potential adaptation strategies to by-products coming along with this substrate.

## 4. Conclusion

Digester fed with thermally pretreated *C. vulgaris* increased 1.5-fold methane production compared with the CSTR fed with fresh biomass ( $84 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g CODin}^{-1}$ ). Nitrogen mineralization averaged 52 and 78% for raw and thermally treated *C. vulgaris*, respectively. Despite the high nitrogen mineralization registered, no ammonium/ammonia inhibition was detected. Overall, methane production yield was enhanced in CSTRs after thermally pretreating the microalgae biomass; nevertheless, the values attained were comparably lower than the obtained in batch mode digestion.

This study highlighted the need of further testing promising pretreatments in semi-continuous mode before claiming their effectiveness. Likewise, the need of studying microbial populations developed in these digesters was highlighted to enable the use of microbial indicators that could help the optimal performance of digesters.

## **Acknowledgements**

Authors want to thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for financial support to this project (WW-ALGAS, ENE2013-45416-R and RYC-2014-16823) and the WWTP of Valladolid (Spain) for kindly supply the anaerobic sludge. Ahmed Mahdy appreciates his PhD scholarship funded by the Ministry of Higher Education of Egypt.

## **References**

- Bakke, I., De Schryver, P., Boon, N., Vadstein, O., 2011. PCR-based community structure studies of Bacteria associated with eukaryotic organisms: A simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA, *Journal of Microbiological Methods*.
- Cho, S., Park, S., Seon, J., Yu, J., Lee, T., 2013. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresour. Technol.* 143, 330–6.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2013. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresour. Technol.* 129, 219–23.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 6, 205–218.
- González López, C.V., Cerón García, M. del C., Ación Fernández, F.G., Segovia Bustos, C., Chisti, Y., Fernández Sevilla, J.M., 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour. Technol.* 101, 7587–91.

- Ji, M.-K., Abou-Shanab, R.A.I., Kim, S.-H., Salama, E.-S., Lee, S.-H., Kabra, A.N., Lee, Y.-S., Hong, S., Jeon, B.-H., 2013. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecol. Eng.* 58, 142–148.
- Mc Carty, P.L., McKinney, R.E., 1961. Salt toxicity in anaerobic digestion. *J Water Pollut. Control Fed.* 33, 399–415.
- Mendez, L., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014a. Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. *Appl. Energy* 129, 238–242.
- Mendez, L., Mahdy, A., Demuez, M., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014b. Effect of high pressure thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: Organic matter solubilisation and biochemical methane potential. *Fuel* 117, 674–679.
- Mendez, L., Mahdy, A., Timmers, R.A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2013. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour. Technol.* 149, 136–41.
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J.P., Carrère, H., 2014. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 32, 934–51.
- Passos, F., Ferrer, I., 2015. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Res.* 68, 364–373.
- Ramos-Suárez, J.L., Carreras, N., 2014. Use of microalgae residues for biogas production. *Chem. Eng. J.* 242, 86–95.
- Ras, M., Lardon, L., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2011. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 102, 200–6.
- Schwede, S., Rehman, Z.-U., Gerber, M., Theiss, C., Span, R., 2013. Effects of thermal pretreatment on anaerobic digestion of *Nannochloropsis salina* biomass. *Bioresour. Technol.* 143, 505–11.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F., Massé, D.I., 2008. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Res.* 42, 513–37.





# **Artículo 5**

## **Microbial communities of biomethanization digesters fed with raw and heat pretreated microalgae biomasses**

Jose Luis Sanz <sup>a,\*</sup>, Patricia Rojas <sup>a</sup>, Ana Morato <sup>a</sup>, Lara Mendez <sup>b</sup>, Mercedes Ballesteros <sup>b,c</sup>, Cristina González-Fernández <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Biology, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Darwin 2, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> IMDEA Energy, Avda. Ramón de la Sagra 3, 28935 Móstoles, Madrid, Spain

<sup>c</sup> CIEMAT, Avda Complutense, 28040 Madrid, Spain

*Chemosphere*, 168 (2016)1013-1021

Doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.109

Reproduced with permission from Elsevier

ABSTRACT

Microalgae biomasses are considered promising feedstocks for biofuel and methane productions. Two Continuously Stirred Tank Reactors (CSTR), fed with fresh (CSTR-C) and heat pretreated (CSTR-T) *Chlorella* biomass were run in parallel in order to determine methane productions. The methane yield was 1.5 times higher in CSTR-T with regard to CSTR-C. Aiming to understand the microorganism roles within of the reactors, the sludge used as an inoculum (I), plus raw (CSTR-C) and heat pre-treated (CSTR-T) samples were analysed by high-throughput pyrosequencing. The bacterial communities were dominated by *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* and *Firmicutes*. *Spirochaetae* and *Actinobacteria* were only detected in sample I. *Proteobacteria*, mainly *Alfaproteobacteria*, were by far the dominant phylum within of the CSTR-C bioreactor. Many of the sequences retrieved were related to bacteria present in activated sludge treatment plants and they were absent after thermal pretreatment. Most of the sequences affiliated to the *Bacteroidetes* were related to uncultured groups. *Anaerolineaceae* was the sole family found of the *Chloroflexi* phylum. All of the genera identified of the *Firmicutes* phylum carried out macromolecule hydrolysis and by-product fermentation. The proteolytic bacteria were prevalent over the saccharolytic microbes. The percentage of the proteolytic genera increased from the inoculum to the CSTR-T sample in a parallel fashion with an available protein increase owing to the high protein content of *Chlorella*. To relate the taxa identified by high-throughput sequencing to their functional roles remains a future challenge.

**Keywords:** anaerobic digestion, biomethanization, *Chlorella vulgaris*, microalgae, pyrosequencing, thermal pre-treatment.

## 1. Introduction

Given the present global energetic situation, research on renewable sources for the production of biofuels has increasingly attracted the attention of policy makers, scientists and in general of the society. In this context, microalgae have been recognised as a promising feedstock to cope with this issue (Trivedi et al., 2015). Their biological characteristics bestow them with several advantages over the conventional crops as they do not need to make use of arable lands, they are able to grow on different media, including wastewater, and they contribute to the mitigation of the greenhouse gases by means of photosynthesis (Ji et al., 2013; Posadas et al., 2014).

Even though the upstream benefits derived from cultivating microalgae are clear: removal of pollutants (bioremediation) when cultivated in wastewater (Molinuevo-Salces et al., 2016), carbon dioxide uptake from flue gases (Brown, 1996; Muñoz and Guieysse, 2006), high biomass productivity (Krzemińska et al., 2014) for further revalorization into bio-products, the problem encountered nowadays involves the downstream biomass processing. In the context of biomass energy production, biogas generation is probably the least complex. Anaerobic digestion entails a straightforward process to produce energy since an intense concentration, drying, and oil extraction are not required. In addition, unlike other processes used to obtain biofuels such as bioethanol and biodiesel, with anaerobic digestion all macromolecular components may be used as a substrate (González-Fernández et al., 2015). Nonetheless, in order to achieve an optimal organic matter use, microalgae should be pre-treated so as to disrupt/solubilize their cell walls which constitute a physical barrier and confer protection. This protection also prevents from the attack by anaerobic hydrolytic bacteria. Thus, the cell wall hinders the complete digestion process hence resulting in low methane yields (González-Fernández et al., 2012; Mussgnug et al., 2010). Several methods have recently been assessed in order to achieve this goal, including thermal, thermochemical, ultrasound, microwave or biological approaches (González-Fernández et al., 2015). Thermal and enzymatic pretreatments have shown to be beneficial to increase methane yields in batch mode anaerobic digestions, through disrupting/solubilizing the polymeric cell structures when applied to the common robust microalgae (Mahdy et al., 2014; Mendez et al., 2014). More specifically, some studies have reported a methane yield enhancement of around 40% when a thermal

pretreatment to microalgae biomass was applied (Alzate et al., 2014; Mendez et al., 2013; Passos and Ferrer, 2015). Noteworthy to mention that these studies were performed in batch mode while to further assess the benefits of the pretreatments, performances of Continuously Stirred Tank Reactors (CSTRs) fed with microalgae biomasses should be evaluated. Literature dealing with microalgae biomasses fed in semi-continuous conditions is really scarce. In this sense, microalgae comprising such new feedstocks for anaerobic digestion still require additional research in order to deeply understand their bioconversion pathways into methane (Passos et al., 2014b; Ramos-Suárez and Carreras, 2014). For instance, little information really exists on the complex interaction of the anaerobic microflora conducting this degradation.

A deeper knowledge of the microbial populations involved in the anaerobic digestion of microalgae is of foremost importance so as to control the digester instabilities. Influence of the by-products released during the biomass pretreatment or the accumulation of secondary metabolites acting as inhibitors of the anaerobic populations can be studied by means of analysing the microbial communities. Thus, knowledge of the microbial populations involved in the process contributes to the successful conversion of the microalgae biomass into methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). To the best of our knowledge, so far only few studies have focused on the microbiota involved in the anaerobic digesters used for biogas production derived from microalgae.

Traditionally, research dealing with the analysis of the microbial communities has been undertaken using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Lakaniemi et al. (2011) tested *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomasses as feedstocks for H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production in anaerobic batch assays. From the DGGE profiles some genera could be identified, yet most of the amplified bacterial 16S rDNA sequences matched uncultured bacteria providing no information at the species-level. *Phaeodactylum tricornutum* was subjected to biomethanization in an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) (Zamalloa et al., 2012). The AnMBR communities, estimated by means of DGGE, were found to be moderate in species richness and low in community organization compared to the UASB and conventional CSTR reactor communities.

Currently, next generation sequencing technologies, such as pyrosequencing, have emerged in the molecular biology landscape providing an opportunity to further

deepen into the constituents of the anaerobic microbiome. Nolla-Ardèvol et al. (2015a) found in a biogas reactor fed with *Spirulina* that *Firmicutes* were the dominant phylum (38%), followed by *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* and *Thermotogae*. During the anaerobic digestion of *Scenedesmus*, the order *Bacteroidales* dominated the algal biogas community, although when the algal biomass was mixed with maize silage in order to improve the C/N relationship, the order *Clostridiales* was predominant during the co-digestion procedure (Wirth et al., 2015). Throughout of the anaerobic fermentation of microalgae biomasses (composed of *Desmodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. and *Chlamydomonas* sp.) using sludge as inoculum collected from an anaerobic digester at a local wastewater treatment plant, bacterial communities consisted mostly of the phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Firmicutes* (Cho et al., 2015).

In this context, the bacterial community composition of the biomass used as an inoculum, together with the communities developed within two CSTR digesters operated in a semi-continuous feed mode of fresh or heat pretreated *Chlorella vulgaris* biomasses were examined by 454 FLX+ high-throughput DNA pyrosequencing. The predominant populations at several taxonomic levels and their metabolic traits have been analyzed in this study.

## 2. Material and methods

### 2.1. Microorganisms

*C. vulgaris* was grown in a lab-scale photobioreactor under a continuous artificial illumination (fluorescent, 6,000 lux) and agitation supplied by air bubbling, having selected this microalga as the model microorganism due to its robustness and ability to grow in wastewater. Nevertheless, in order to be able to generate enough biomass to feed the bioreactors, during this study the biomass was cultured on Modified Bold Basal Medium (Mendez et al., 2014). Culture broth was periodically collected and the microalgae were concentrated by means of centrifugation (Heraeus Thermo Scientific) at 5,000 rpm during 10 minutes. The chemical composition of the *C. vulgaris* strain utilized in the present study is presented in Table SM1.

The sludge used as inoculum for the CSTRs was collected from an anaerobic sludge digester at the domestic wastewater treatment plant of Valladolid (Spain).

## 2.2. Pretreatments and analytical procedures

The microalgae batches were diluted to a standard concentration of 65 g dry weight (DW) ·L<sup>-1</sup> prior to undertaking the pretreatments. The thermal pretreatment was carried out by autoclaving the biomasses at 120 °C during 40 minutes as described by (Mendez et al., 2014).

Total solids (TS), volatile solids (VS), total Kjeldahl nitrogen (TKN), total and soluble COD (tCOD, sCOD), ammonium concentration, biogas composition, volatile fatty acids (VFAs), proteins, carbohydrates and lipids were determined as described by Mendez et al. (2015a).

## 2.3. Semi-continuous biogas production

Anaerobic digestion was carried out in two CSTRs comprising a volume of 1.5 L (1 L liquid and 0.5 L headspace). The anaerobic inoculum presented a volatile solids content (VS) of around 60% of the TS. To prevent photosynthetic activity digesters were covered with aluminium foil. The reactors worked at mesophilic conditions (35°C) using a water jacket connected to a water bath. Constant mixing was provided by magnetic stirrers at 250 rpm. The pH was monitored but not controlled. Biogas production was measured by water displacement and the methane content was periodically analysed by gas chromatography.

Reactors were operated in a semi-continuous mode, i.e. the same volume withdrawn was fed on a daily basis using plastic syringes. To verify the enhancement of the biogas production after undertaking the pretreatments, one reactor was fed with raw *C. vulgaris* biomass (CSTR-C) while the other reactor was fed with thermally pretreated biomass (CSTR-T). The organic loading rate (OLR) was set to 1.5 g COD ·L<sup>-1</sup> ·day<sup>-1</sup> in the case of both reactors. Previous studies performed in batch mode had shown that methane production was almost negligible after a 15 day digestion (Mendez et al., 2014), thus the hydraulic retention time (HRT) of 15 days was selected in an attempt to improve the *C. vulgaris* anaerobic digestion. Following three HRT the system was considered to be in a steady state, characterized by a stable gas production and a COD concentration.

### 2.4. Analysis of the bacterial communities: DNA extraction, PCR amplification and 454pyrosequencing

Biomass samples were collected from the reactors after 45 days. Samples were analyzed in parallel with the inoculum. In order to minimize the heterogeneity of the reactors' biomasses, three sub-samples were pooled. Total DNA extraction was performed using the FastDNA Spin kit for soil BIO101 (MPBio). Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase and the primer sets 27F and 907R, labeled with three different barcodes, were used for the PCR reactions (program: 3' at 95 °C followed by 28 cycles of 30" at 95 °C, 45" at 54 °C, and 90" at 68 °C, plus a final extension step of 10' at 68 °C). PCR products were purified with the Invitrogen Purelink kit. Library quantification was performed by the fluorometry method using the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit. A composite pyrosequencing sample was prepared by means of pooling approximately equal amounts of each sample's PCR amplicons. Pyrosequencing was performed by the Centro de Investigación Tecnológica e Innovación (CITIUSII, University of Sevilla, Spain) making use of a 454 FLX+System (Roche).

### 2.5. Phylogenetic and statistical data analysis

All processing of sequences was performed using the Mothur package v.1.36.0 ([www.mothur.org](http://www.mothur.org), Schloss et al., 2009). Scripts were encoded to (1) remove any sequences containing more than one ambiguous base ('N'), (2) check the completeness of the barcodes and of the adaptors, (3) remove any sequences shorter than 150 bp, and (4) remove any sequences including low quality base scores (Phred quality scores < 25).

Sequences were aligned with the SILVA 16S rRNA alignment Database Release 123 ([www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)). 454 Sequencing noises were removed with the Pre.cluster tool of the Mothur package and Chimeras introduced by the PCR process were detected and removed using ChimeraUquime. Suitable sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) defined by a 3% distance level based on the distance matrix. Taxonomic classification was performed with the SILVA 16S rRNA gene database (using the k-nearest neighbour consensus and Wang approaches). Confidence values less than 80% (at a phylum level) were considered as unclassified according to Wang et al. (2007).

Additional statistical and graphical evaluations were performed with the package Vegan (Oksanen et al., 2011) of the R language program (<http://www.R-project.org/>). Custom R scripts were used to normalize the taxonomic group counts in order to infer the relative abundances and to calculate the distance matrices of the samples and the taxonomic groups making use of Euclidean distance metrics. Complete-linkage (furthest neighbor) clustering was implemented to create the sample and taxa dendrograms.

The data set containing the sequences was deposited in the BioSample database at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), under the ID numbers SRR3645936 (Inoculum), SRR3646035 (CSTR-C) and SRR3646036 (CSTR-T).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. CSTRs performances

Methane yields, VS, tCOD and sCOD removal values are summarized in Table 1. The CSTR fed with fresh *C. vulgaris* provided a methane yield of 85 mL CH<sub>4</sub> ·gCODin<sup>-1</sup> while the tCOD and VS removals averaged respectively 37% and 32%. These results are in accordance with the study carried out by Ras et al. (2011) who reported 110 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup> and a tCOD removal of 33% when *C. vulgaris* was digested with a HRT of 16 days and an OLR of 1 g COD ·day<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>. Lower values were attained by González-Fernández et al. (2013) who reported methane yields of 33 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup> using an OLR of 1 g tCOD ·L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> and a HRT of 15 days when raw *Scenedesmus* sp. biomass was fed into a CSTR. It is noteworthy to mention that the latter study highlighted the sturdy cell wall of this microalga, which is even more difficult to degrade than that of *C. vulgaris*.

**Table 8.** Average values of the parameters measured in the CSTR reactors fed with raw and heat pretreated *C. vulgaris* biomasses.

	CSTR-C		CSTR-T	
<b>Methane yield</b> (ml CH <sub>4</sub> ·g CODin <sup>-1</sup> )	85.0	±15	126.0	±25
<b>% VS removed (g·L<sup>-1</sup>)</b>	31.9	±4.0	41.5	±3.8
<b>% tCOD removed (g·L<sup>-1</sup>)</b>	36.5	±6.0	49.7	±3.5
<b>% sCOD removed (g·L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	92.4	±2.3
<b>pH</b>	7.2	±0.1	7.3	±0.1
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (mg·L<sup>-1</sup>)</b>	652.5	±58.4	887.5	±54.4
<b>NH<sub>3</sub>-N (mg·L<sup>-1</sup>)</b>	9.8	±3.2	17.4	±3.9
<b>VFAs</b>		n.d		n.d

n.d.: not detected or value below 50 mg·L<sup>-1</sup>

When the pretreated biomass was used as a substrate, the CSTR-T produced 126 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup>, evidencing an increase of 1.5 times that with regard to the CSTR-C. Likewise, the tCOD and VS removal values were enhanced by respectively 50% and 42%. These values agree with other studies that have dealt with pretreated microalgae. González-Fernández et al. (2013) reported a methane yield of 97 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup> with thermally pretreated *Scenedesmus* sp. This methane yield corresponds to an enhancement of almost 66% with regard to the untreated biomass. Passos et al. (2014a) found 140-170 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup> at a HRT of 15 and 20 days, respectively, using a mixture of different microalgae which was subjected to a microwave pretreatment prior to use as a substrate, representing an enhancement of almost 1.4-1.5-fold with respect to the raw biomass. It should be stressed that the observed differences were probably due to the different microalgae used as well as to the pretreatment applied. Note that for the control reactor, the sCOD value was negligible since the contribution of the soluble organic matter in the fresh biomass was minimal, thus stressing that the applied pretreatments facilitated the assimilation of this organic matter by rendering it readily available for the digestion by anaerobic bacteria.

At this point, it is important to point out that the predominant macromolecule type of *C. vulgaris* consisted of the protein fraction, thus the evaluation of the nitrogen fate was relevant to fully understand the behaviour of the anaerobic microbiome. Nitrogen mineralization ranged from 52% with respect to the CSTR-C to approx. 78% of the CSTR-T. Ammonia, in equilibrium with ammonium, is much more toxic than the second compound (Rajagopal et al. 2013). Since the equilibrium is highly affected by the pH, the ammonium concentration and the pH were also measured in the digesters' effluents (Table SM1). The measured pH of the different reactors evidenced that the predominant inorganic nitrogen form was made up of ammonium and therefore, no ammonia inhibition was to be expected.

### 3.2. Bacterial community composition

The 454 FLX+ pyrosequencer System yielded a total of 54,877 reads. After having removed the low quality sequences, 14,931 (I), 2,885 (CSTR-C), 11,181 (CSTR-T) were further considered to carry out the analysis. The low number of CSTR-C reads included in the analysis deserves a comment. The total number of reads was similar with respect to each sample. However, the phylogenetic classification revealed that out of the 16,392 high-quality CSTR-C sequences a total of 13,507 sequences grouped into a single OTU which was affiliated to chloroplasts, consequently we decided to exclude these sequences from the subsequent analysis. The average read lengths were 770 bp with respect to I and CSTR-T and 840 with regard to CSTR-C, in this manner appropriate to undertake reliable taxonomic assignments.

Coverage, richness and evenness estimators were computed (Table 2). The specific richness index ( $S_{obs}$ ) computes the number of observed species within samples.  $S_{obs}$  and Chao1 (a coverage estimator based on  $S_{obs}$ ) as well as the number of single- and doubletons detected, evidenced a high richness (diversity) of the inoculum over the reactors. Similar results were found by Azizi et al. (2016) during the anaerobic digestion of *Gracilaria* under mesophilic and thermophilic conditions. The coverage of the observed species over the estimated species by Chao1 was 37-40% with respect to the three samples. Nonetheless, if Good's coverage estimator was considered, nearly a full census had been achieved regarding the three samples.

The values of the Simpson index were close to zero concerning all three samples, implying a very high diversity, although microbial diversity was higher in

CSTR-T than in CSTR-C. The values were similar at those reported by Azizi et al. (2016). The pattern of the Simpson index reported in a 37 °C semi-continuous CSTR reactor fed with *Spirulina* was also very similar (Nolla-Ardèvol et al., 2015a).

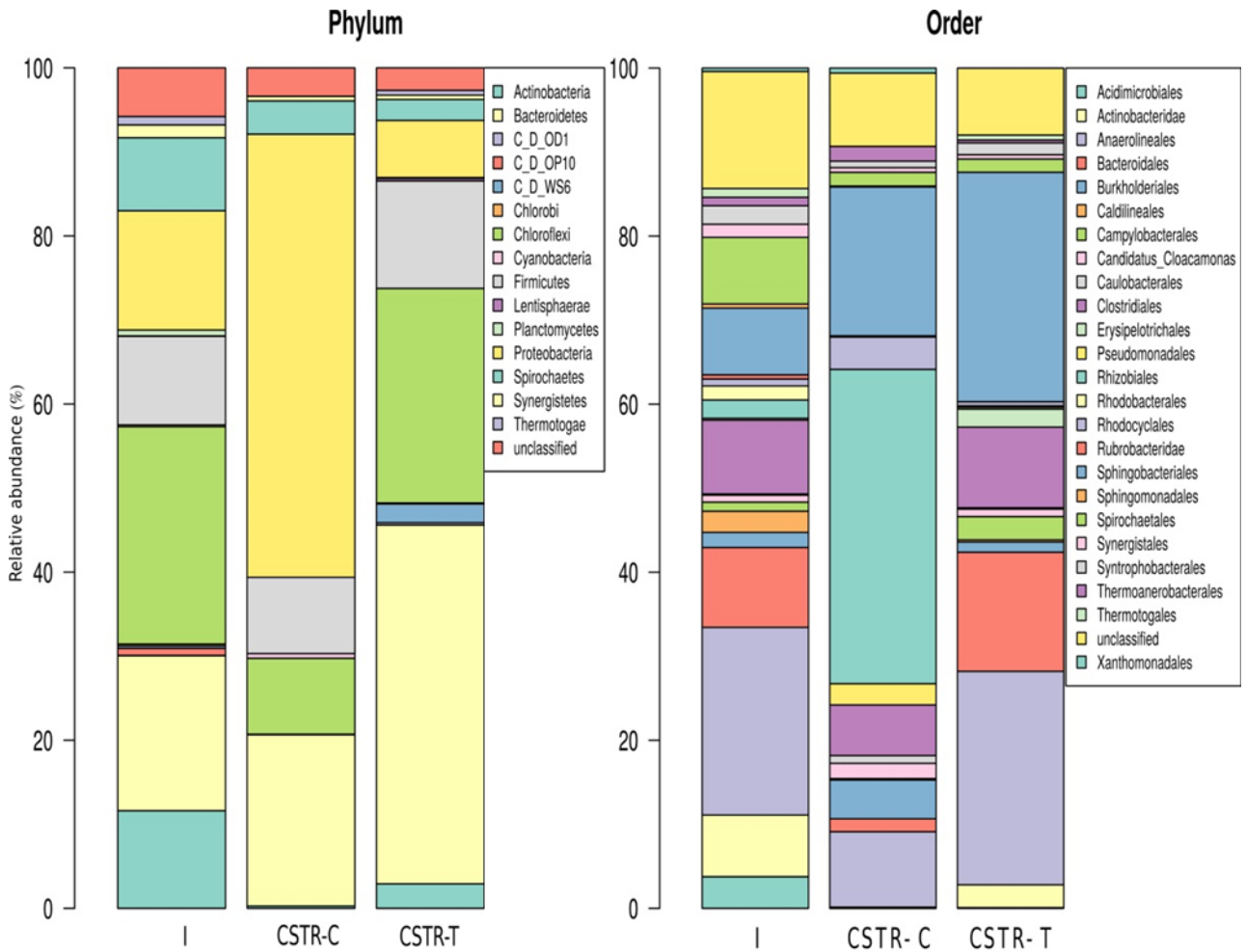
Both Shannon indexes ( $H > 3$ ,  $E_H > 0.6$ ) disclosed a high fairness (evenness). The Gini index, which considers the richness and the evenness, is a measure of inequality in a population and it ranges from zero, when all individuals are equal, to a maximum of one, in which every individual except one has a size of zero. Similar and high values (high diversity) were observed was very high in relation to the three samples. In general, the inoculum showed a higher richness, diversity and evenness, compared to the CSTR-C which evidenced lower values of richness, diversity and evenness.

**Table 9.** Coverage, diversity and evenness index estimates of the inoculum and the CSTR reactors fed with raw and heat pretreated *C. vulgaris* biomasses.

	I	CSTR-C	CSTR-T
<b>S<sub>obs</sub></b>	3467	463	1919
<b>Chao1</b>	8585 ±631	1251 ±274	5252 ±562
<b>Simpson</b>	0.009 ±0.0004	0.090 ±0.0016	0.032 ±0.0015
<b>Shannon (H)</b>	6.36 ±0.04	3.93 ±0.08	5.13 ±0.04
<b>Shannon evenness (E<sub>H</sub>)</b>	0.78	0.65	0.68
<b>Gini</b>	0.87	0.93	0.93
<b>Good's coverage</b>	99%	99%	99%

A total of 16 different accepted phyla and 7 candidate divisions were detected in the set of sequences (Figure 1). Although the most abundant phyla identified were the same with regard to all three samples, nevertheless, the microbial community structure of the inoculum changed with regard to that of the reactors. The most abundant phyla were *Proteobacteria* (13%, 50% and 6% with respect to I, CSTR-C and CSTR-T), *Bacteroidetes* (12%, 19% and 22%), *Chloroflexi* (23%, 9% and 25%) and *Firmicutes* (9%, 8% and 12%).

Sequences affiliated to the phyla *Spirochaetae* (7%) and *Actinobacteria* (7%) were retrieved only in a significant amount from the sludge used as inoculum. Overall 24%, 12% and 30% of the reads with respect to I, CSTR-C and CSTR-T could not be classified at the phyla level. The microbial communities identified in the samples studied, at the family and the genus level, are depicted in Figure 2.



**Figure 13.** Taxonomic profiles at the phylum (left) and the order (right) levels of the biomasses used as an inoculum with respect to both bioreactors studied. Only phyla and orders with a coverage higher than 0.2% of the total number of sequences of each sample have been considered. C\_D: candidate division *Actinobacteridae* and *Rubrobacteridae* are sub-classes of the phylum *Actinobacteria*.

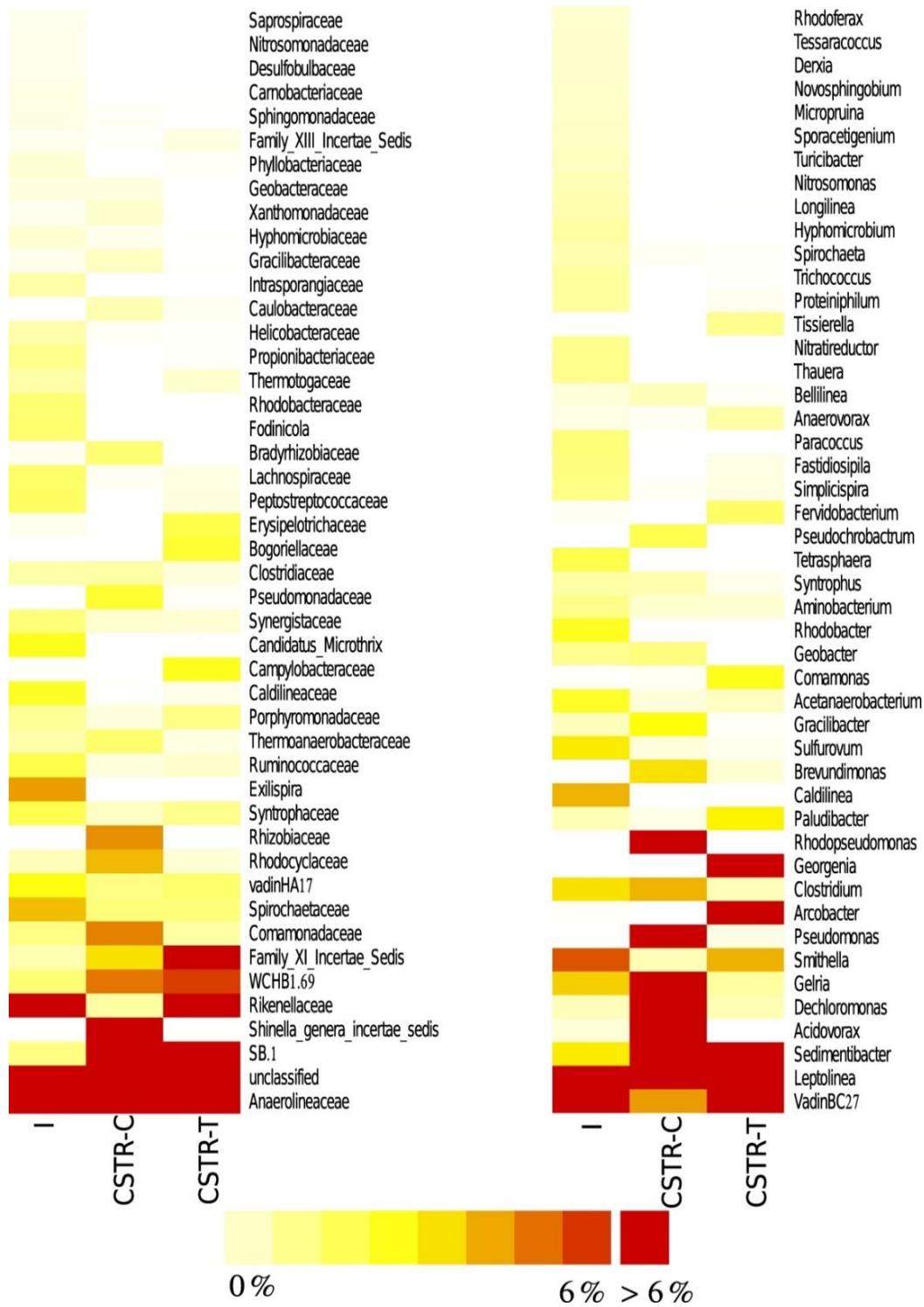
### 3.2.1. Microbial communities present in the inoculum

The inoculum sludge used covered 94.8% of the total sequences classified at a phylum level. These phyla were *Chloroflexi*, (fam. *Anaerolineaceae*); *Proteobacteria* (including members of all five classes, with a coverage ranging from 4.9 for *Alfa*- to 0.6 for *Gammaproteobacteria*) with *Rhodobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Syntrophaceae* and *Helicobacteraceae* appearing as the major families; *Bacteroidetes* (class *Bacteroidia*, fam. *Rikenellaceae* and *Porphyromonadaceae*, class *Sphingobacteriia*, fam. ST-12K33); *Firmicutes* (class *Clostridia*, fam. *Ruminococcaceae*, *Christensenellaceae* and *Peptostreptococcaceae*), *Spirochaetes* (fam. *Spirochaetales Incertae Sedis* and *Spirochaetaceae*) and *Actinobacteria* (fam. *Propionibacteriaceae* and *Intrasporangiaceae*) (Figures 1 and 2).

A similar proportion of bacterial populations has been detected in other anaerobic reactors by high-throughput sequencing (Guo et al., 2015; Sundberg et al., 2013; Yang et al., 2014), with the exception of *Chloroflexi*. Slight differences could be distinguished among the several digesters studied, probably due to the wastewater composition and to the imposed operational conditions nevertheless on the whole, the bacterial composition at phylum level was quite constant and similar to that identified in the inoculum of the present study.

### 3.2.2. Microbial communities present in the reactors

3.2.2.1. *Proteobacteria*. This phylum was by far the most prevalent in the CSTR-C sample, i.e. 50% of the total reads after removal of the chloroplast sequences were affiliated to this taxonomic group. *Alfaproteobacteria* accounted for 37% of the reads, with *Shinella genera incertae sedis* and *Rhizobiaceae* as the major families. *Comamonadaceae*, *Rhodocyclaceae (Betaproteobacteria)* and *Pseudomonadaceae (Gammaproteobacteria)* were also common (all higher than 2.5%). In sharp contrast, their presence within of the reactor fed with the heat pretreated biomass (CSTR-T) was scarce (6%) and conversely restricted to the *Campylobacteraceae*, *Syntrophaceae* and *Comamonadaceae* families which comprised 5% of the total sequences (Figure 2).



**Figure 14.** Heatmap of the most abundant families (left) and genera (right) identified in the inoculum, reactor fed with the fresh *Chlorella* biomass and reactor fed with the thermal pre-treated *Chlorella* biomass. Percentages have been calculated considering the number of sequences affiliated to each family/genus versus the total number of sequences of each sample. Taxa with coverage lower than 0.15% have been excluded.

Sequences affiliated to the *Comamonadaceae* and *Rhodocyclaceae* families were found in all three samples, although they were four-times more abundant in the reactor fed with the fresh *Chlorella*. *Comamonas* (former *Pseudomonas*, fam. *Comamonadaceae*) and *Shinella* (former *Zoogloea*, fam. *Rhodocyclaceae*) play key roles in aerobic sewage treatment plants forming activated sludge (it must be kept in mind that the biomass from an activated sludge biodigester was used in the present study as inoculum). *Zoogloea* /*Shinella* comprises the typical activated sludge bacterium responsible for the formation of activated sludge flocs (Juretschko et al., 2002; Zhang et al., 2012). Several species belonging to the *Comamonas* genus have been isolated from activated sludge (Boon et al., 2000; Gumaelius et al., 2001; Kim et al., 2008). Most of the genera included in the *Alpha*-, *Beta*- and *Gammaproteobacteria* are considered to be typical aerobic bacteria, and thus, their presence within of anaerobic digesters can be considered as striking (Garrity et al., 2005). Even more, some taxa were identified in a high proportion, e.g. sequences affiliated to *Rhizobiales-Shinella* genus *incertae sedis* amounted to 28.5% of the total CSTR-C reads. This high proportion was the reason for the predominance of *Proteobacteria* in the CSTR-C over the other two samples. The genus *Shinella* was proposed as a novel bacterial strain isolated from an UASB reactor (An et al., 2006). The strain was isolated under aerobic conditions although the reactor had been operating anaerobically during 2 years. This is a good example of how bacteria can survive during long time periods in conditions that apparently are not appropriate, allowing to explain the presence of aerobic genera in our samples. Although the role of *Shinella* spp. remain uncertain in anaerobic systems, sequences closed to *S. granuli* and *S. zoogloeoides* have been retrieved, respectively, from anaerobic reactors fed with grass silage (Wang et al., 2010) and from an anaerobic microbial lignocellulose-degrading consortium (Yan et al., 2012). It is reasonable to speculate that *Shinella* spp. could be involved in the degradation of recalcitrant compounds, such as the polysaccharides and glycoprotein matrix of the *C. vulgaris* cell wall, justifying their high presence in the reactor fed with fresh *Chlorella*. The presence of genera affiliated to the *Syntrophaceae* (*Smithella*, *Syntrophus*) ought to be highlighted. These genera are usually found in fresh- and wastewater treatment plants, growing in syntrophic association with H<sub>2</sub>-utilizing microorganisms, oxidizing substrates into acetate.

3.2.2.2. *Bacteroidetes*. The proportion of sequences affiliated to this phylum was quite similar with respect to both reactors: 18.7 % in CSTR-C and 21.6 % in CSTR-T.

Nonetheless, the reads were distributed in a different way among families. The most recurrent families in CSTR-C consisted of SB-1, WCHB1-69 and VadinHA17, lacking cultivated members. Rikenellaceae (vadinBC27 wastewater-sludge group) and ST-12K33 were highly predominant in CSTR-T.

All of the species included in the class *Bacteroidia* are strict anaerobes, chemoorganotrophs, gaining energy from proteins or as in the case of the *Porphyromonadaceae* from sugar fermentation. The major end products entail succinic, propionic and/or acetic acids, depending on the given genus involved. They stem from an intestinal origin or have been isolated from sediments or wastewaters.

Within of the class *Sphingobacteriia*, order *Sphingobacteriales*, the sequences affiliated to the described families *Sphingobacteriaceae*, *Chitinophagaceae* and *Saprospiraceae* were scarce. Most groups, as for instance ST-12K33, SB-1, WCHB1-69 and vadinAH-17, are currently only made up of uncultured members. For this reason, their metabolic roles within of the reactors remain uncertain. In spite of this, the odd bacterial population behaviour of both reactors must be pointed out: SB-1, WCHB1-69 and VadinHA-17 were highly predominant in CSTR-C whilst the group ST-12K33 was absent, in contrast, with respect to CSTR-T the opposite was observed (Figure 2). Even so, the predominance of the uncultured groups in this phylum is not surprising, as a matter of fact, during the anaerobic digestion of *Spirulina* for biogas production the hydrolysis of the biomass was mainly carried out by *Bacteroidetes* of the non-cultivated "ML635J-40 aquatic group" (Nolla-Ardèvol et al., 2015b).

3.2.2.3. *Chloroflexi*. This phylum was widely represented in all samples: 22.6%, 9.1% and 25% with respect to I, CSTR-C and CSTR-T. *Anaerolineaceae* comprised the sole family detected. *Chloroflexi* encompass multicellular filamentous microorganisms. Although the phylum is known as the "green non-sulfur bacteria", members of the classes *Anaerolineae* and *Caldilineae* lack phototrophic capability (Yamada et al., 2006). The sequences retrieved from our reactors were mostly related to the genera *Leptolinea*, *Anaerolinea* and *Longilinea*, originally isolated from anaerobic granular sludge of UASB reactors (Yamada et al., 2006, 2007). Since *Anaerolineae*-type sequences have frequently been located within of anaerobic reactors, these organisms could possibly be ubiquitous and could play important roles in these systems. They are all strictly anaerobic microorganisms and their major fermentative products are made up of acetate, lactate and hydrogen.

3.2.2.4. *Firmicutes*. Nearly all of the sequences retrieved that belonged to this phylum were affiliated to the order *Clostridiales*. All of the species are obligate anaerobes, most of them having a chemo-organotrophic fermentative metabolism. The exception having been the sequences related to the family *Erysipelotrichaceae*, class *Erysipelotrichia*, which encompass facultative anaerobic and weak fermentation capable bacteria. *Erysipelotrichaceae* was only observed in CSTR-T and their sequences could not be classified at the genus level.

Although many genera were identified in our samples: e.g. *Fastidiosipila*, *Acetivibrio*, *Ruminococcus*, *Saccharofermentans*, *Oscillibacter*, *Intestinimonas* (all fam. *Ruminococcaceae*), *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Gracilibacter*, *Anaerovorax*, *Proteiniclasticum*, *Sporacetigenium*,

*Anaerovirgula*, *Gelria*, etc. (Figure 2) all of them displayed a low coverage. Most of the reads were related to uncultured bacteria or continue to be unclassified at the genus or even at the family level. Even more, most of the existing bacterial families have so far been described based on phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene sequence (De Vos et al., 2009). Consequently, it remains difficult (even impossible) to know for sure the metabolic roles of many OTUs affiliated to this phylum. However, some trends can be drawn. In general, clostridia and related genera/families carry out the hydrolysis of macromolecules and the fermentation of by-products, although some genera metabolize carbohydrates, proteins or both. The end-products are typically volatile fatty acids, ethanol, hydrogen and carbon dioxide, in different proportions depending on the species. Some metabolic traits will be further discussed in the next section. The presence of the *Ruminococcaceae*, *Peptostreptococcaceae* and the *Christensenellaceae* families was only detected in the inoculum. Members of the first two families are frequently found in natural (gut, sediments) or engineered (municipal solid waste or wastewater treatment plants) anaerobic environments (Cardinali-Rezende et al., 2016; Tang et al., 2015). The family *Christensenellaceae* (which encompasses only one described species - *C. minuta*), is part of the gut microbiome. Therefore, its presence in an anaerobic digester of municipal wastewater is to be expected.

### 3.3. Metabolic traits

Although scarcely 20-25% of the sequences retrieved could reliably be identified at the genus level (Figure 2) (most of the reads corresponded to unclassified or uncultured genera), some ecological and metabolic traits could nevertheless be inferred (Table 3). Many of the genera have been isolated or else sequences belonging to them retrieved from water and wastewater, in this manner from aerobic sewage treatment plants (activated sludge) or anaerobic wastewater facilities (UASB and granular sludge or sludge digesters). As expected they are mostly anaerobic species, albeit the proportions differed among samples. Whereas the inoculum and the reactor fed with the heat pretreated biomass had high levels of anaerobic bacteria, the percentage of aerobic bacteria was relatively high with respect to the reactor fed with the fresh *Chlorella*. The protection bestowed by the hard cell wall of *Chlorella* against the hydrolytic bacteria avoided or decreased the use by fermentative bacteria of the algae as a feedstock, as evidenced by the lower biogas production compared to the reactor fed with the thermal pre-treated biomass. As already stated in the previous section (*Proteobacteria*), the presence of aerobic bacteria in a methanogenic reactor is not as surprising as would seem. *Comamonas*, *Pseudomonas* or *Shinella* are abundant in sewage treatment plants since they can survive as resting forms in anaerobic digesters. Furthermore, nearly half of the genera identified harboured species which are capable of metabolizing nitrate respiration.

Metabolic capability differences must also be highlighted. The proteolytic bacteria were dominant over the saccharolytic microbiota throughout all of the samples. The reason being was the substrate used as a feedstock. Inoculum was taken from a digester fed with primary sludge (suspended solids from a domestic sewage system) and secondary sludge (microbial biomass from an activated sludge system), consequently containing proteins along with carbohydrates and therefore resulting in a similar percentage of proteolytic and saccharolytic bacteria. Proteins comprise the major component of the *Chlorella* biomass (Table SM1; (Mendez et al., 2015) so that the predominance of the proteolytic and amino acid fermentative bacteria over the saccharolytic bacteria is not surprising. The percentage of the proteolytic genera increased from the inoculum to the CSTR-T sample in a parallel fashion with the increase of Family XI *Incertae Sedis* (Figure 2). Most of the genera nowadays included in Family XI *Incertae Sedis* metabolize peptone and amino acids while they do not

ferment carbohydrates (De Vos et al., 2009). Simultaneously with the advances attained in elucidating the microbial diversity of the reactors, an effort must be undertaken to gain insight of the yet-to-be cultured microbes, e.g. isolation and metaproteomic characterization of the uncultured bacteria. Linking the data gained by the new generation sequencing techniques to the functional role of the microorganisms isolated would aid in the management operations of the full-scale anaerobic digestion systems thus enhancing the production of biogas. This however, remains a future challenge yet to be solved.

**Table 10.** Metabolic traits of the genera identified with respect to the inoculum and the CSTR reactors fed with raw and heat pre-treated *C. vulgaris* biomasses.

	I	CSTR-C	CSTR-T
<b>Fermenters</b> <sup>a</sup>	20.0	11.6	23.0
<b>(% anaerobes)</b> <sup>b</sup>	(86.4)	(55.9)	(78.2)
<b>Aerobes</b> <sup>c</sup>	4.4	11.3	6.8
<b>(% aerobes)</b>	(15.4)	(44.1)	(21.8)
<b>Proteolytic (%)</b> <sup>d</sup>	17.6	26.0	55.8
<b>Saccharolytic (%)</b> <sup>d</sup>	13.9	3.0	11.1

a. Values have been calculated considering the total number of high quality sequences retrieved from each sample. Genera as *Leptolinea*, *Caldilinea*, *Sedimentibacter*, *Gelria*, *Clostridium*, *Acetanaerobacterium*, *Gracilibacter*, *Fastidiosipila*, *Paludibacter*, *Proteiniphilum*, *Trichococcus*, *Turicibacter*, *Bellilinea*, *Anaerovorax* and *Tissierella*, most affiliated to the *Clostridiales* and *Bacteroidales* orders, were identified.

b. Values represent the percentage of anaerobic versus aerobic bacteria. Fermenter and anaerobic respiration non-fermentative bacteria (e.g. *Geobacter*, *Sulfurovorum*, *Syntrophus*) plus purple phototrophic bacteria (e.g. *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*) have been considered as "anaerobes".

c. Genera encompassed among others *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Dechloromonas*, *Acidovorax*, *Arcobacter*, *Simplicispira*, *Tetrasphaera*, *Paracoccus*, *Georgenia* plus several genera harboring denitrifying species, most affiliated to the *Alpha-* and *Betaproteobacteria*.

d. Percentages have been calculated exclusively considering the obligate proteolytic / amino acid fermentative genera (e.g. *Sedimentibacter*, *Aminobacterium*, *Fastidiosipila*, *Proteiniphilum*) or the obligate saccharolytic / sugar fermentative genera (e.g. *Acetanaerobacterium*, *Paludibacter*, *Sporacetigenium*) versus the total number of fermentative genera. The uncultured genus *VadinBC27* has been excluded since its metabolic capabilities remain unclear.

## 4. Conclusions

The thermal pretreatment of the *C. vulgaris* biomass showed to improve the methane yield compared with fresh biomass. The present study has evidenced how high-throughput DNA sequencing allows to deepen our knowledge on the microbial diversity of bacteria degrading algae biomasses in methanogenic bioreactors. Members of the orders *Bacteroidales* and *Clostridiales* were abundant within of all the samples, while *Proteobacteria* were found to be predominant in the reactor fed with the fresh *Chlorella* biomass, apparently as a consequence of the difficulty to breakdown the algae cell walls. Although the proteolytic bacteria seemed to be predominant over the saccharolytic genera, in accordance with the high protein content of the microalgae cells, a high number of the sequences retrieved had a relatively low sequence similarity to cultured species, this fact being recurrent in studies on the microbial communities present in engineered systems which renders difficult to establish the exact functional role of the taxa identified.

## Supplementary material

**Table SM 1.** Average values of the chemical characterization of the *Chlorella vulgaris* raw and heat pretreated biomasses used as feedstock of the CSTRs

	CSTR-C	CSTR-T
<b>Total solids (g·L<sup>-1</sup>)</b>	59.7±5.1	65.2±0.4
<b>Volatile solids (g·L<sup>-1</sup>)</b>	55.1±4.3	60.2±0.8
<b>Inorganic materials (g·L<sup>-1</sup>)</b>	4.7±6.7	5.0±0.9
<b>tCOD (g·L<sup>-1</sup>)</b>	103.4±9.4	99.1±11.6
<b>sCOD (g·L<sup>-1</sup>)</b>	1.9±0.5	20.0±3.5
<b>tProteins (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	641.9±42.1	643.0±47.1
<b>tCarbohydrates (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	191.8±37.6	210.2±23.9
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (g·L<sup>-1</sup>)</b>	0.3±0.2	0.2±0.2

## Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for the financial support provided through the grants ENE2013-45416-R, RYC-2014-16823 and CTM2013-44734-R (MINECO-FEDER/EU). We would also like to acknowledge the Community of Madrid for the support offered in the framework of the project INSPIRA-1 (S2013/ABI-2783) and in addition to the WWTP of Valladolid (Spain) for kindly supplying the anaerobic sludge samples.

## References

- Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I., 2014. Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. *Chem. Eng. J.* 243, 405–410. doi:10.1016/j.cej.2013.07.076
- An, D.-S., Im, W.-T., Yang, H.-C., Lee, S.-T., 2006. *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 443–448. doi:10.1099/ijs.0.63942-0
- Azizi, A., Kim, W., Lee, J.H., 2016. Comparison of microbial communities during the anaerobic digestion of *Gracilaria* under mesophilic and thermophilic conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 158. doi:10.1007/s11274-016-2112-6
- Boon, N., Goris, J., De Vos, P., Verstraete, W., Top, E.M., 2000. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2906–2913. doi:10.1128/AEM.66.7.2906-2913.2000
- Brown, L.M., 1996. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Convers. Manag.* 37, 1363–1367. doi:10.1016/0196-8904(95)00347-9
- Cardinali-Rezende, J., Rojas-Ojeda, P., Nascimento, A.M.A., Sanz, J.L., 2016. Proteolytic bacterial dominance in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor assessed by 454 pyrosequencing technology. *Chemosphere* 146, 519–525. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.12.003
- Cho, H.U., Kim, Y.M., Choi, Y.-N., Kim, H.G., Park, J.M., 2015. Influence of temperature on volatile fatty acid production and microbial community structure during anaerobic fermentation of microalgae. *Bioresour. Technol.* 191, 475–480. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.009

- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W. (Eds.), 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 3, The Firmicutes, 2nd ed. Springer, Dordrecht.
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2, The Proteobacteria, 2nd ed. Springer, Dordrecht.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2013. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresour. Technol.* 129, 219–23. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.123
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 6, 205–218. doi:10.1002/bbb.337
- González-Fernández, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B., 2015. Anaerobic digestion of microalgal biomass: challenges, opportunities and research needs. *Bioresour. Technol.* 198, 896–906. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.095
- Gumaelius, L., Magnusson, G., Pettersson, B., Dalhammar, G., 2001. *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 999–1006. doi:10.1099/00207713-51-3-999
- Guo, J., Peng, Y., Ni, B.-J., Han, X., Fan, L., Yuan, Z., 2015. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microb. Cell Fact.* 14, 33. doi:10.1186/s12934-015-0218-4
- Ji, M.-K., Abou-Shanab, R.A.I., Kim, S.-H., Salama, E.-S., Lee, S.-H., Kabra, A.N., Lee, Y.-S., Hong, S., Jeon, B.-H., 2013. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecol. Eng.* 58, 142–148. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.06.020
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., Wagner, M., 2002. The Microbial Community Composition of a Nitrifying-Denitrifying Activated Sludge from an Industrial Sewage Treatment Plant Analyzed by the Full-Cycle rRNA Approach. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 84–99. doi:10.1078/0723-2020-00093
- Kim, K.-H., Ten, L.N., Liu, Q.-M., Im, W.-T., Lee, S.-T., 2008. *Comamonas granuli* sp. nov., isolated from granules used in a wastewater treatment plant. *J. Microbiol.* 46, 390–395. doi:10.1007/s12275-008-0019-0
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M., Tys, J., 2014. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 735–741. doi:10.1007/s00449-013-1044-x

- Lakaniemi, A.-M., Hulatt, C.J., Thomas, D.N., Tuovinen, O.H., Puhakka, J.A., 2011. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. *Biotechnol. Biofuels* 4, 34. doi:10.1186/1754-6834-4-34
- Mahdy, A., Mendez, L., Blanco, S., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014. Protease cell wall degradation of *Chlorella vulgaris*: Effect on methane production. *Bioresour. Technol.* 171, 421–7. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.091
- Mc Carty, P.L., McKinney, R.E., 1961. Salt toxicity in anaerobic digestion. *J Water Pollut. Control Fed.* 33, 399–415.
- Mendez, L., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2015. Biomethane production using fresh and thermally pretreated *Chlorella vulgaris* biomass: A comparison of batch and semi-continuous feeding mode. *Ecol. Eng.* 84, 273–277. doi:10.1016/j.ecoleng.2015.09.056
- Mendez, L., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014. Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. *Appl. Energy* 129, 238–242. doi:10.1016/j.apenergy.2014.04.110
- Mendez, L., Mahdy, A., Timmers, R.A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2013. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour. Technol.* 149, 136–41. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.136
- Molinuevo-Salces, B., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2016. From piggery wastewater nutrients to biogas: Microalgae biomass revalorization through anaerobic digestion. *Renew. Energy* 96, 1103–1110. doi:10.1016/j.renene.2016.01.090
- Muñoz, R., Guieysse, B., 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res.* 40, 2799–815. doi:10.1016/j.watres.2006.06.011
- Mussnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150, 51–6. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.07.030
- Nolla-Ardèvol, V., Peces, M., Strous, M., Tegetmeyer, H.E., 2015a. Metagenome from a *Spirulina* digesting biogas reactor: analysis via binning of contigs and classification of short reads. *BMC Microbiol.* 15, 277. doi:10.1186/s12866-015-0615-1
- Nolla-Ardèvol, V., Strous, M., Tegetmeyer, H.E., 2015b. Anaerobic digestion of the microalga *Spirulina* at extreme alkaline conditions: biogas production, metagenome, and metatranscriptome. *Front. Microbiol.* 6, 597. doi:10.3389/fmicb.2015.00597

- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., O'hara, R.B., 2011. *Vegan:Community Ecology Package*. R Package Version 2.3-5. The Comprehensive R Archive Network Website.
- Passos, F., Ferrer, I., 2015. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Res.* 68, 364–373. doi:10.1016/j.watres.2014.10.015
- Passos, F., Hernández-Mariné, M., García, J., Ferrer, I., 2014a. Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. *Water Res.* 49, 351–9. doi:10.1016/j.watres.2013.10.013
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., Ferrer, I., 2014b. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: a review. *Bioresour. Technol.* 172, 403–412. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.114
- Posadas, E., García-Encina, P.A., Domínguez, A., Díaz, I., Becares, E., Blanco, S., Muñoz, R., 2014. Enclosed tubular and open algal–bacterial biofilm photobioreactors for carbon and nutrient removal from domestic wastewater. *Ecol. Eng.* 67, 156–164. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.03.007
- Rajagopal, R., Massé, D.I., Singh, G., 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresour. Technol.* 143, 632–41. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.030
- Ramos-Suárez, J.L., Carreras, N., 2014. Use of microalgae residues for biogas production. *Chem. Eng. J.* 242, 86–95. doi:10.1016/j.cej.2013.12.053
- Ras, M., Lardon, L., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2011. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 102, 200–6. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.146
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
- Sundberg, C., Al-Soud, W.A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S.S., Svensson, B.H., Sørensen, S.J., Karlsson, A., 2013. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 612–626. doi:10.1111/1574-6941.12148

- Tang, Y.-Q., Shigematsu, T., Morimura, S., Kida, K., 2015. Dynamics of the microbial community during continuous methane fermentation in continuously stirred tank reactors. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 375–383. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.09.014
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D.P., Kaul, S., Garg, M.O., 2015. Algae based biorefinery—How to make sense? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47, 295–307. doi:10.1016/j.rser.2015.03.052
- Wang, H., Vuorela, M., Keränen, A.-L., Lehtinen, T.M., Lensu, A., Lehtomäki, A., Rintala, J., 2010. Development of microbial populations in the anaerobic hydrolysis of grass silage for methane production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 496–506. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00850.x
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. doi:10.1128/AEM.00062-07
- Wirth, R., Lakatos, G., Böjti, T., Maróti, G., Bagi, Z., Kis, M., Kovács, A., Ács, N., Rákhely, G., Kovács, K.L., 2015. Metagenome changes in the mesophilic biogas-producing community during fermentation of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *J. Biotechnol.* 215, 52–61. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.396
- Yamada, T., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Sekiguchi, Y., 2007. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2299–2306. doi:10.1099/ijs.0.65098-0
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., 2006. *Anaerolinea thermolimosae* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1331–1349. doi:10.1099/ijs.0.64169-0
- Yan, L., Gao, Y., Wang, Y., Liu, Q., Sun, Z., Fu, B., Wen, X., Cui, Z., Wang, W., 2012. Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. *Bioresour. Technol.* 111, 49–54. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.173
- Yang, Y., Yu, K., Xia, Y., Lau, F.T.K., Tang, D.T.W., Fung, W.C., Fang, H.H.P., Zhang, T., 2014. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5709–5718. doi:10.1007/s00253-014-5648-0

Zamalloa, C., De Vrieze, J., Boon, N., Verstraete, W., 2012. Anaerobic digestibility of marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in a lab-scale anaerobic membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 859–869. doi:10.1007/s00253-011-3624-5

Zhang, T., Shao, M.-F., Ye, L., 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.* 6, 1137–1147. doi:10.1038/ismej.2011.188





# **Artículo 6**

## **Chlorella vulgaris vs cyanobacterial biomasses: Comparison in terms of biomass productivity and biogas yield**

Lara Mendez<sup>a</sup>, Ahmed Mahdy<sup>a,b</sup>, Mercedes Ballesteros<sup>a,c</sup>, Cristina González-  
Fernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IMDEA Energy, Avda. Ramón de la Sagra 3, 28935 Móstoles, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Agricultural Microbiology, Zagzig University, 44519 Sharkia,  
Egypt

<sup>c</sup> CIEMAT, Avda. Complutense, 28040 Madrid, Spain

*Energy Conversion and Management, 92 (2015) 137-142*

*Doi: 10.1016/j.enconman.2014.11.050*

Reproduced with permission from Elsevier

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare cyanobacteria strains (*Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena planctonica*, *Borzia trilocularis* and *Synechocystis* sp.) and microalgae (*Chlorella vulgaris*) in terms of growth rate, biochemical profile and methane production. Cyanobacteria growth rate ranged 0.5-0.6 day<sup>-1</sup> for *A. planctonica*, *A. ovalisporum* and *Synechocystis* sp. and 0.4 day<sup>-1</sup> for *B. trilocularis*. Opposite, *C. vulgaris* maximum growth rate was double (1.2 day<sup>-1</sup>) than that of cyanobacteria. Regarding the methane yield, microalgae *C. vulgaris* averaged 120 mL CH<sub>4</sub> ·g CODin<sup>-1</sup> due to the presence of a strong cell wall. On the other hand, anaerobic digestion of cyanobacteria supported higher methane yields. *B. trilocularis* and *A. planctonica* presented 1.42-fold higher methane yield than microalgae while this value was raised to approximately 1.85-fold for *A. ovalisporum* and *Synechocystis* sp. In the biogas production context, this study showed that the low growth rates of cyanobacteria can be overcome by their increased anaerobic digestibility when compared to their microalgae counter partners, such is the case of *C. vulgaris*.

Keywords: Microalgae; Cyanobacteria; Growth rate; Macromolecular profile; Methane production.

## 1. Introduction

Algae biofuels may provide a viable alternative to fossil fuels. Among biofuel production processes using microalgal biomass, biogas generation seems to be the least complex. Opposite to biodiesel and bioethanol production, where only small fractions of the cell (lipids or sugars) are used, methane might be produced using all three macromolecules. Additionally, biogas production through anaerobic digestion avoids energy intensive steps such as biomass drying and extraction. Photosynthetic microorganisms could potentially be integrated in a wastewater treatment plant and combine the benefits of nutrient removal, energy production, and CO<sub>2</sub> sequestration. Nevertheless, the methane production potential of the different photosynthetic microorganisms that could conduct this dual purpose (bioremediation and energy production) should be further investigated.

Microalgae cell wall and biochemical composition affects markedly their anaerobic digestion potential [1,2]. More specifically, microalgae cells are protected by a semi-rigid structure that hinders the hydrolysis of organic matter [3]. In order to increase the efficiency of the digestion process, microalgae cell walls should be disrupted prior anaerobic digestion. These pretreatment methods to enhance methane production are increasing the cost of production and thus compromising the feasibility of this technology [3,4]. Cyanobacteria may play a crucial role to circumvent this major drawback of microalgae. The resemblance is that these microorganisms are also photosynthetic but their cell walls characteristics are different. Cyanobacteria present a cell envelope typical of gram-negative bacteria peptidoglycan outer-membrane [5]. The lack of cellulose and other complex polymers renders cyanobacteria biomass as an ideal substrate for anaerobic digestion. Up to now, cyanobacteria has not been extensively studied for biogas production. As a matter of fact, studies dealing with that topic mainly focused on *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Microcystis* spp. [6,7]. In those studies, methane production ranged 0.2 and 0.36 L g VS<sup>-1</sup> for *Microcystis* and *Arthrospira maxima* when operated at 30 days hydraulic retention time of digestion, respectively.

It is commonly found in literature that cyanobacteria growth rate is much lower than that of many algal species [8,9]. Nevertheless, Lüring et al. [10] demonstrated that at optimum temperature of 29 °C, mean growth rates were similar for

cyanobacteria ( $0.92 \text{ day}^{-1}$ ) and chlorophytes ( $0.96 \text{ day}^{-1}$ ), while when those photosynthetic microorganisms were cultivated at lower temperatures, the growth rates of cyanobacteria is 30% of that of microalgae. Opposite, under low light intensities, cyanobacteria growth rate is higher than that of microalgae [11]. For both types of photosynthetic microorganisms, it seems likely that growth rate is size-dependent when grown as unicells, while this does not stand when colonies are formed [12]. Cyanobacteria are unicellular and usually aggregate in colonies and therefore, this may explain the lower growth rates observed. However, their slow growth rates are compensated by the high prevalence of populations once they have been established [13].

The goal of the current study was to explore the biomethane production potential of different cyanobacteria strains (*Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena planctonica*, *Borzia trilocularis* and *Synechocystis* sp.). Additionally, those cyanobacteria were compared to a common and robust microalgae strain (*Chlorella vulgaris*) in terms of biomass productivity, biochemical characterization and methane production.

## 2. Material and methods

### 2.1. Photosynthetic microorganisms and culturing conditions

Biological substrates used as substrates for anaerobic digestion included four cyanobacteria and a microalgae strain. *A. ovalisporum*, *A. planctonica* were kindly provided by Autónoma University of Madrid (Spain) while *B. trilocularis* and *Synechocystis* sp. were kindly supplied by Georg-August-Universität Göttingen (Germany). The cultures were prepared by inoculating in a 0.5 L erlenmeyer flask all the biomasses at  $0.4 \text{ g VSS (volatile suspended solids) L}^{-1}$ . *C. vulgaris* was collected in the wastewater treatment plant of Valladolid (Spain) and cultivated in Modified Basal medium [3]. On the other hand, cyanobacteria strains were grown in BG 11. Culture broth was maintained at  $25 \text{ °C}$  under continuous agitation supplied by air bubbling and continuous illumination  $2,460 \text{ lux}$ . Microorganisms were periodically collected and analysed for growth determination (VSS). All these biomasses were cultured in duplicates for a period of 13-15 days. The specific growth rate was determined by a first order dynamic Eq. (1):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

where  $X$  is the concentration of biomass ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at time  $t(d)$ , and  $\mu$  is the specific growth rate ( $\text{day}^{-1}$ ). The specific growth rates can be calculated using the following equation:

$$\mu = \frac{\left[ \text{Ln}\left(\frac{X_t}{X_o}\right) \right]}{t-t_o} \quad (2)$$

where  $X_o$  is the concentration of biomass ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at initial time ( $t_o$ ) and  $X_t$  is the concentration of biomass at specific time ( $t$ ).

The volumetric productivity rate ( $Q$ ,  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) was estimated using the following equation:

$$Q = \frac{X_t - X_o}{t - t_o} \quad (3)$$

## 2.2. Biomethane potential assays

Anaerobic sludge employed was collected at the wastewater treatment plant of Valladolid (Spain). Anaerobic biomass presented total solids (TS) concentration of  $17.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and volatile solids (VS)/TS of around 60%. Anaerobic digestion was conducted in batch mode for approximately one month. Fermenters were glass bottles with 0.120 L capacity incubated at  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  and agitated at 120 rpm. To keep anaerobic conditions, oxygen was removed from digesters purging the headspace with helium, and closed with butyl rubber seals and aluminum caps. Calculations were set to achieve a final volume of 0.070 L of liquid fraction for each bottle, and thus allowing 42% of the total volume for biogas production. Anaerobic sludge was mixed with the tested biomasses in order to obtain COD/VS ratio of  $0.5 \text{ (g}\cdot\text{g}^{-1})$  [14]. Photosynthetic microorganisms were concentrated previous anaerobic digestion by centrifugation. Digesters were run in

duplicates and inoculated with microalgae and cyanobacteria biomasses. The volume of biogas produced by the substrates was calculated by measuring the pressure of the bottle's headspace. In addition, bottles containing only anaerobic sludge were run as blanks for quantification of endogenous methane production, and controls using ethanol as substrate to check the correct performance of the anaerobic microorganisms.

### 2.3. Analytical methods

Total solids (TS), volatile solids (VS), total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS) and total Kjeldahl nitrogen (TKN) were measured according to Standard Methods [15]. Proteins were calculated by multiplying TKN results by 5.95 [16]. The carbohydrates content was analyzed by phenol-sulphuric acid method [17]. COD was analyzed by a colorimetric method using Hach vials. To obtain soluble fractions, the samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min (Eppendorf 5424). Biogas composition was measured by gas chromatography (Agilent 7820A) equipped with HP-PLOT Q column and thermal conductivity detector.

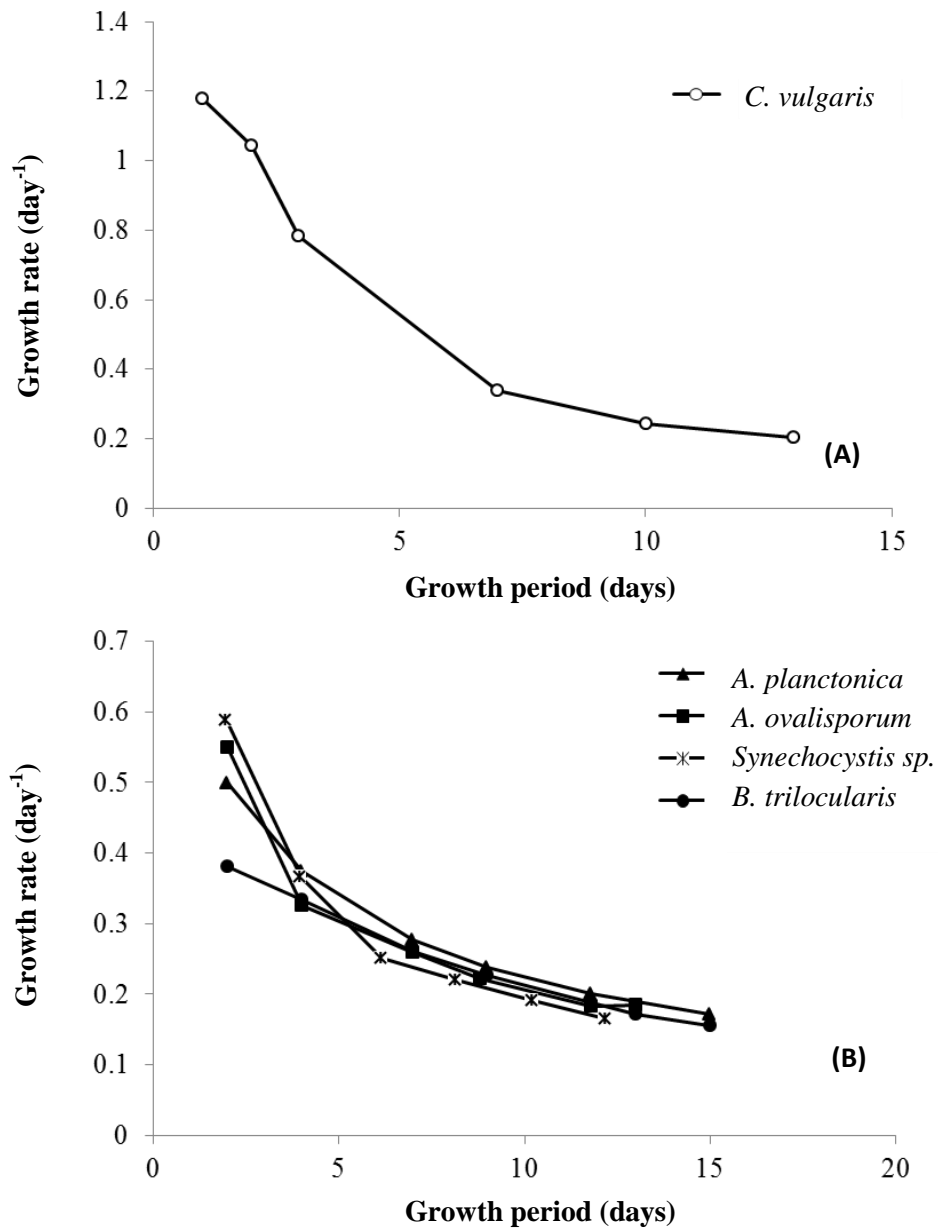
## 3. Results and discussion

### 3.1. Growth rate and productivity

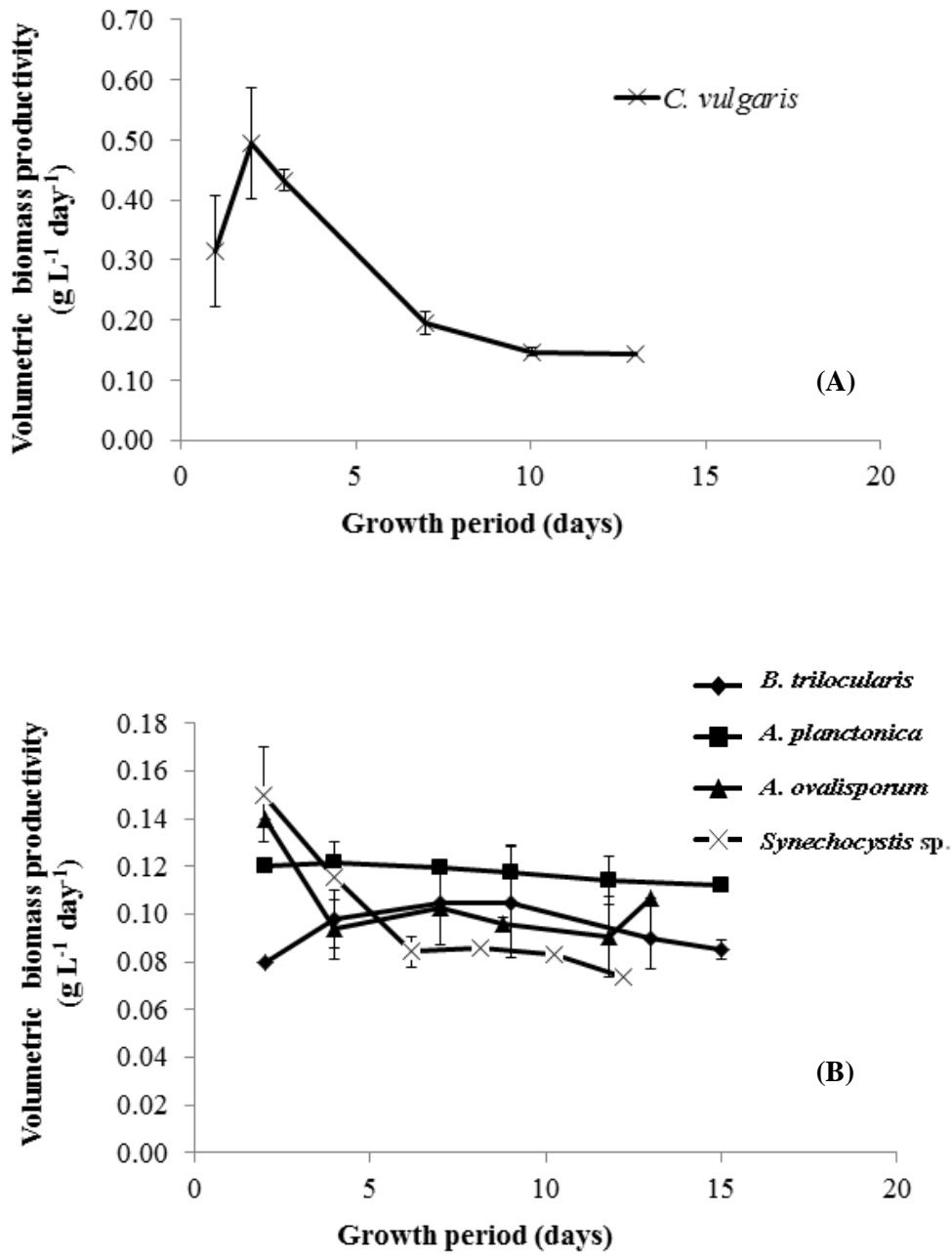
Since different nutrition modes, light-dark cycles, temperature and other parameters may affect markedly the results obtained in the different studies found in literature, the present investigation was designed to provide a fair comparison between cyanobacteria and microalgae. The microalgae strain, *C. vulgaris*, was selected in accordance to its predominance in wastewaters. Even though maximum growth rate would entail optimum growing conditions, this study was designed for comparison purposes between cyanobacteria and microalgae. In this context, from now on when referring to maximum growth rate, this parameter refers to the cultivation conditions used for comparison. As it can be seen in Fig.1, cyanobacteria growth rates were quite lower than microalgae. As a matter of fact, the maximum growth rate ranged 0.5–0.6 day<sup>-1</sup> for *A. planctonica*, *A. ovalisporum* and *Synechocystis* sp. while even lower results (0.4 day<sup>-1</sup>) were recorded for *B. trilocularis*. These values are in good agreement with Lürling et al. [10] who also reported an average growth rate of 0.6 day<sup>-1</sup> for several cyanobacteria grown at 25 °C. With regard to the microalgae strain, the maximum growth rate achieved during the first days of cultivation of *C. vulgaris* was double than

the observed for cyanobacteria. In this context, *C. vulgaris* exhibited a maximum growth rate of  $1.2 \text{ day}^{-1}$ . While the growth rates shown by this strain when grown in wastewater is slightly lower, the values can be raised up to  $1.6 \text{ day}^{-1}$  when grown in mineral medium [18].

Similar tendency was attained for the volumetric productivities ( $Q_v$ ). *C. vulgaris* exhibited an exponential growth since inoculation. In this manner, after 2 days of cultivation, the highest volumetric biomass productivity was  $0.5 \text{ g DW} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  and decreased onwards until day 10th, after which the  $Q_v$  remained constant (Fig. 2A). Opposite to *C. vulgaris* that grew exponentially right after inoculation, cyanobacteria concomitantly increased biomass production along with cultivation time and therefore  $Q_v$  remained constant along the cultivation time. This trend was observed for *A. planctonica* ( $0.12 \text{ g DW} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and *B. trilocularis* and *A. ovalisporum* ( $0.1 \text{ g DW} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , Fig. 2B). Opposite to the other cyanobacteria, *Synechocystis* sp. displayed an exponential growth during the first days of cultivation and then remained constant after 6 days of cultivation. No comparison can be made with literature dealing with this parameter since different reactor configuration and operational conditions reported different results. In this manner, Cea-Barcia et al. [19] reported an average  $Q_v$  of  $0.063\text{--}0.075 \text{ g DW} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  when different microalgae strains were grown in synthetic and secondary effluent medium using plastic bags as photobioreactors. Opposite, Tuantet et al. [20] obtained  $Q_v$  of  $9.3 \text{ g DW} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  employing a short light-path photobioreactor to grow *Chlorella sorokiniana*. As it can be observed, a fair comparison can only be made when applying the same conditions for photosynthetic microorganism's growth.



**Figure 15.** Growth rates recorded for all the photosynthetic microorganisms ((A) for microalgae strain and (B) for cyanobacteria strains) along cultivation time.



**Figure 16.** Volumetric biomass productivities recorded for all the photosynthetic microorganisms ((A) microalgae strain and (B) cyanobacteria strains) along cultivation time.

3.2. Biomass chemical characterization and theoretical methane production

Since methane production is dependent on the macromolecular profile of the substrate used, chemical characterization of the photosynthetic microorganisms was conducted (Table 1). VS content in TS accounted 90–95% for all the strains, and therefore the amount of inorganic matter was low. In the case of the microalgae strain, proteins were the prevailing biomass fraction (approximately 64%). This high protein content has been repeatedly reported [3,21]. Regarding the carbohydrates fraction, this macromolecule ranged 25% for *C. vulgaris*. Thus, it can be calculated that the lipid fraction was around 3% for *C. vulgaris*. Similar macromolecular profile was attained for *Synechocystis* sp. and *B. trilocularis*. Those cyanobacteria strains also presented a prevailing protein fraction ranging 64% and much lower carbohydrates content (26–30%). Opposite to that, protein content was much lower (38%) for *A. planctonica* and *A. ovalisporum*. In this manner, those cyanobacteria strains exhibited higher carbohydrate content (42–63%).

**Table 11.** Chemical characterisation of the photosynthetic microorganisms cultivated and subjected to anaerobic digestion. Results are shown as average  $\pm$  standard deviation.

	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. ovalisporum</i>	<i>Synechocystis</i> sp.	<i>A. planctonica</i>	<i>B. trilocularis</i>
<b>TS (g·L<sup>-1</sup>)</b>	75.7 $\pm$ 0.1	46.7 $\pm$ 1.2	59.2 $\pm$ 2.0	54.1 $\pm$ 7.7	57.7 $\pm$ 3.7
<b>VS (g·L<sup>-1</sup>)</b>	70.0 $\pm$ 0.2	43.2 $\pm$ 1.0	53.7 $\pm$ 1.8	50.4 $\pm$ 7.5	52.3 $\pm$ 3.4
<b>Total carbohydrates (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	255.2 $\pm$ 8.4	417.7 $\pm$ 10.9	260.1 $\pm$ 4.5	628.8 $\pm$ 15.9	301.2 $\pm$ 12.4
<b>Soluble carbohydrates (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	17.7 $\pm$ 3.5	113.5 $\pm$ 1.2	15.0 $\pm$ 0.1	49.0 $\pm$ 1.5	59.9 $\pm$ 1.0
<b>Total proteins (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	679.5 $\pm$ 56.4	377.8 $\pm$ 15.5	653.5 $\pm$ 32.7	379.8 $\pm$ 5.1	637.3 $\pm$ 87.5
<b>Soluble proteins (mg·g DW<sup>-1</sup>)</b>	57.3 $\pm$ 0.1	93.4 $\pm$ 0.1	17.0 $\pm$ 0.1	163.7 $\pm$ 0.1	218.3 $\pm$ 0.1

At this point, it is also worth to mention that soluble carbohydrates and proteins in the cultivation media were low for all the photosynthetic strains studied herein, exception made for *A. ovalisporum* and *B. trilocularis*. In those cases, the first strain evidenced a high amount of carbohydrates in solution (25% of the total carbohydrates) while the later one exhibited high proteins content in the soluble phase (one third of the total proteins measured). This can be attributed to the frequently mentioned ability of cyanobacteria to produce extracellular polymeric substances [22].

No comparison could be made with other studies since this type of biomass has not been extensively studied for biofuel production. As a matter of fact, only few studies dealt with cyanobacteria for bioethanol [23,24] and biogas production [22,25]. In this manner, an in-depth chemical characterization was lacking in literature. Nevertheless, biogas production is dependent on the macromolecular distribution of the substrate employed and therefore the chemical characterization is of high importance. Specific methane yields calculated for carbohydrates, lipids and protein resulted in 0.415, 0.496 and 1.014 L CH<sub>4</sub> ·g VS in<sup>-1</sup> [26]. Taking into account those specific methane yields and the macromolecular distribution of the studied biomasses, the theoretical methane yield was calculated (Table 3). All the photosynthetic microorganisms would be able to reach theoretically around 0.500 L CH<sub>4</sub> ·g VS in<sup>-1</sup>. In the microalgae strains context, more specifically *Chlorophyta* such as *Chlorella* sp., those theoretical biogas yields provide overestimated values. Around 50% overestimation was calculated when comparing theoretical and experimental biomethane yields [1]. This mismatch between the values has been attributed to the hard and complex cell wall that *Chlorophyta* exhibit. In this manner, cyanobacteria biomass can be an alternative biomass with similar characteristics as microalgae but with a weaker cell wall. In spite of the carbohydrate based cell envelope of microalgae, the cyanobacterial cell wall contains a peptidoglycan layer that more closely resembles that of Gram-negative bacteria and hence more easily digested [27]. Once again, this would be just a hypothesis that could be withdrawn according to the theoretical background available, but this fact still remains to be confirmed.

**Table 12.** Methane yield and growth rate summary for the photosynthetic microorganisms studied

	<b>Methane production (mL CH<sub>4</sub> ·g COD in<sup>-1</sup>)</b>	<b>Methane in biogas (% CH<sub>4</sub>)</b>	<b>Anaerobic Biodegradability<sup>a</sup> (%)</b>
<b><i>A. ovalisporum</i></b>	223.1±6.3	74.2	63.8
<b><i>Synechocystis</i> sp.</b>	220.4±25.1	75.4	63.0
<b><i>A. planctonica</i></b>	187.6±20.3	74.1	53.6
<b><i>B. trilocularis</i></b>	168.3±16.2	75.9	48.1
<b><i>C. vulgaris</i></b>	125.6±4.6	75.8	35.9

<sup>a</sup> Considering that 100% biodegradability corresponds to 350 mL CH<sub>4</sub> per g COD

### 3.3. Biomethane potential assays of the different photosynthetic microorganisms

In order to confirm whether or not, cyanobacteria strains are easier digested than microalgae, biomethane batch assays were conducted. The microalgae strain evidenced a slow and low methane production (Fig. 3A). After 22 days of digestion, methane yield averaged 120 mL CH<sub>4</sub> ·g COD in<sup>-1</sup> for *C. vulgaris*, which corresponded to an anaerobic biodegradability of 36% (Table 2). This value is quiet similar to the anaerobic biodegradabilities reported in literature for this strain [3,28]. As it can be observed in Fig. 3A, methane productivity was constant along digestion time. Approximately 1.5 mL CH<sub>4</sub> day<sup>-1</sup> was produced by the microalgae, which clearly showed a low hydrolysis rate. This limited hydrolysis is due to the complex polymeric cell wall of microalgae [1,4,21]. Opposite, this value was increased to 2.3 mL CH<sub>4</sub> day<sup>-1</sup> when cyanobacteria were digested. As it can be observed in Fig. 3B, cyanobacteria exhibited fast methane productivity. In the case of *B. trilocularis* and *A. planctonica*, methane production remained constant after 12 days of digestion, reaching a maximum of 168 and 187 mL CH<sub>4</sub> COD in<sup>-1</sup>, respectively. Those two cyanobacteria strains supported 50% anaerobic biodegradability. Those values were increased up to 64% for *A. ovalisporum* and *Synechocystis* sp., corresponding to methane production of 223 and 220 mL CH<sub>4</sub> ·g COD in<sup>-1</sup> (Table 2). These data showed that some cyanobacteria can double the methane production of that of common microalgae strains. The

methane productivities achieved for the cyanobacteria also proved that cell walls were easier to digest by the anaerobic microorganisms than that of microalgae.

**Table 13.** Anaerobic digestion parameters of the photosynthetic microorganisms cultivated and subjected to anaerobic digestion.

	<b>C. vulgaris</b>	<b>A. ovalisporum</b>	<b>Synechocystis sp.</b>	<b>A. planctonica</b>	<b>B. trilocularis</b>
<b>mL CH<sub>4</sub> ·g VS<sup>-1</sup> <sup>a</sup></b>	479	532	476	482	489
<b>mL CH<sub>4</sub> ·g VS<sup>-1</sup> <sup>b</sup></b>	240.3	287.7	380.0	284.2	255.0
<b>VS/VSS</b>	0.92	1.38	1.04	1.23	1.25
<b>mL CH<sub>4</sub> ·g VSS<sup>-1</sup></b>	219.9	395.8	397.0	349.3	319.1
<b>g VSS ·L<sup>-1</sup></b>	1.99	1.53	1.04	1.5	1.3
<b>mL CH<sub>4</sub> ·L<sup>-1</sup> cultivation<sup>-1</sup></b>	437.6	605.6	412.9	518.7	414.8

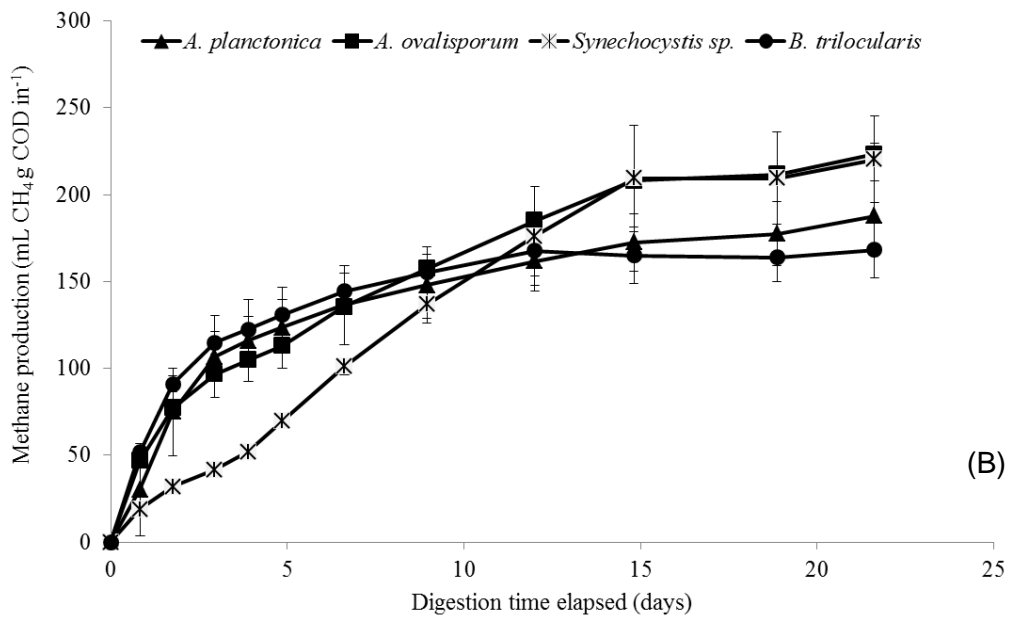
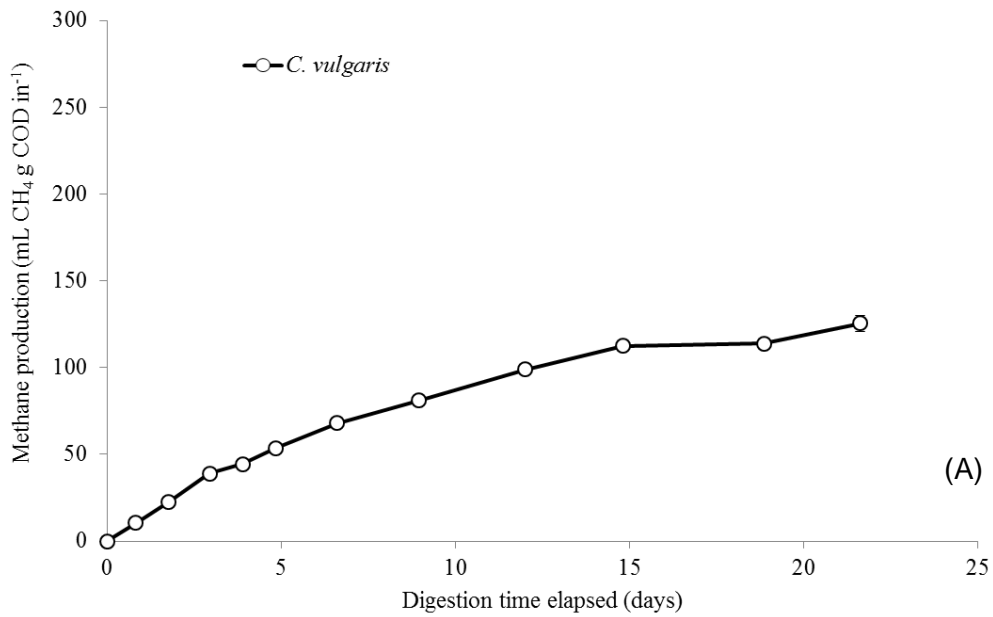
<sup>a</sup> Theoretically calculated values

<sup>b</sup> Experimentally obtained values

Even though a big research effort has been devoted to microalgae biomass as a substrate for biogas production, the information available on cyanobacteria in this topic is scarce. Some studies have been done in the 90 s using *Arthrospira maxima* as a substrate [6]. Their results showed methane yield of 0.26 L CH<sub>4</sub> ·g VS<sup>-1</sup> when working at organic loading rates of 0.97 g VS ·L<sup>-1</sup> ·d<sup>-1</sup> and hydraulic retention times of 33 days. Slightly lower values have been reported for the anaerobic digestion of a mixture of algae bloom consisting on *Microcystis*, *Cyclotella*, *Cryptomonas* and *Scenedesmus* [25]. Interestingly, those authors also observed an enhanced methane production (0.29 L CH<sub>4</sub> ·g VS<sup>-1</sup>) after 15 days of storage due to the release of microcystins which favoured cell wall hydrolysis.

When comparing the theoretically calculated and experimentally obtained methane yield values, it could be concluded that there was still room for improvement for cyanobacteria as substrates. In this context, 80% of the methane yield calculated for *Synechocystis* sp. was reached experimentally, while for the other three cyanobacteria this figure decreased to 60%. However, these values were comparably

higher than the differences obtained between the experimental and theoretical methane yield of microalgae strain (50%).



**Figure 17.** Cumulative methane yield achieved by for all the photosynthetic microorganisms studied ((A) microalgae strain and (B) cyanobacteria strains).

### 3.4. Overcoming low growth rates by increased anaerobic digestibility

In the present study it was observed that cyanobacteria presented lower growth rate than microalgae strains. However, anaerobic digestibility was higher for cyanobacteria than for microalgae. Taking into account that the VSS can be used as a key indicator of the microorganisms' growth and the methane yields attained for each biomass, the methane production per litre of cultivation broth can be calculated (Table 3). Values considered for this calculation were obtained after 13 days of photosynthetic microorganism's growth and 20 days of anaerobic digestion. The overall balances showed that some cyanobacteria, i.e. *A. ovalisporum* and *A. planctonica*, evidenced higher values (520–600 mL CH<sub>4</sub> L cultivation<sup>-1</sup>) than the microalgae strain studied (483 mL CH<sub>4</sub> L cultivation<sup>-1</sup>). It can be thus concluded that the lower growth rates of cyanobacteria can be counterbalanced by the easiness with which they are degraded. At this point, it should be stressed out that the optimal conditions for cyanobacteria's growth were not established in this study. For instance, experimental temperature set for this study was closer to optimal temperature for microalgae growth, while slightly higher temperature may improve cyanobacteria growth rate [10]. As previously mentioned, temperature and light intensity conditions can be further optimized to attain higher cyanobacteria biomass productivity, which would lead in even better results for those later microorganisms.

Ideally, biogas production from photosynthetic microorganisms would be produced in the context of a wastewater treatment plant. Coupling wastewater treatment and energy production by means of microalgae biomass would decrease biomass production cost [29]. Sturm and Lamer, [30] achieved a positive net energy ratio when evaluation microalgae biomass production coupled with nutrient removal from open ponds fed with wastewater. In the case of microalgae, their efficiency for nutrient removal has been proved [31,32] but no data is available yet for cyanobacteria. In this manner, it still remains to be confirmed the efficiency of this photosynthetic biomass to remove ammonium and phosphate from wastewater under optimal conditions to further ratify the potential of cyanobacteria for bioenergy purposes.

## 4. Conclusion

Cyanobacteria strains (*B. trilocularis*, *A. planctonica*, *A. ovalisporum* and *Synechocystis* sp.) exhibited low growth rate ( $0.6 \text{ day}^{-1}$ ) while this value was doubled in the case of *C. vulgaris*. Opposite to most microalgae strains, the anaerobic biodegradability of cyanobacteria biomass presented promising results without the need of any pretreatment before digestion. Anaerobic biodegradability of cyanobacteria resulted in 50% for *B. trilocularis* and *A. planctonica*, and 64% for *A. ovalisporum* and *Synechocystis* sp. In the case of the microalgae strain (*C. vulgaris*), the anaerobic biodegradability averaged 34%. This microalgae strain presents a hard cell wall that needs to be disrupted for an efficient biogas production.

When combining the growth rate data and the methane production yields of the different biomasses, overall balances showed that the cyanobacteria *A. ovalisporum* and *A. planctonica* were particularly good substrates for anaerobic digestion. In this context, the low growth rate of some cyanobacteria can be overcome by its anaerobic digestibility. However, further research it is necessary in order to elucidate totally the potential of this biomass.

## Acknowledgements

Authors want to thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for financial support to this project (WW-ALGAS, ENE2013-45416-R). Additionally, the authors would like to extend their gratitude to Dr. Antonio Quesada (Universidad Autónoma de Madrid, Spain) and Georg-August-Universität Göttingen (Germany) for providing the cyanobacteria strains and to the Wastewater Treatment Plant of Valladolid (Spain) for kindly supply the anaerobic sludge.

## References

- [1] González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2012;6:205–18.
- [2] González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenerg* 2012;40:105–11.

- [3] Mendez L, Mahdy A, Timmers RA, Ballesteros M, González-Fernández C. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour Technol* 2013;149:136–41.
- [4] Passos F, Solé M, García J, Ferrer I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Appl Energy* 2013;108:168–75.
- [5] Palinska KA, Krumbein WE. Perforation patterns in the peptidoglycan wall of filamentous cyanobacteria. *J Phycol* 2000;36:139–45.
- [6] Samson R, Leduy A. Biogas production from anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnol Bioeng* 1982;24:1919–24.
- [7] Zhong W, Zhang Z, Luo Y, Qiao W, Xiao M, Zhang M. Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source. *Bioresour Technol* 2012;114:281–6.
- [8] Senerpont Domis LN, Mooij WM, Huisman J. Climate-induced shifts in an experimental phytoplankton community: a mechanistic approach. *Hydrobiologia* 2007;584:403–13.
- [9] Markou G, Georgakakis D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl Energy* 2011;88:3389–401.
- [10] Lürling M, Eshetu F, Faassen EJ, Kosten S, Huszar VLM. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshw Biol* 2013;58:552–9.
- [11] Van Liere L, Luuc R M. Some experiments on the competition between a green alga and a cyanobacterium. University of Amsterdam, 1979.
- [12] Nielsen SL. Size-dependent growth rates in eukaryotic and prokaryotic algae exemplified by green algae and cyanobacteria: comparisons between unicells and colonial growth forms. *J Plankton Res* 2006;28:489–98.
- [13] Luuc R M, M. Skulberg O, Utkilen H. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic cyanobacteria water A Guid. to their public Heal. consequences*, Monit. Manag., London and New York: E & FN Spon; 1999.
- [14] González-Fernández C, García-Encina PA. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass Bioenerg* 2009;33:1065–9.
- [15] Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation; 2005.

- [16] González López CV, Cerón García M del C, Ación Fernández FG, Segovia Bustos C, Chisti Y, Fernández Sevilla JM. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour Technol* 2010;101:7587–91.
- [17] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 1956;28:350–6.
- [18] Bouterfas R, Belkoura M, Dauta A. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. *Hydrobiologia* 2002;489:207–17.
- [19] Cea-Barcia G, Buitrón G, Moreno G, Kumar G. A cost-effective strategy for the bio-prospecting of mixed microalgae with high carbohydrate content: Diversity fluctuations in different growth media. *Bioresour Technol* 2014;163:370–3.
- [20] Tuantet K, Temmink H, Zeeman G, Janssen M, Wijffels RH, Buisman CJN. Nutrient removal and microalgal biomass production on urine in a short light-path photobioreactor. *Water Res* 2014;55:162–74.
- [21] Mahdy A, Mendez L, Ballesteros M, González-Fernández C. Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. *Energy Convers Manag* 2014;85:551–7.
- [22] Pereira S, Micheletti E, Zille A, Santos A, Moradas-Ferreira P, Tamagnini P, et al. Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiology* 2011;157:451–8.
- [23] Möllers KB, Cannella D, Jørgensen H, Frigaard N-U. Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation. *Biotechnol Biofuels* 2014;7:64.
- [24] Aikawa S, Joseph A, Yamada R, Izumi Y, Yamagishi T, Matsuda F, et al. Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. *Energy Environ Sci* 2013;6:1844.
- [25] Miao H, Lu M, Zhao M, Huang Z, Ren H, Yan Q, et al. Enhancement of Taihu blue algae anaerobic digestion efficiency by natural storage. *Bioresour Technol* 2013;149:359–66.
- [26] Angelidaki I, Sanders W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2004;3:117–29.
- [27] Hoiczky E, Hansel A. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J Bacteriol* 2000;182:1191–9.

[28] Mahdy A, Mendez L, Ballesteros M, González-Fernández C. Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. *Energy* 2014;78:48–52.

[29] Olguín EJ. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnol Adv* 2012;30:1031–46.

[30] Sturm BSM, Lamer SL. An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production. *Appl Energy* 2011;88:3499–506.

[31] Molinuevo-Salces B, García-González MC, González-Fernández C. Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. *Bioresour Technol* 2010;101:5144–9.

[32] Uggetti E, Sialve B, Latrille E, Steyer JP. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: the role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresour Technol* 2014;152:437–43.



# **Artículo 7**

## **Comparison of *Chlorella vulgaris* and cyanobacterial biomass: cultivation in urban wastewater and methane production**

Lara Mendez<sup>1</sup>, Bruno Sialve<sup>2</sup>, Elia Tomas-Pejo <sup>1</sup>, Mercedes Ballesteros<sup>1,3</sup>, Jean Philippe Steyer<sup>2</sup>, Cristina Gonzalez-Fernandez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IMDEA Energy, Avda. Ramón de la Sagra 3, 28935 Móstoles, Madrid, Spain

<sup>2</sup>INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France

<sup>3</sup> CIEMAT, Avda. Complutense, 28040 Madrid, Spain

*Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (2016) 703-12

Doi: 10.1007/s00449-016-1551-7

Reproduced with permission from Springer

ABSTRACT

Anaerobic digestion of microalgae is hampered by its complex cell wall. Against this background, cyanobacteria cell walls render this biomass as an ideal substrate for overcoming this drawback. The aim of the present study was to compare the growth of two cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Anabaena planctonica*) and a microalga (*Chlorella vulgaris*) in urban wastewater when varying the temperature (22, 27 and 32 °C). Cyanobacterial optimal growth for both strains was attained at 22 °C, while *C. vulgaris* did not show remarkable differences among temperatures. For all the microorganisms, ammonium removal was higher than phosphate. Biomass collected was subjected to anaerobic digestion. Methane yield of *C. vulgaris* was 184.8 mL CH<sub>4</sub> ·g COD in<sup>-1</sup> while with *A. ovalisporum* and *A. planctonica* the methane production was 1.2- and 1.4-fold higher. This study showed that cyanobacteria growth rates could be comparable to microalgae while presenting the additional benefit of an increased anaerobic digestibility.

Keywords: Biogas; *Chlorella vulgaris*; Cyanobacteria; Nutrients removal; Wastewater

## 1. Introduction

Research and development of biofuels and energy production from renewable sources is currently in the spotlight due to the constant demand of fossil fuels and government policies of low carbon energy and waste recycling. In this scenario, the use of microalgae has been established as one of the main sources of interest to provide a viable alternative to conventional fuels.

Microalgal biomass encompasses advantageous features such as carbon dioxide consumption, production of oxygen through photosynthesis and inorganic compound uptake capability from wastewater [1]. Additionally, microalgae are a resource for the sustainable production of a wide variety of value added products for pharmaceutical, nutritional and medical applications [2]. Likewise, uptaken nutrients can form different macromolecules that can be further converted to biofuels (bioethanol, biodiesel or biogas).

Among biofuel production processes using microalgal biomass, biogas generation seems to exhibit lower environmental impacts and be the least complex considering that it does not require the extraction of specific components of the biomass; such is the case of carbohydrates or lipids for bioethanol and biodiesel production. However, microalgae cell walls and their biochemical composition markedly affect their anaerobic digestion potential. Most of *Chlorophyceae* are protected by a semi-rigid structure that hinders the hydrolysis of organic matter [3]. In order to increase the anaerobic digestion efficiency, microalgae cell walls should be disrupted to render organic matter available for conversion into biogas. However, these pretreatment methods increase the cost of the production process [4, 5]. Cyanobacteria cell walls are different and this may play a crucial role. Indeed, the lack of complex polymers or even the absence of cell walls of some strains [6] makes cyanobacteria biomass an ideal substrate for anaerobic digestion.

Microalgae and cyanobacteria are photosynthetic microorganisms and their biomass production implies the uptake of essential nutrients such as C, N, P, etc. During their cultivation large amounts of nutrients are consumed, raising questions about the sustainability of such biomass production [7]. These microorganisms have been proven to efficiently remove nutrients from a wide variety of wastewater effluents

[8, 9]. In this context, an alternative to external nutrient addition is the use of industrial or urban wastewater [10]. Hence, microalgae and cyanobacteria could not only provide a suitable feedstock for biofuel production but also contribute to wastewater bioremediation. With regard to energy production, cyanobacteria have evidenced better results in biogas production than *Chlorella vulgaris* [11]. Nevertheless, in order to further confirm the benefits of cyanobacteria, their ability to grow in wastewater still needs to be compared with microalgae. Previous studies have reported that cyanobacteria's growth is slower and less productive than that of microalgae [12]. Furthermore, according to Jöhnk et al. [13], cyanobacteria require higher temperature during cultivation than microalgae. In this context, the goal of the current study was to compare the growth of *C. vulgaris* (microalgae) and *Aphanizomenon ovalisporum* and *Anabaena planctonica* (cyanobacteria) in urban wastewater at different temperatures (22, 27 and 32 °C) and culture modes (batch and semi-continuous). During this cultivation, biomass production and nutrient removal were assessed. Macromolecular profile (carbohydrates, proteins and lipids) of the harvested biomass was conducted prior to anaerobic digestion. Finally, the methane yield of this harvested biomass was assessed for comparison purposes.

## 2. Material and methods

### 2.1. Pre-inoculum growth and culture conditions

Two cyanobacteria, namely *Aphanizomenon ovalisporum* and *Anabaena planctonica*, kindly provided by Autónoma University of Madrid (Spain), and a microalga strain, namely *Chlorella vulgaris*, which was collected in the urban wastewater treatment plant of Valladolid (Spain), were used as photosynthetic microorganisms. *C. vulgaris* was selected as model microalgae due to its robustness and common presence in wastewater [14] while the two cyanobacteria were chosen in accordance to their high methane yield potential [11]. Pre-inoculum growth was conducted in Modified Bold Basal medium in the case of the microalga strain [4] and BG 11 (pH 8.5) for cyanobacteria microorganisms.

Wastewater was collected from urban wastewater treatment plant located in Narbonne (France) and used as culture medium for the growth of the photosynthetic microorganisms. Wastewater chemical characterisation evidenced ammonium concentration of  $90.3 \pm 20.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and phosphate concentration of  $14.7 \pm 3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Wastewater was inoculated at  $0.2 \text{ g VSS} \cdot \text{L}^{-1}$  of cell biomass. Culture broth was maintained under agitation supplied by air bubbling. Experiments carried out for evaluating the effect of temperature on microorganism's growth were conducted in duplicates (batch mode). Batch cultures were carried out in 0.5 L Erlenmeyer flasks in a water bath at different temperatures, namely 22, 27 and 32 °C. These cultures were grown for a period of 10-11 days for comparison purposes with previous studies dealing with the same biomass in synthetic media [11]. Continuous illumination was set at 6000 lux.

For semi-continuous mode, 0.5 L of culture media was used in 1 L photobioreactors. Semi-continuous and batch mode culture were run under the same set up conditions. Photobioreactors were fed on a daily basis, i.e. the same volume of media was withdrawn and fed using plastic syringes. Based on the results obtained during batch cultivation, temperature and hydraulic retention time (HRT) were selected for the operation of the semi-continuously fed photobioreactors. Temperature was kept at 22 °C using a water jacket connected to a water bath and continuous illumination at 6000 lux. Two reactors for each photosynthetic microorganism were run in parallel. HRT of 3 days was stabilised based on nutrient consumption results reached on batch mode. For each of the photobioreactor evaluated, the steady-state condition was considered to be three times the HRT.

Samples were regularly collected and cell growth [volatile suspended solids (VSS)], pH variation and nutrients availability (chemical oxygen demand (COD),  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) were determined periodically as explained in the following section on analytical methods. Carbohydrate and protein contents were determined from the biomass collected at the end of the culture period. The specific growth rate was determined by a first order dynamic Eq. (1):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

where  $X$  is the concentration of biomass ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) at time  $t$  (days), and  $\mu$  is the specific growth rate ( $\text{day}^{-1}$ ). The specific growth rates can be calculated using the following equation:

$$\mu = \frac{\left[ \ln\left(\frac{X_t}{X_o}\right) \right]}{t-t_o} \quad (2)$$

where  $X_o$  is the concentration of biomass ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at initial time ( $t_o$ ) and  $X_t$  is the concentration of biomass at specific time ( $t$ ).

## 2.2. Methane production

The biomethane potential assays were conducted with the photosynthetic biomass collected from semi-continuous mode reactors at the end of the culture period. Anaerobic sludge employed was collected at the wastewater treatment plant of Valladolid (Spain). Anaerobic biomass presented total solids (TS) concentration of  $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and volatile solids (VS/TS) of around 69 %. Anaerobic digestion of the microalga and cyanobacteria was conducted in batch mode for approximately 1 month in glass bottles with 0.120 L capacity at  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  and at 120 rpm. Digesters were run in duplicates. To keep anaerobic conditions, oxygen was removed from digesters purging the headspace with helium, and closing them with butyl rubber seals and aluminum caps. For each bottle, a final volume of liquid fraction of 0.070 L was set, allowing 42% of the total volume for biogas production. Before inoculating the digesters, photosynthetic microorganisms were collected by centrifugation (5000 rpm, 15 min). Anaerobic sludge was mixed with the photosynthetic biomass in order to obtain COD/VS ratio of 0.5 ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). To provide enough buffer capacity,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of  $\text{CaCO}_3$  was added to the mixture and pH was adjusted at 7-7.5 prior to anaerobic digestion. Bottles containing only anaerobic sludge were run as blanks for quantification of endogenous methane production. The volume of biogas produced was calculated by measuring the pressure of the bottle's headspace. The net methane production at standard temperature and pressure was calculated by subtracting the blank methane production from the amount of methane measured in each sample. In order to evaluate the correct activity of the anaerobic sludge, controls were run using a readily biodegradable substrate such as ethanol.

### 2.3. Analytical

Total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS) and total Kjeldahl nitrogen (TKN) were measured according to Standard Methods [15]. Proteins were calculated by multiplying TKN results by the correction factor 5.95 used for microalgal biomass [16]. Carbohydrates content was analysed by phenol–sulphuric acid method [17]. COD was analysed by a colorimetric method using Hach vials.  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  content were measured in the soluble phase by ion chromatograph (ICS 3000, Dionex) equipped with pre-columns and separation columns CG 16 and CS16 (3 mm  $\varnothing$ ) for cations and AG15 and AS15 (2 mm  $\varnothing$ ) for anions, respectively. The eluents used for this analysis were methanesulphonic acid (MSA) 25 mM at 0.35 mL  $\text{min}^{-1}$  for cations and KOH 10 mM at 0.3 mL  $\text{min}^{-1}$  for anions at initial time and MSA 40 mM at 24 min and KOH 74 mM at 28 min. The column temperature was set at 35 °C.

To obtain the soluble fractions, the samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min (Eppendorf 5424). Biogas composition was measured by gas chromatography (Agilent 7820A) equipped with 19095P-Q04 30 m column (HP-PLOT Q) connected to a flame ionization detector and thermal conductivity detector at 250 °C and  $\text{H}_2$  at 4.5 mL  $\text{min}^{-1}$  as carrier gas.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Batch mode

#### 3.1.1. Biomass growth

Figure 1 shows the different growth profiles attained for the studied microorganisms at different temperatures (22, 27, and 32 °C). In the case of *C. vulgaris*, no remarkable differences were observed among the three employed temperatures (maximum growth of  $1.28 \pm 0.2$  g VSS  $\cdot \text{L}^{-1}$ ). The highest specific growth rate ranged between 0.25 and 0.32  $\text{day}^{-1}$ . These values were lower than growth rates obtained in previous studies. For instance, Mendez et al. [11] reported 1.2  $\text{day}^{-1}$  specific growth rate when growing *C. vulgaris*. Noteworthy, this value was obtained using the MBBM synthetic media while in the present work, *C. vulgaris* growth took place in raw urban wastewater. The low nutrients availability in the wastewater could have mediated the slightly lower growth rate determined in this medium. Literature related to *C. vulgaris* biomass yield is quite broad and highly dependent on the cultivation conditions. For instance, Ji et al. [18] reported maximum specific growth rate

of  $1.37 \text{ day}^{-1}$  using tertiary wastewater supplied with 15 %  $\text{CO}_2$ . At this point, it is worth to mention that in the present study, the nutrient source for photosynthetic microorganism's cultivation was only wastewater without any extra-nutrient supplementation.

On the other hand, cyanobacterial growth exhibited different patterns upon the tested temperatures. Both, *A. ovalisporum* and *A. planctonica*, reached maximum VSS values of  $1.65 \pm 0.2$  and  $1.70 \pm 0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively, after 11 days of cultivation at 22 °C. Similar growth was obtained at 27 °C with *A. ovalisporum*, while when temperature was raised up to 32 °C the growth diminished. *A. planctonica* showed the same trend, decreasing growth yield when cultivated at high temperatures. The maximum specific growth rates for *A. ovalisporum* were  $0.43$  and  $0.53 \text{ day}^{-1}$  at 22 and 27 °C, respectively, and decreased to  $0.30 \text{ day}^{-1}$  at 32 °C. In the case of *A. planctonica*,  $0.38 \text{ day}^{-1}$  was attained at 22 and 27 °C, while  $0.47 \text{ day}^{-1}$  was obtained at 32 °C. In the last case, higher growth rate did not correspond with higher growth since growth rate decreased dramatically in the following days of culture unlike the other temperatures. These values were slightly lower than reported in other studies. For instance, Mendez et al. [11] calculated  $0.5 \text{ day}^{-1}$  growth rate when cyanobacterial biomass was grown at 25 °C and Lüring et al. [19] determined mean growth rates of  $0.93 \text{ day}^{-1}$  for *Anabaena* sp. and  $0.87 \text{ day}^{-1}$  for *Aphanizomenon gracile* at 25 and 32.5 °C, respectively. Again it is worth to mention that these values were attained on synthetic media, while the media used in the present study implied nutrient limitation which can markedly affect photosynthetic activities and growth rates. It has been previously reported that warm temperatures favour the growth of cyanobacteria rather than green algae species [13]. However, this statement did not agree with the observed results, with higher biomass concentrations being reached by cyanobacteria at the lowest temperature (22 °C, Fig. 1b, c). At this point, it should be stressed that phytoplankton populations (green algae, diatoms and cyanobacteria) are not only temperature dependent, but also some other parameters may influence growth yield and rate. Lüring et al. [19] compared the growth rate of various chlorophytes and some cyanobacteria at different temperatures and concluded that optimum temperatures and growth rates for both groups were similar in the synthetic media. As a matter of fact, those authors stated that the prevailing population of cyanobacterial biomass from that of green microalgae at warm temperatures was not due to higher growth rates, but mostly related to better resistance to grazing, sedimentation, etc.

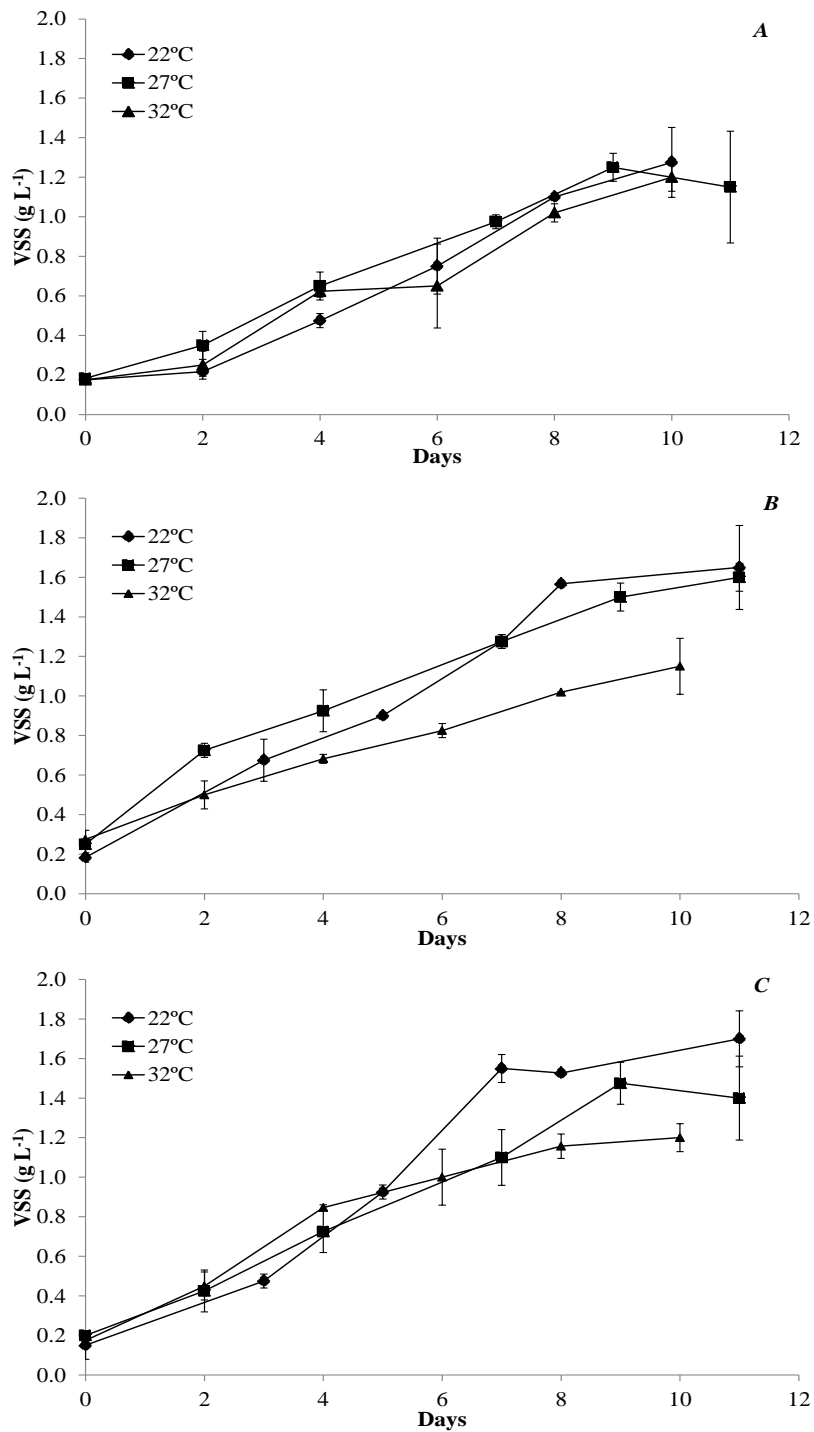
### 3.1.2. Nutrient removal

To evaluate the effect of the microorganism's growth and pH variations during cultivation on soluble nutrient removal, ammonium and phosphate concentration in the culture broth were analysed for the different tested temperatures. Surprisingly, those compounds were not detected in all cases after 4 days of culture. Nevertheless, nitrogen uptake by photosynthetic microorganisms can be overestimated by means of ammonia stripping which is highly influenced by pH and temperature conditions. Ammonia loss was quantified theoretically according to Eq. (3) [20]:

$$\frac{[NH_3]}{[TNH_3]} = \left( 1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-\left(0.09018 + \frac{2729.92}{T(K)}\right)}} \right)^{-1} \quad (3)$$

The estimation of free ammonia was calculated over the culturing period taking into account changes in pH that ranged from 8.6 to 10.8. More specifically, 95 % of the ammonium was converted to ammonia and stripped out after 2 days of culture for *A. ovalisporum* and *A. planctonica* at 32 °C. When *A. ovalisporum* and *A. planctonica* were grown at 27 and 22 °C, the stripping values were slightly lower than at 32 °C (70 and 89 % for *A. planctonica* and 66 and 39 % for *A. ovalisporum*, at 22 and 27 °C, respectively). These stripping levels corresponded with the rapid decline of ammonium concentrations, reducing ammonium availability for microorganism's assimilation.

Different ammonium conversions into free ammonia were found as well when culturing *C. vulgaris*. After 2 days of cultivation, 24, 44 and 61 % ammonium removal through stripping was calculated for cultures conducted at 22, 32 and 27 °C, respectively. In these cases, the pH was lower than those found in cyanobacterial cultures (9.4 at 22 °C, 8.9 at 27 °C and 9 at 32 °C), which could explain the reduction of ammonia stripping. Opposite to cyanobacteria strains, *C. vulgaris* culture did not remove ammonium completely after 4 days of culture.



**Figure 18.** Growth profiles attained for *C. vulgaris* (a), *A. ovalisporum* (b) and *A. planctonica* (c) for the three tested temperatures along the cultivation time (circle for 22 °C, square for 27 °C and triangle for 32 °C).

Therefore, it can also be concluded that the main driving force for ammonium removal was ammonia volatilisation, while nitrogen assimilation by the microalgae was reduced. This was a result of the low available nitrogen in the medium, since nitrogen assimilation increases together with the increasing available nitrogen concentration [21]. Likewise, it is also important to note that cyanobacteria have the ability to fix molecular nitrogen [22] and, thus, nitrogen limitation would be less obvious.

Phosphate was totally removed after 3 days of cultivation at all temperatures with *A. planctonica*, and at 22 and 32 °C for *A. ovalisporum*. In the case of *C. vulgaris* at any of the tested temperatures and *A. ovalisporum* at 27 °C, phosphate was totally removed after 4 days of cultivation. In the same line that occurs for ammonium, phosphorous removal is also influenced by external factors such as high pH and dissolved oxygen which can lead to phosphate precipitation [23]. Thus, it can be suggested that both mechanisms, namely precipitation and assimilation, were accounted for phosphorus removal.

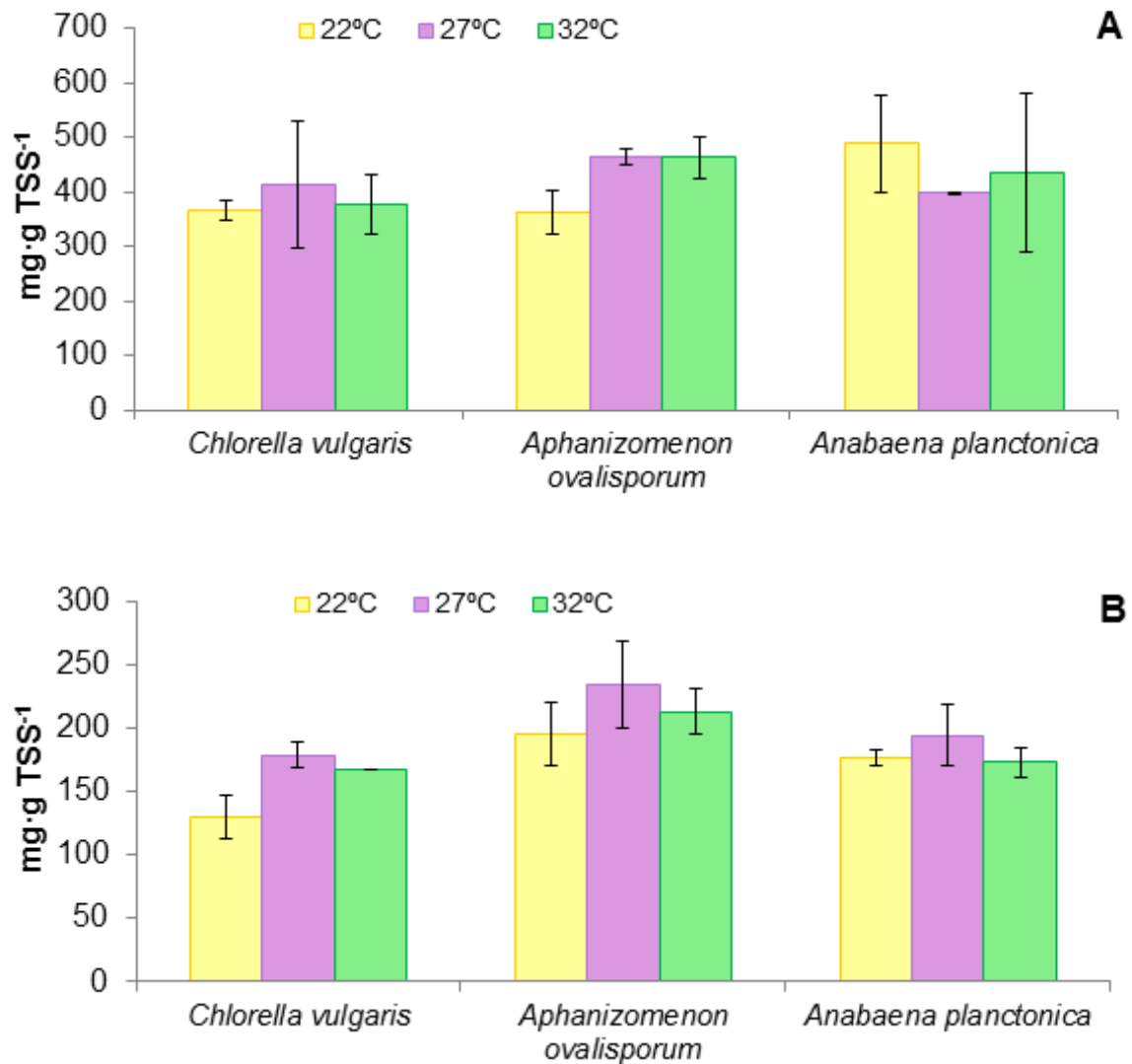
### 3.1.3. Biomass macromolecular profile characterisation

The central carbon metabolism of photosynthetic microorganisms, and hence biochemical composition, might change together with the environmental and operational parameters of culture conditions [24, 25]. Figure 2 shows the macromolecular distribution profile in terms of total carbohydrates and proteins of the three biomasses at the end of each culture. For all microorganisms, the amount of VSS ranged 81-97% w/w of TSS, which means low inorganic matter content. No remarkable differences were observed in carbohydrate profiles when the microorganisms were grown at different temperatures (Fig. 2a), which agreed with other studies and showed that polysaccharide content was affected by other parameters such as light intensity or nutrient availability, but not by temperature [26]. In the case of *C. vulgaris*, biomass carbohydrate content averaged 38% w/w TSS. This value was higher than those reported in literature, which usually range 12–17% w/w when *C. vulgaris* is grown in a synthetic medium [27, 28], while when compared with *C. vulgaris* grown in wastewater, the carbohydrate content of the collected biomass averaged 20–40 % [29]. Therefore, it can be suggested that the low nitrogen concentration in urban wastewater resulted in carbohydrate accumulation rather than proteins, which are in turn accumulated in nitrogen-rich media.

The carbohydrates profile varied among 36-46 and 40-48% (w/w) for *A. ovalisporum* and *A. planctonica*, respectively, and no clear effect of temperature was evidenced on the carbohydrate content. While some cyanobacteria strains like *Spirulina* sp. tend to allocate uptaken nutrients as proteins [12], both cyanobacterial strains used herein exhibited a particular tendency to accumulate carbohydrates. *A. ovalisporum* and *A. planctonica* have previously shown a carbohydrate content of 41.7 and 62.8% (w/w) when grown in synthetic medium [11]. For the studied cyanobacteria, the carbohydrate content decreased when compared with the biomass cultivated in synthetic media. On the other hand, *C. vulgaris* exhibited higher carbohydrate content when grown in wastewater.

Protein cell content is ruled by the nitrogen available in the medium; thus under nitrogen limitation, nutrients are allocated as carbohydrates or lipids depending on the photosynthetic microorganism strain metabolism and cultivation parameters. Protein content did not show major changes among different temperatures either (Fig. 2b). The highest protein content was  $234.0 \pm 34 \text{ mg}\cdot\text{g TSS}^{-1}$ , corresponding to *A. ovalisporum* at 27 °C (slightly lower values were determined for the other two temperatures Fig. 2). Regardless of the evaluated temperature, *A. planctonica* accounted for similar low protein values which ranged 17-19% (w/w). In the case of *C. vulgaris*, a very similar profile to cyanobacteria was obtained in terms of low levels of proteins [13-18% (w/w)] (Fig. 2b).

These results showed that the employed temperatures did not affect the macromolecular profile of the studied photosynthetic microorganisms. In both cases, i.e. for cyanobacteria and microalgae, the protein content was lower than ranges usually found in literature. Nitrogen is one of the most important elements for microalgae, since it is a major component in many biological macromolecules. It has been repeatedly reported that nitrogen limitation or starvation leads to low growth rates and photosynthetic efficiencies [30]. It also decreases protein synthesis and increases carbohydrate and lipid content [31, 32]. This fact agreed with our results from which it can be inferred that the low protein values and increased carbohydrate contents were due to the limited nitrogen available in the wastewater (no nitrate or nitrite was detected and ammonium concentration averaged  $90.3 \pm 20.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).



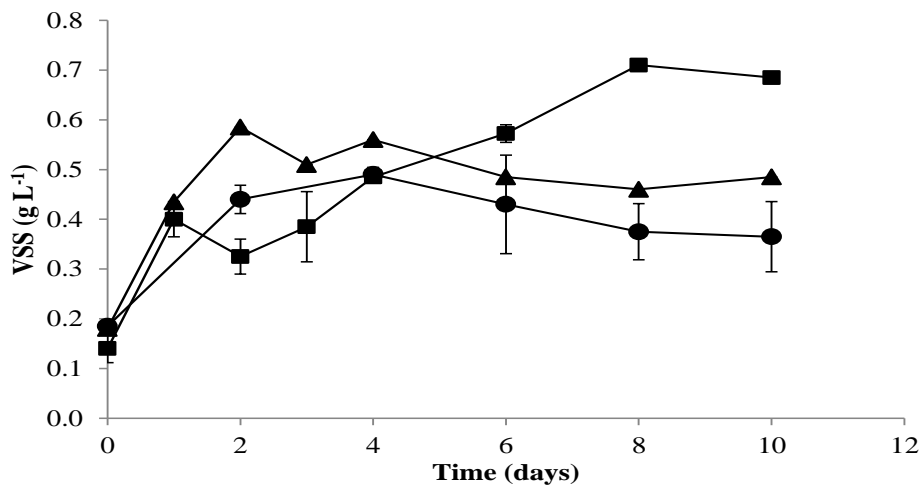
**Figure 19.** Biomass macromolecular distribution (carbohydrates content (a) and proteins content (b)) of the photosynthetic microorganisms at the end of the cultivation time conducted at 22, 27 and 32 °C.

3.2. Semi-continuous culture

3.2.1. Biomass growth

In the case of *C. vulgaris*, the growth in semi-continuous mode averaged  $0.42 \pm 0.07 \text{ g VSS} \cdot \text{L}^{-1}$  (Fig. 3). Ramos Tercero et al. [33] showed *Chlorella protothecoides* biomass concentration of  $0.47 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  in continuous mode with an HRT of 1.26 days on primary wastewater. This mentioned study also reported that when increasing residence time, the biomass concentration was increased considering that at tested HRTs there still were available nutrients in the media. However, despite the longer HRT employed in our study, no further increase in the biomass content was observed.

Regarding the cyanobacterial biomass, *A. ovalisporum* biomass was kept relatively stable along the culture period (Fig. 3). A different pattern was attained for *A. planctonica* which grew gradually along 8 days of culture, until it reached its maximum biomass concentration ( $0.71 \text{ g VSS} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Once again as observed in batch mode, semi-continuously fed photobioreactors also mediated higher biomass concentration for cyanobacteria than the one recorded for microalgae.

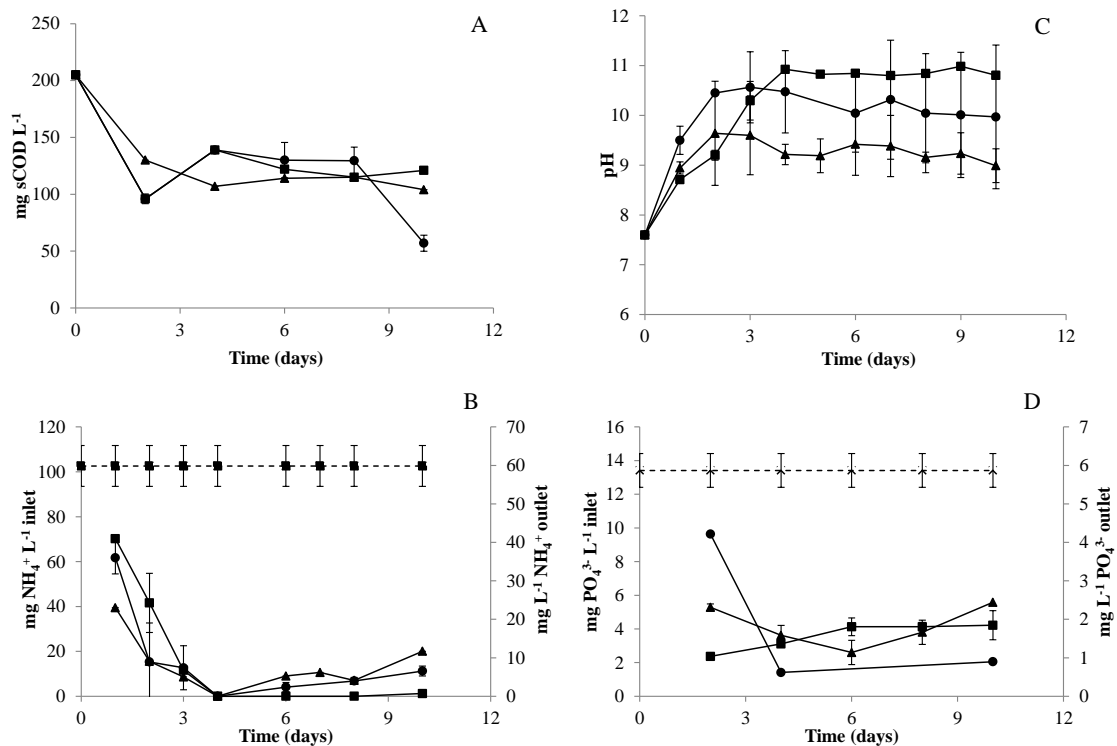


**Figure 20.** Different profiles of growth attained by *C. vulgaris* (circles), *A. ovalisporum* (triangles) and *A. planctonica* (squares) at 22 °C semi-continuous mode.

### 3.2.2. Nutrients removal

To further confirm the performance of the photobioreactors inoculated with cyanobacteria and microalgae in terms of wastewater bioremediation efficiency, nutrient removal was determined during the cultivation. The maximum decrease in soluble COD (Fig. 4a) was produced during the first 2 days in all cases and remained constant until the end of the cultivation period without being completely removed from the media (35-45% COD removal). It should be stressed that short chain organic acids and other small organic compounds that account for the organic fraction of the media might be assimilated by microalgae, depending on their metabolic ability to uptake those substrates, while complex organic matter would not be removed and thus remain in the culture broth.

For all the microorganisms, a rapid depletion in ammonium concentration was observed from the first day of culture until day 4 (ammonium was not detected at this sampling point, Fig. 4b). In case of *C. vulgaris*, 92 % of ammonium was removed after 2 days and it was not detected after 4 days of culture. However, after this period a slight increase was produced which reached  $4.06 \text{ mg NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$  after 10 days. This increase at late stages could be due to the slight decrease on the biomass growth (Fig. 3). Since some cells would be dying, its organic matter would be released into the media, increasing nitrogen content in the culture broth. A similar tendency was observed in cyanobacteria cultures, being more pronounced in *A. ovalisporum* and reached 78, 91 and 95 % removal in the first, second and third days, respectively, while *A. planctonica* showed 60, 78 and 93 % ammonium reduction. For this latter microorganism, namely *A. planctonica*, the ammonium concentration in the effluent was close to 0 from day 4 until the end of culture, while for *A. ovalisporum* there was an increase after day 4 reaching a final concentration of  $11.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  after 10 days.



**Figure 21.** Different profiles of soluble COD (a), ammonium (b), pH (c) and phosphate removal (d), attained by *C. vulgaris* (circles), *A. ovalisporum* (triangles) and *A. planctonica* (squares), in a semi-continuous culture mode. Ammonium and phosphate inlet concentrations are represented by discontinuous lines.

To analyse in detail nutrients removal and the ruling mechanisms for these removals, pH variation was also followed (Fig. 4c). After day 4, once the process stabilised the averaged values for *C. vulgaris*, *A. ovalisporum* and *A. planctonica* cultures were  $10.1 \pm 0.8$ ,  $9.3 \pm 0.4$  and  $10.8 \pm 0.2$ , respectively. In this context, taking into account the influence of pH and temperature on ammonium conversion into free ammonia, stripping values were calculated and averaged  $74.3 \pm 24.9$ ,  $46.6 \pm 10.4$  and  $95.3 \pm 3.8$  % for *C. vulgaris*, *A. ovalisporum* and *A. planctonica*, respectively. Once again, the high pH achieved in the culture mediated high ammonia stripping. At this point, it should be stressed out that no pH control was used in the present study, while some other studies inject carbon dioxide on demand or employ buffered media to avoid ammonia stripping and force nitrogen assimilation by keeping the pH close to neutrality [29, 34].

On the other hand, microorganisms were not able to remove phosphate completely (Fig. 4d). In the case of *C. vulgaris*, 94.4% of the phosphate was removed at the end of the culture, while for the cyanobacteria's cultures it reached 68.5 and 84.4% in *A. ovalisporum* and *A. planctonica* cultures, respectively. It should also be noticed that the high pH achieved could have involved phosphate precipitation as described for batch cultures. Therefore, removal values corresponded to phosphate elimination from the wastewater, but did not directly imply phosphorus assimilation.

### 3.2.3. Chemical characterisation of the biomass

*Chlorella vulgaris* biomass in semi-continuous mode did not show remarkable differences in carbohydrates content when compared with the batch mode. More specifically, the carbohydrate content reached 34.3 % (w/w) in the semi-continuous mode (Table 1). In the case of cyanobacteria, a slight decrease in carbohydrate content was observed with regard to the batch mode (34.0 and 42.1% (w/w) for *A. ovalisporum* and *A. planctonica*, respectively). As it was previously discussed, the nitrogen availability in the media plays an important role in macromolecule composition [23] and its increased availability may involve increased production of proteins. In this way, higher protein content may entail a reduction on carbohydrate formation.

When analysing the protein content of the biomass, atypical high values were attained. Under this scenario, the possibility of precipitates was inferred. It is worth mentioning that formation of crystals, such as struvite, is influenced both by specific component (magnesium, ammonium and phosphate) availability and pH higher than 7.5 [35]. In our case, it was suggested that crystal formation could be easily taking place since wastewater contains inorganic nitrogen, phosphorus and other elements such as magnesium or calcium. This fact combined with the high pH could potentially cause these precipitates. Conventional analysis methods (TKN) used for the determination of total proteins include a mineralisation step which involves the use of acids for the solubilisation of organic nitrogen. Taking into account that these crystals, which are not part of the organic matter, are solubilised at low pH [35], the conventional analysis would hydrolyse organic (biomass) and inorganic (precipitates) nitrogen. To circumvent this issue and further confirm the formation of precipitates, an enzymatic hydrolysis of the biomass was conducted to ensure solubilisation of organic nitrogen. The conditions of enzymatic hydrolysis were selected in accordance with Mahdy et al. [28]. These enzymatic conditions have been reported to hydrolyse 100% of the total

protein content of microalgae biomass. TKN analysis was performed in the hydrolysates obtained after enzymatic hydrolysis and, thus, only organic nitrogen content was determined. *C. vulgaris* presented a protein content of  $254.3 \pm 70.8$  mg·g TSS<sup>-1</sup> (Table 1). This value was lower than previous results obtained with the same microorganism in the synthetic media (protein content around 630-650 mg·g TSS<sup>-1</sup>) [27, 28]. Surprisingly, the value obtained in the semi-continuous mode was higher than the one achieved in the batch. It could be suggested that the constant addition of nitrogen that takes place in semi-continuous culture favoured protein formation. A similar trend was observed for cyanobacteria, increasing the protein content to 37.2 and 31.2% (w/w) for *A. ovalisporum* and *A. planctonica*, respectively. As previously described (see “Biomass macromolecular profile characterization”), nitrogen concentration in the media determines the synthesis of different macromolecules. Since protein accumulation is directly related to this nutrient, shorter HRTs would imply increased supply of influent and thus nitrogen source renovation, which ultimately would cause a slight increase in biomass proteins. Supporting this fact, Ruiz et al. [36] reported that when decreasing HRTs, biomass C:N ratios were decreased and therefore protein content increased.

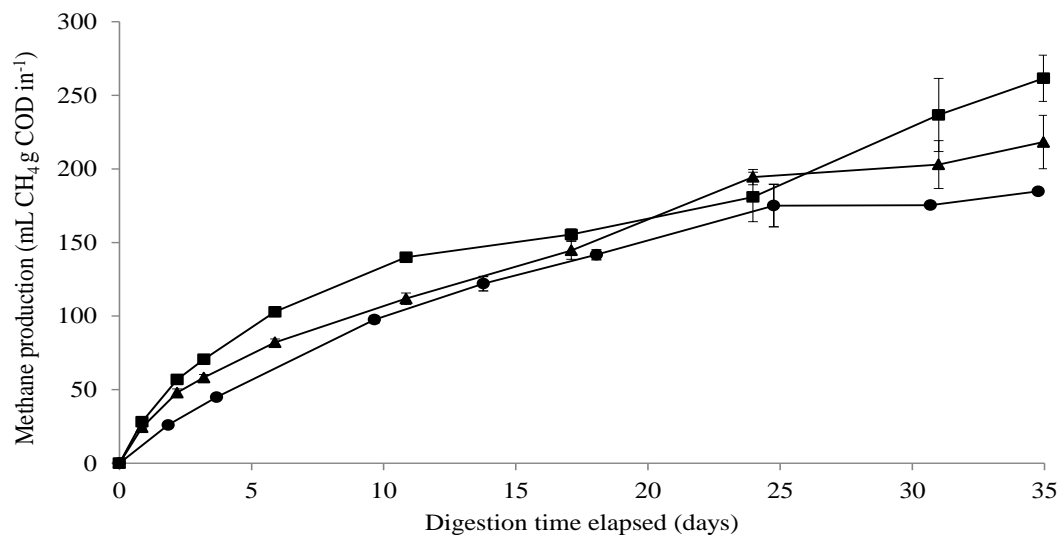
**Table 14.** Chemical characterisation of the photosynthetic microorganisms after 10 days of culture.

	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. ovalisporum</i>	<i>A. planctonica</i>
TSS (g·L <sup>-1</sup> )	0.44 (0.14)	0.62 (0.23)	0.733 (0.12)
VSS (g·L <sup>-1</sup> )	0.37 (0.07)	0.49 (0.18)	0.610 (0.11)
Total carbohydrates (mg·g TSS <sup>-1</sup> )	343.5 (19.9)	340.2	421.2 (0.9)
Total proteins (mg·g TSS <sup>-1</sup> )	254.3 (70.8)	372.4	312.4 (1.0)

### 3.3. Biomethane potential test of biomass harvested after semi-continuous culture mode

Figure 5 shows the methane yield attained for the three types of biomass collected in the semi-continuous cultivation mode. *C. vulgaris* biomass anaerobic digestion resulted in 184.8 mL CH<sub>4</sub> ·g COD in<sup>-1</sup> (corresponding to 52% of biodegradability). This value was unexpectedly high since previous reports dealing with this biomass showed lower methane yields of around 40% [4, 37].

Concerning the anaerobic digestion of cyanobacterial biomass, methane yield profiles followed similar pattern with slightly higher values. More specifically, 218.2 and 261.6 mL CH<sub>4</sub> ·g COD in<sup>-1</sup> were obtained for *A. ovalisporum* and *A. planctonica*, respectively, which accounted for 62 and 74 % anaerobic biodegradability. Differences in biodegradability yield between microalgae and cyanobacterial might be attributed to differences in cell wall. The cyanobacterial cell wall contains a peptidoglycan layer closely related to Gram-negative bacteria cell wall more easily digested than microalgae cell wall [6]. As a matter of fact during the first days of digestion (when hydrolysis takes place), methane production was 1.3- to 1.6-fold higher for cyanobacterial biomass than for *C. vulgaris* (Fig. 5). Furthermore, after 25 days, methane yields were quite similar for the three types of biomass. After that point, while the methane yield of *C. vulgaris* remained more or less stable, the cyanobacteria biomass still produced a considerable amount of methane (from 194 up to 218 mL CH<sub>4</sub> ·g COD in<sup>-1</sup> for *A. ovalisporum* and from 181 to 261 mL CH<sub>4</sub> ·g COD in<sup>-1</sup> in the case of *A. planctonica*). Even though a big research effort has been devoted to microalgae biomass as a substrate for biogas production, the information available on cyanobacteria on this topic is scarce. *Arthrospira platensis* appears as a potential candidate for biofuel production, due to its relatively high growth rates. This cyanobacterium has been reported to reach methane yields of 123–203 mL CH<sub>4</sub> ·g COD in<sup>-1</sup> [38]. The only data available with similar cyanobacteria strains are relatively close to the values provided herein for *A. ovalisporum*, while much higher values were attained for *A. planctonica* [11]. These differences could be due to the different macromolecular distribution of both studies.



**Figure 22.** Cumulative methane yield achieved by *C. vulgaris* (circles), *A. ovalisporum* (triangles) and *A. planctonica* (squares) biomass after semi-continuous cultivation.

#### 4. Conclusions

This study was designed to provide a fair comparison between the cyanobacteria (*A. ovalisporum* and *A. planctonica*) and the microalga *C. vulgaris* in terms of biomass production and macromolecular composition in wastewater as well as methane production. This study showed that some cyanobacteria can be comparable to microalgae in terms of growth. *A. ovalisporum* and *A. planctonica* exhibited differences in growth pattern when cultivated at different temperatures, giving its optimal at 22 °C. In contrast, *C. vulgaris* did not show any preference for any of the temperatures tested. With regard to nutrient removal from wastewater, ammonium and phosphate were completely removed after 4 days of cultivation. Despite the different tested temperatures, no marked differences were observed in terms of biomass of carbohydrates and proteins. As observed in the batch mode, maximum growth concentration was attained for cyanobacterial biomass (*A. planctonica*) in the semi-continuous mode. Nutrient removals were higher in the case of ammonium than for phosphorous removals. *C. vulgaris* was the microorganism that provided higher nutrient removal.

Anaerobic biodegradabilities of the cyanobacteria biomass presented 1.2- and 1.4-fold for *A. ovalisporum* and *A. planctonica*, respectively, higher methane yield than *C. vulgaris*.

These results suggested that cyanobacteria biomass could be an alternative to microalgae by overcoming the low digestibility of the later ones while providing similar features of growth and nutrient removal.

### Acknowledgments

The authors want to thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for financial support to this project (WW-ALGAS, ENE2013-45416-R and RYC-2014-16823) and the WWTP of Valladolid (Spain) for kindly supplying the anaerobic sludge. Elia Tomás-Pejó acknowledges the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under REA Grant Agreement No. 291803.

### References

1. Muñoz R, Guieysse B (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res* 40:2799–815.
2. da Silva TL, Gouveia L, Reis A (2014) Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:1043–1053.
3. González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP (2012) Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenerg* 40:105–111.
4. Mendez L, Mahdy A, Timmers RA, et al (2013) Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour Technol* 149:136–41.
5. Passos F, Solé M, García J, Ferrer I (2013) Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Appl Energy* 108:168–175.
6. Hoiczky E, Hansel A (2000) Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J Bacteriol* 182:1191–9.
7. Markou G, Vandamme D, Muylaert K (2014) Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. *Water Res* 65:186–202.

8. Posadas E, García-Encina PA, Soltau A, et al (2013) Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal-bacterial biofilm bioreactors. *Bioresour Technol* 139:50–8.
9. Wang L, Min M, Li Y, et al (2010) Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol* 162:1174–86.
10. Choi HJ, Lee SM (2015) Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng* 38:761–766.
11. Mendez L, Mahdy A, Ballesteros M, González-Fernández C (2015) *Chlorella vulgaris* vs cyanobacterial biomasses: Comparison in terms of biomass productivity and biogas yield. *Energy Convers Manag* 92:137–142.
12. Markou G, Georgakakis D (2011) Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl Energy* 88:3389–3401.
13. Jöhnk KD, Huisman J, Sharples J, et al (2008) Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Glob Chang Biol* 14:495–512.
14. Posadas E, García-Encina PA, Domínguez A, et al (2014) Enclosed tubular and open algal–bacterial biofilm photobioreactors for carbon and nutrient removal from domestic wastewater. *Ecol Eng* 67:156–164.
15. Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA
16. González López CV, Cerón García M del C, Ación Fernández FG, et al (2010) Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour Technol* 101:7587–91.
17. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 28:350–356.
18. Ji M-K, Abou-Shanab RAI, Kim S-H, et al (2013) Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecol Eng* 58:142–148.
19. Lürling M, Eshetu F, Faassen EJ, et al (2013) Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshw Biol* 58:552–559.
20. Hansen KH, Angelidaki I, Ahring BK (1998) Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Res* 32:5–12.

21. de Aguiar do Couto E, Calijuri ML, Assemany PP, et al (2015) Influence of solar radiation on nitrogen recovery by the biomass grown in high rate ponds. *Ecol Eng* 81:140–145.
22. Issa AA, Abd-Alla MH, Ohya T (2014) Nitrogen Fixing Cyanobacteria: Future Prospect. In: Ohya T (ed) *Adv. Biol. Ecol. Nitrogen Fixat. InTech*, p 282
23. Cai T, Park SY, Li Y (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew Sustain Energy Rev* 19:360–369.
24. Markou G (2012) Alteration of the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresour Technol* 116:533–5.
25. González-Fernández C, Ballesteros M (2012) Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnol Adv* 30:1655–61.
26. Yang Z, Geng L, Wang W, Zhang J (2012) Combined effects of temperature, light intensity, and nitrogen concentration on the growth and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* in batch culture. *Biochem Syst Ecol* 41:130–135.
27. Mendez L, Mahdy A, Ballesteros M, González-Fernández C (2014) Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. *Appl Energy* 129:238–242.
28. Mahdy A, Mendez L, Ballesteros M, González-Fernández C (2014) Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. *Energy Convers Manag* 85:551–557.
29. Beuckels A, Smolders E, Muylaert K (2015) Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Res* 77:98–106.
30. Jiang Y, Yoshida T, Quigg A (2012) Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiol Biochem* 54:70–7.
31. Pancha I, Chokshi K, George B, et al (2014) Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. *CCNM* 1077. *Bioresour Technol* 156:146–54.
32. Illman A., Scragg A., Shales S. (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol* 27:631–635.
33. Ramos Tercero EA, Sforza E, Morandini M, Bertucco A (2014) Cultivation of *Chlorella protothecoides* with urban wastewater in continuous photobioreactor: Biomass productivity and nutrient removal. *Appl Biochem Biotechnol* 172:1470–1485.

34. Morales-Amaral M del M, Gómez-Serrano C, Acién FG, et al (2015) Production of microalgae using centrate from anaerobic digestion as the nutrient source. *Algal Res* 9:297–305.
35. De-Bashan LE, Bashan Y (2004) Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Res* 38:4222–46.
36. Ruiz J, Álvarez-Díaz PD, Arbib Z, et al (2013) Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae in urban wastewater: prediction from a batch experiment. *Bioresour Technol* 127:456–63.
37. Wang M, Park C (2015) Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge. *Biomass Bioenerg* 80:30–37.
38. Markou G, Angelidaki I, Georgakakis D (2013) Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-methane production through anaerobic digestion. *Fuel* 111:872–879.





## ***4. Discusión***



Para una mejor discusión de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, esta sección no se llevará a cabo siguiendo el orden cronológico establecido en los artículos mostrados anteriormente. En su lugar se realizará una discusión organizada en base al cultivo de los microorganismos fotosintéticos, los pretratamientos estudiados para la solubilización de la materia orgánica y el proceso de digestión anaerobia para la producción de biogás a partir de biomasa de microalgas. A continuación se analizarán el la capacidad de las cianobacterias para depurar aguas residuales y su utilización como sustrato en la digestión anaerobia.

### 4.1. Biomasa de microalgas como sustrato para digestión anaerobia

#### 4.1.1. Cultivo y productividad

La biomasa empleada en esta Tesis se ha obtenido mediante cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. bajo condiciones de iluminación constante a una temperatura de 25 °C en medio sintético Basal Bold modificado (BBM) rico en nutrientes. Este medio fue modificado en su composición sustituyendo el compuesto  $\text{NaNO}_3$  por  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . La composición del medio de cultivo es relevante ya que en numerosas publicaciones se ha demostrado que la composición macromolecular de las microalgas está altamente influenciada por la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo (González-Fernández et al., 2016; Molinuevo-Salces et al., 2016; Pancha et al., 2014). En el caso de los estudios comparativos de crecimiento de microalgas y cianobacterias, se empleó *C. vulgaris* como organismo modelo de microalga verde y como medio de cultivo se empleó agua residual urbana.

El primer parámetro evaluado en el cultivo de los microorganismos fotosintéticos, fue la velocidad específica de crecimiento. En la fase exponencial la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) se calculó en cultivos realizados a una temperatura de 25 °C. La cinética de crecimiento de *C. vulgaris* en medio BBM se muestra en la Figura 1A (Artículo 6). *C. vulgaris* mostró una  $\mu_{\text{max}}$  de 1,2  $\text{dia}^{-1}$ . Este valor se encuentra en el rango normalmente mencionado para esta especie y otras especies de Clorófitas (Bouterfas et al., 2002). Blair et al.(2014) obtuvieron una tasa específica de

#### 4. Discusión

---

crecimiento de  $1,1 \text{ dia}^{-1}$  para *C. vulgaris* cultivada en medio Bold Basal modificado, utilizando el 50% de concentración de los nutrientes del medio y del 25% para el fósforo. Estos mismos autores obtuvieron tasas de crecimiento menores ( $0,75 \text{ dia}^{-1}$ ) empleando el mismo medio pero con la concentración de estándar de nitrógeno de este medio de cultivo. Estos resultados indican que la capacidad de crecimiento de *C. vulgaris* es altamente dependiente del contenido de nitrógeno disponible en el medio de cultivo. A pesar de las diferentes tasas de crecimiento, en ambos experimentos se alcanzaron concentraciones de biomasa similares ( $1,4\text{-}1,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), lo que indica que la limitación de nutrientes en el rango empleado por estos autores afectó a la productividad pero no a la producción total de biomasa. Se puede concluir que la tasa de crecimiento se puede maximizar optimizando la composición del medio de cultivo. En cuanto a la productividad volumétrica, *C. vulgaris* presentó un máximo de  $0,5 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$  en los dos primeros días de cultivo, correspondientes a la fase de crecimiento exponencial, disminuyendo en los días posteriores a  $0,2 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$  dado que la población entró en fase estacionaria (Artículo 6, Figura 2A).

Posteriormente, con el fin de evaluar la temperatura óptima de crecimiento y el efecto del medio de cultivo sobre la composición macromolecular de *C. vulgaris*, se empleó como medio de cultivo agua residual urbana, cuya composición en  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  fue de  $90,3 \pm 20,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $14,7 \pm 3,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Esto significa un contenido en  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  1,5 y 10 veces menor que la concentración de estos compuestos en el medio sintético MBB. Se cultivó la microalga en reactores operados en modo discontinuo a 22, 27 y 32 °C. En estos ensayos la  $\mu_{\text{max}}$  fue significativamente menor que la obtenida en medio sintético ( $1,2 \text{ dia}^{-1}$ ), oscilando en un rango de  $0,25\text{-}0,32 \text{ dia}^{-1}$ , para las distintas temperaturas empleadas. El efecto de la temperatura sobre la concentración final de biomasa no fue remarcable, obteniéndose valores de  $1,28 \pm 0,2 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$  al cabo de 10 días (Artículo 7, Figura 1A). Estos resultados corroboran el efecto que tiene la concentración de nutrientes en el medio de cultivo sobre el crecimiento de *C. vulgaris*, en especial el contenido en  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , ya que son el N y P los elementos mayoritarios (tras el C) en la composición en peso seco de la biomasa. Estos elementos se suelen encontrar en las microalgas en rangos de 17-65% de C, 1-14% de N, y 1-3% de P (Grobbelaar, 2004; Markou et al., 2014a; Solovchenko et al., 2016)

#### 4. Discusión

---

Existen varios mecanismos responsables de la eliminación del nitrógeno presente en el agua residual durante el cultivo de los microorganismos fotosintéticos. Estos mecanismos incluyen la asimilación del nitrógeno por parte de los microorganismos (de Aguiar do Couto et al., 2015; L. Wang et al., 2010), procesos de volatilización (tras la conversión a su forma gaseosa  $\text{NH}_3$ ) (Markou et al., 2014b), o precipitación debido a cambios de pH en presencia de compuestos que favorecen la formación de cristales (Pratt et al., 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el  $\text{NH}_4^+$  contenido en el agua residual fue totalmente eliminado a los 4 días de cultivo. Sin embargo, el cálculo de la conversión de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NH}_3$  reveló que los valores de volatilización de este compuesto a 27 y 32 °C corresponde al 44 y 61% como consecuencia del alto pH alcanzado (pH=9). Esta volatilización conlleva una disminución en los niveles de nitrógeno disponibles para los microorganismos, lo que se traduce en una menor asimilación y, por lo tanto, en un menor crecimiento de la microalga. En estudios de biorremediación de aguas residuales en reactores abiertos en los que se establecen consorcios de microalgas-bacterias, es común encontrar que uno de los procesos de eliminación de nitrógeno sea debido a mecanismos de nitrificación (de Godos et al., 2009a; González-Fernández et al., 2011b). La nitrificación se produce principalmente cuando la concentración de oxígeno disuelto en el medio se incrementa por encima de  $2 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ , pudiendo encontrarse porcentajes de eliminación entre el 28 y el 52% por este proceso (Posadas et al., 2014) dependiendo de las condiciones de cultivo empleadas (TRH, VCO, pH), del sustrato, inóculo y configuración del FBR. En los procesos de nitrificación las bacterias oxidan el  $\text{NH}_4^+$  del medio produciendo  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ . Las microalgas son capaces de asimilar  $\text{NO}_3^-$  y algunas especies  $\text{NO}_2^-$  (Sawayama et al., 1992). Sin embargo, emplean principalmente  $\text{NH}_4^+$  si este se encuentra disponible en el medio (Cai et al., 2013). Durante el cultivo de *C. vulgaris* en agua residual a diferentes temperaturas realizado en este estudio, no se observó presencia de estos compuestos, por lo que puede concluirse que la actividad de las bacterias presentes en el agua residual no influyó en los procesos de eliminación de nitrógeno. Cabe destacar que en los ensayos realizados en la Tesis Doctoral, solo se realizaron inoculaciones con microorganismos fotosintéticos y que los procesos de nitrificación suele predominar en cultivos inoculados con consorcios microalga-bacteria aerobia.

Respecto a la eliminación de  $\text{PO}_4^{3-}$  de las aguas residuales, no se observó este compuesto a partir de los 4 días de cultivo para todas las temperaturas evaluadas. Al

#### 4. Discusión

---

igual que para el  $\text{NH}_4^+$ , su eliminación puede verse afectada por factores como el pH o el oxígeno disuelto en el medio (Cai et al., 2013). Se ha descrito que a pH superiores a 8,5 pueden darse fenómenos de precipitación de  $\text{PO}_4^{3-}$  (Beuckels et al., 2013; Pratt et al., 2012), dando lugar a la formación de cristales de fosfato de calcio, estruvita ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ) o hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ). Estos precipitados pueden encontrarse en efluentes como aguas residuales (De-Bashan y Bashan, 2004), y la presencia de determinados cationes, como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , posibilitan su formación. El agua residual empleada en estos ensayos contenía 183 y 44  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , respectivamente. Por tanto, dado el aumento de pH que se produce como consecuencia de la actividad fotosintética, se puede inferir que la eliminación de fósforo observada fue debida tanto a la asimilación por parte de la microalga como a fenómenos de precipitación.

En los ensayos realizados en condiciones de operación semi-continuo, se utilizó una temperatura de 22 °C y un TRH de 3 días (Artículo 7, Figura 3). Estas condiciones de cultivo fueron seleccionadas de acuerdo al crecimiento observado en cultivo en discontinuo. La temperatura no afectó el crecimiento de la microalga, mientras que 22 °C fue la temperatura más favorable para el crecimiento de cianobacterias (las cuales se describirán en el apartado 4.5.1). *C. vulgaris* presentó un crecimiento estable con una concentración de biomasa promedio de 0,42 g SSV  $\cdot\text{L}^{-1}$ . Esta concentración de biomasa es similar a la obtenida por otros autores con *Chlorella protothecoides* cultivada en aguas residuales primarias ( $\text{N-NO}_3$ : 19  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{N-NH}_4^+$ : 64  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{P-PO}_4^{3-}$ : 9  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) con TRH más bajos (1,26 días) (Ramos Tercero et al., 2014). Estos investigadores observaron que un aumento del TRH (2 días) conducía a una mayor producción de biomasa. Los resultados obtenidos por estos autores son similares a los obtenidos en este estudio aunque los TRH eran más bajos. Cabe destacar que estos autores emplearon un FBR cerrado con suministro de  $\text{CO}_2$ , lo cual minimiza las pérdidas de nutrientes por volatilización, y por lo tanto hace que estén en el medio de cultivo en mayor concentración para que puedan ser asimilados por las microalgas favoreciendo la producción de biomasa.

En estos ensayos se observó un rápido descenso de la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en los 4 primeros días de cultivo, más concretamente se alcanzaron porcentajes de eliminación del 92%. Incubaciones más largas condujeron a un ligero aumento de  $\text{NH}_4^+$  y a un descenso en la concentración de biomasa, indicando que parte de las

células habían muerto y que podrían estar liberando materia orgánica al medio de cultivo incrementando ligeramente el contenido en nitrógeno del medio.

La eliminación de  $\text{PO}_4^{3-}$  alcanzó un máximo de 94% en los primeros días, manteniéndose estable hasta el final del cultivo. Como se ha comentado anteriormente, el aumento en el pH puede afectar a la precipitación del  $\text{PO}_4^{3-}$  (Pratt et al., 2012), y dadas las condiciones de alto pH producidas por la actividad fotosintética, parte de la eliminación observada de  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{NH}_4^+$  podrían deberse a procesos de precipitación.

#### 4.1.2. Caracterización de la biomasa

Dado que la producción y productividad de biogás es altamente dependiente de la composición bioquímica de la materia orgánica empleada como sustrato, resulta de gran importancia conocer la composición macromolecular de la biomasa. En los cultivos en medio sintético, *C. vulgaris* presentó una composición macromolecular de  $22,8 \pm 9\%$  de carbohidratos y  $56,8 \pm 10\%$  de proteínas. El contenido en cenizas fue de 6-10% de peso seco, correspondiendo a la fracción inorgánica de la biomasa algal y, en menor medida, a las sales presentes en el medio de cultivo no asimiladas por las microalgas. La fracción lipídica (14% aproximadamente) fue estimada mediante la diferencia del contenido de carbohidratos, proteínas y material inorgánico del peso seco total. Estos datos concuerdan con la composición habitual de este microorganismo (Becker, 2004; Mahdy et al., 2015b; Markou, 2015; Postma et al., 2015b).

La biomasa de *Scenedesmus* sp, utilizada para el estudio del pretratamiento térmico a altas cargas, mostró unos valores de  $22,1 \pm 7\%$  ST de carbohidratos,  $30,4 \pm 4\%$  ST de proteínas y un contenido de material inorgánico del 19%, dando como resultado una proporción lipídica del 29%. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores (Batista et al., 2014; Gruber-Brunhumer et al., 2015; Mahdy et al., 2014b). Sin embargo, otros autores reportan composiciones diferentes a las encontradas en este estudio, englobadas en rangos de 50-56% de proteínas, 10-17% de carbohidratos y 12-14% de lípidos para *S. obliquus* (Becker, 2004; Ramos-Suárez y Carreras, 2014; Suganya et al., 2016), o del 42% de proteínas, 39% de

#### 4. Discusión

---

carbohidratos y 11 % de lípidos en el caso de *S. almeriensis* (Romero García et al., 2012). Estas diferencias de composición pueden ser debidas a diferencias en las condiciones de cultivo de la biomasa, así como al empleo de diferentes especies de *Scenedesmus*.

Como se ha mencionado anteriormente, la composición del medio de cultivo no sólo afecta al crecimiento de las microalgas, sino que también influye notablemente en la distribución macromolecular de la biomasa (Pancha et al., 2014). Atendiendo al contenido en carbohidratos, *C. vulgaris* cultivada en agua residual mostró un contenido de 38% SST aproximadamente. Este valor es superior al observado cuando se cultivó dicha microalga en medio sintético (23% ST). El contenido en proteínas, 13-18%, fue menor que el obtenido con la biomasa cultivada en medio sintético (58% ST). Estos resultados pueden explicarse por la diferente concentración de nitrógeno presente en el medio de cultivo en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Diversos estudios han demostrado que una concentración baja de nitrógeno en el medio afecta al metabolismo de las microalgas de tal forma que aumentan su producción de carbohidratos y lípidos, mientras que el contenido proteico disminuye (He et al., 2013; Illman et al., 2000; Pancha et al., 2014). El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales para el desarrollo de las microalgas (Markou et al., 2014a), y es necesario para la formación de ácidos nucleicos o pigmentos aunque principalmente está involucrado en la síntesis de proteínas. Por tanto, el nitrógeno disponible en el medio está directamente relacionado con la producción de biomasa del cultivo.

Diversos estudios sugieren que la temperatura empleada durante el cultivo de microorganismos fotosintéticos afecta a su composición bioquímica (distribución macromolecular). Más concretamente, Oliveira et al. (1999) observaron una influencia significativa de la temperatura (20-40 °C) sobre la distribución de proteínas y carbohidratos de *Spirulina máxima* y *Spirulina platensis*. Se observó que un incremento de temperatura producía una disminución de las proteínas (71-59%) y un aumento de los carbohidratos (10-20%) Por otro lado, Renaud et al. (2002) observaron, utilizando cinco especies de microalgas, que aunque presentaban diferentes patrones de distribución macromolecular en función del microorganismo empleado, su comportamiento frente a la temperatura era similar. Su estudio reveló que mientras el contenido en carbohidratos se mantenía constante y el contenido en proteínas no variaba significativamente en un rango de temperaturas de 25-30 °C, sí

#### 4. Discusión

---

disminuía significativamente a 35 °C. En nuestro estudio, durante el crecimiento de *C. vulgaris* en modo discontinuo en aguas residuales a diferentes temperaturas (22, 27 y 32 °C), no se observó una relación directa entre las variaciones producidas en la composición macromolecular de *C. vulgaris* y la temperatura empleada (Artículo 7, Figura 2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Renaud et al. (2002).

Durante el cultivo en modo semi-continuo empleando agua residual, se observó mayor incremento del contenido proteico que en el cultivo en modo discontinuo (Artículo 7, Figura 2; Tabla 1). El contenido de proteínas fue del 25%, mientras que el contenido en carbohidratos no presentó grandes diferencias (34%) con respecto al cultivo en modo discontinuo. Aun así, estos valores fueron inferiores a los obtenidos cuando *C. vulgaris* fue cultivada en medio MBB. De este modo, la adición continuada de medio fresco, y por consiguiente de nitrógeno, podría ser el responsable del ligero incremento de la fracción proteica con respecto al modo de operación en discontinuo, en el cual únicamente se añade medio fresco al inicio del cultivo. Un descenso en el TRH del cultivo, implica un aumento en la acumulación de nitrógeno intracelular dado que se aporta nutrientes más frecuentemente (Boelee et al., 2011; Ruiz et al., 2013). Este hecho concuerda con el ligero descenso observado en el contenido de carbohidratos y aumento de proteínas al comparar los modos de cultivo semi-continuo (25% de carbohidratos y 34% en proteínas) y batch (38% de carbohidratos y 13-18% en proteínas).

### 4.2. Producción de metano a partir de biomasa microalgal fresca

#### 4.2.1. Características de las microalgas como sustrato para la digestión anaerobia comparado con otras biomásas

La producción de biogás mediante digestión anaerobia es un proceso tecnológicamente maduro que en la actualidad se emplea ampliamente en plantas de tratamiento de residuos biodegradables ([www.aebig.org](http://www.aebig.org); [www.european-biogas.eu](http://www.european-biogas.eu)). Los procesos de digestión anaerobia, en el caso de una planta de tratamiento de aguas residuales convencional, utilizan como sustrato fangos primarios y secundarios. Sin embargo, el uso de microalgas como sustrato para la producción de biogás es relativamente reciente, por lo que es necesario evaluar el comportamiento de esta biomasa frente a la digestión anaerobia y su posible optimización adaptada a las características de este sustrato.

Existen numerosas referencias en la literatura sobre producción de CH<sub>4</sub> mediante digestión anaerobia empleando biomásas provenientes de distintos tipos de residuos o cultivos energéticos no destinados a la producción de alimentos, como es el caso del pasto (Rodríguez et al., 2017), paja de cebada (Wei et al., 2014), paja de trigo y biomasa leñosa (López et al., 2013), entre otros. Sin embargo el uso de este tipo de biomasa presenta el problema asociado a su elevado contenido en lignina, un polímero altamente recalcitrante que dificulta la digestión disminuyendo la producción de biogás (Wei, 2016). Una de las ventajas asociadas al empleo de microalgas para la producción de biogás es la ausencia de este polímero, facilitando de este modo su biodegradabilidad. Así mismo, las microalgas en general no requieren de grandes extensiones ni compiten por terrenos cultivables. Además, tienen la capacidad de crecer en distintos tipos de efluentes, permitiendo el uso de medios de cultivo económicamente viables. En este contexto, cabe destacar el cultivo de microalgas utilizando efluentes ganaderos (González et al., 2008; Ledda et al., 2016; Molinuevo-Salces et al., 2012). El principal problema asociado a este tipo de medios de cultivo viene ligado a la alta concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> que resulta inhibitorio para las microalgas, siendo necesario realizar grandes diluciones.

Un parámetro clave en la digestión anaerobia de cualquier sustrato es la relación carbono/nitrógeno. El rango óptimo de C/N de un sustrato para ser degradado

eficientemente en condiciones anaerobias se encuentra entre 20-30 (Yen y Brune, 2007). Actualmente, también se está investigando la co-digestión de distintos tipos de sustratos para alcanzar una relación adecuada de C/N, corrigiendo el bajo contenido en C de algunos sustratos empleados en la digestión anaerobia. Más concretamente, las microalgas presentan una baja relación C/N (Arcila y Buitrón, 2016; Ramos-Suárez y Carreras, 2014) y, por lo tanto, pueden ser co-digeridos con sustratos ricos en C. Existen referencias en la literatura sobre co-digestión de microalgas con otros sustratos, como son la co-digestión de *Scenedesmus* sp. con purín de cerdo, donde consiguieron un incremento de la producción de CH<sub>4</sub> superior a la teórica (Astals et al., 2015), o la co-digestión de paja de trigo y algas marinas (Nkemka y Murto, 2013). González-Fernández et al. (2011b) emplearon biomasa de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*) en co-digestión con purines de cerdo para aumentar el contenido de C incrementada por la composición de carbohidratos aportada por las microalgas. Estos autores observaron que la producción de CH<sub>4</sub> disminuía con el aumento de biomasa microalgal, debido a que la pared celular de esta biomasa impedía el acceso de las bacterias anaerobias a la materia orgánica. En otros estudios relacionados con la digestión anaerobia de microalgas (Mussgnug et al., 2010) se comparó la biodegradabilidad varias especies, observando que para *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella kessleri*, la producción de biogás fue menor del 40% de biodegradabilidad. En este estudio se destaca la diferente resistencia a la degradación debida a la composición de la pared celular, afectando significativamente la producción de CH<sub>4</sub> que se puede alcanzar con estos sustratos. Por tanto, para lograr el acceso al material orgánico intracelular de la microalga es necesario pretratar la biomasa y promover la ruptura de la pared.

#### 4.2.2. Digestión anaerobia de microalgas: comparación entre especies

Han sido muchas las microalgas empleadas como sustrato en el estudio del proceso de digestión anaerobia para la producción de biogás, pero son las especies pertenecientes a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* sobre las que existen mayores referencias en la literatura. Este hecho es debido a que son microorganismos cuyo cultivo es sencillo, rápido y no tienen requerimientos nutricionales complejos, siendo capaces de crecer en aguas residuales. La producción de CH<sub>4</sub> en BMP (modo

#### 4. Discusión

---

discontinuo) a partir de *Scenedesmus* y *Chlorella* sin aplicar ningún tipo de tratamiento está en el rango de 230-270 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>, respectivamente (Klassen et al., 2016). Mahdy et al. (2015b), obtuvieron producciones de biogás utilizando *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. alrededor de 142 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup> (227 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>). Sin embargo, este mismo estudio reveló que *Scenedesmus* necesitó casi el doble de tiempo de digestión para alcanzar la misma producción de CH<sub>4</sub>, mostrando la dificultad de degradación de esta microalga. Cabe destacar que *Scenedesmus* es posiblemente una de las especies de microalga verde más difícilmente degradable (González-Fernández et al., 2012, 2013; Mussnug et al., 2010). Otras especies empleadas en la producción de biogás son las pertenecientes al género *Nannochloropsis* y poblaciones mixtas de diversas especies (dado que en el contexto de producción de energía no se cultivan microalgas en condiciones de esterilidad). Schwede et al. (2013) obtuvieron producciones de biogás bajas (200 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>) utilizando *Nannochloropsis salina*. Igualmente, Marsolek et al. (2014) obtuvieron valores de 204-238 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> (110-128 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup>) empleando *Nannochloropsis oculata* como sustrato. Utilizando poblaciones mixtas de microalgas, Alzate et al. (2012) lograron una producción de CH<sub>4</sub> de 198 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> para una mezcla de 58% *Acutodesmus obliquus*, 36% *Oocystis* sp., 1% *Phormidium* y 5% *Nitzschia* sp. Passos et al. (2016) obtuvieron 189 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> para una mezcla de diatomeas y *Oocystis*, y 105 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> empleando únicamente *Oocystis* sp. (Passos et al., 2015a). Las microalgas mencionadas tienen paredes celulares cuyas características las hacen resistentes a la degradación y, por lo tanto, limitando la producción de CH<sub>4</sub>. Por ejemplo, el género *Nitzschia*, pertenece a las diatomeas cuyas paredes contienen sílice como componente estructural (Sumper y Brunner, 2006). *Oocystis* sp. posee una pared trilaminar compleja (Uggetti et al., 2017). *Nannochloropsis salina* presenta “algaenan” en su pared celular (Schwede et al., 2013), al igual que algunas especies de *Chlorella*. *Acutodesmus obliquus* es una especie similar a *Scenedesmus* y puede presentar en su pared polímeros de “esporopolenina” (Afi et al., 1996; Atkinson et al., 1972; Burczyk y Dworzanski, 1988).

En los últimos años, la investigación se ha centrado en la utilización de otras especies que han mostrado mejores resultados en cuanto al rendimiento de CH<sub>4</sub>. Es el caso de Mahdy et al. (2014b) que, empleando la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, obtuvieron una producción de 263 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup> (405,4 mL CH<sub>4</sub> ·g SV<sup>-1</sup>). Del mismo modo, Mussnug et al. (2010) lograron producciones de 387 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>

#### 4. Discusión

---

utilizando *Chlamydomonas reinhardtii*, 323 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> con *Dunaliella salina* y 324 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> empleando la microalga *Euglena gracilis*.

Otras especies estudiadas que han mostrado buenos resultados son *Navicula salinicola*, *Dunaliella tertiolecta* y *Dunaliella* sp. con las que se han obtenido producciones de CH<sub>4</sub> de 331, 311 y 308 mL CH<sub>4</sub> ·g PSin<sup>-1</sup>, respectivamente (364, 342 y 339 mL CH<sub>4</sub> SVin<sup>-1</sup>, asumiendo un contenido inorgánico del 10%) (Bogen et al., 2013). Algunas de estas especies de microalgas no presentan pared celular, como es el caso de *Dunaliella* que esta únicamente cubierta por el plasmalema (Klut et al., 1983) o tienen paredes celulares glicoproteicas, como *Euglena* y *Chlamydomonas* (Carrère et al., 2015; Passos y Ferrer, 2015).

Las distintas especies de microalgas presentan no solo variabilidad en su composición, sino también en el tipo de pared celular. Las características de la pared celular afectan de manera significativa la producción de biogás en el proceso de digestión. Esta gran variabilidad de producción de CH<sub>4</sub> a partir de diferentes especies de microalgas refleja la importancia que tiene la especie de microalga empleada en el proceso de digestión anaerobia.

#### 4.2.3. Digestión anaerobia de la biomasa de microalgas: producción potencial de biometano

La biomasa fresca de microalgas de *C. vulgaris* fue analizada para la producción de CH<sub>4</sub> en ensayo en modo discontinuo (BMP). En estas condiciones, la producción de CH<sub>4</sub> obtenida fue de 139 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup> (Artículo 1, Figura 3). El porcentaje de biodegradabilidad se calcula en función de la máxima producción de CH<sub>4</sub> que puede ser producida por 1 g de DQO, siendo esta de 350 mL de CH<sub>4</sub>. La producción de CH<sub>4</sub> de *C. vulgaris* sin pretratar corresponde a un 39% de biodegradabilidad. Este valor es semejante a los obtenidos por otros autores para este tipo de biomasa sin haber sido sometida a ningún tipo de pretratamiento (Ras et al., 2011). Esta baja producción de CH<sub>4</sub> confirma la dificultad de digerir este tipo de biomasa por la presencia de una compleja pared celular que reduce la disponibilidad de la materia orgánica y, en consecuencia, su utilización por las bacterias anaerobias.

#### 4. Discusión

---

La producción de CH<sub>4</sub> obtenida a partir de la biomasa de *C. vulgaris* sin pretratar cultivada en agua residual fue superior a la obtenida a partir de biomasa cultivada en medio sintético, con una biodegradabilidad del 52% (185 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup>). Este incremento indica que las condiciones de cultivo pueden variar significativamente la producción de CH<sub>4</sub> en el proceso de digestión anaerobia. Más concretamente, al ser cultivada en agua residual con limitación en fuente de N, el contenido proteico de *C. vulgaris* fue inferior al habitualmente encontrado en esta microalga, incrementando a su vez el contenido en lípidos (24%). Los lípidos son la macromolécula con mayor rendimiento específico de CH<sub>4</sub> (Angelidaki y Sanders, 2004), lo que explicaría el incremento en la producción de CH<sub>4</sub> observada. González-Fernández et al. (2016) emplearon biomasa de *C. vulgaris* cultivada en agua residual empleando distintos fotoperiodos. En su estudio, observaron un aumento de la fracción lipídica y de carbohidratos, obteniendo biodegradabilidades superiores (47%) a la habitualmente encontrada para esta microalga (39%). Otra explicación a esta diferencia en la producción es la variación, no solo en la composición macromolecular de la microalga, sino también de la composición de su pared celular. Existen referencias en la literatura de que el empleo de medios de cultivo con bajo contenido en N (van Donk et al., 1997) o una baja irradiación (van Donk y Hessen, 1995), pueden provocar cambios en la composición de las paredes de microalgas. En este contexto, el análisis del contenido en carbohidratos y proteínas de la pared celular podría ser relevante para entender la variación en el rendimiento de CH<sub>4</sub> observado.

La realización de ensayos de digestión anaerobia en modo de alimentación en continuo o semi-continuo son de gran importancia, ya que en estos ensayos se pueden identificar diversos factores que afectan el proceso, tales como la posible acumulación de metabolitos intermedios, exceso o limitación de sustrato, etc. Estos factores que afectan la digestión anaerobia, ya sea favoreciendo o inhibiendo el proceso, no se pueden evaluar en modo discontinuo. Los estudios relacionados con la digestión anaerobia de microalgas en modo semi-continuo son escasos y su análisis es, por tanto, fundamental para la correcta optimización del proceso de digestión de esta biomasa.

En los ensayos realizados en esta Tesis, se alimentó un reactor CSTR con *C. vulgaris*, empleando un TRH de 15 días a una VCO de 1,5 g DQO ·L<sup>-1</sup> ·dia<sup>-1</sup>. Bajo estas condiciones se obtuvieron producciones de 85 mL CH<sub>4</sub> ·g DQO in<sup>-1</sup> (159 mL CH<sub>4</sub>

#### 4. Discusión

---

·g SVin<sup>-1</sup>) (Artículo 5, Tabla 1). En el reactor BMP alimentado con la biomasa sin tratar se obtuvo 260 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>. (Artículo 3, Figura 3). En base a la composición macromolecular de la biomasa de *C. vulgaris*, se puede calcular una producción potencial de CH<sub>4</sub> teórica (Tabla 1.1) alcanzable y que sería aproximadamente de 500 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>. Los valores obtenidos en el reactor CSTR y los de BPM fueron muy inferiores. Una vez más, queda reflejada la resistencia ofrecida por este sustrato frente a la degradación anaerobia. A pesar de haber obtenido producciones de CH<sub>4</sub> inferiores a las teóricamente alcanzables, la producción en el reactor CSTR fue inferior al BMP. Las diferencias entre los reactores en discontinuo y en semi-continuo pueden ser debidas a diversas causas. Se puede dar una acumulación de sustrato o de productos intermedios que son metabolizados más lentamente por las poblaciones anaerobias en comparación con el flujo de entrada del sustrato. Esto no sería posible de evaluar en un BMP, ya que en un reactor en discontinuo solo existe una única adición de sustrato mientras en continuo, la constante adición puede resultar en menores biodegradabilidades. Ante estas situaciones es necesario adecuar y optimizar los parámetros operacionales (TRH, VCO) a cada tipo de sustrato empleado.

Mahdy et al. (2016) emplearon biomasa de *C. vulgaris* cultivada en agua residual para alimentar un reactor CSTR con un TRH de 20 días. Los resultados obtenidos en este reactor evidencian producciones de CH<sub>4</sub> inferiores a 25 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup>. Estas bajas producciones fueron atribuidas, no solo a la propia resistencia presentada por la pared celular de esta microalga, sino también a la formación de flóculos de biomasa producidos durante el cultivo, los cuales dificultarían el acceso de las bacterias anaerobias a la materia orgánica. González-Fernández et al. (2013) emplearon biomasa de *Scenedesmus* sp. como sustrato para la producción de CH<sub>4</sub> en reactores CSTR operados en semi-continuo. En este estudio, se obtuvo una producción de CH<sub>4</sub> de 33 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup> (TRH=15 días; VCO= 1 g DQO ·L<sup>-1</sup> ·día<sup>-1</sup>). Kinnunen et al. (2014) obtuvieron producciones de 180 mL CH<sub>4</sub> ·g VSin<sup>-1</sup> para una mezcla de microalgas de *Pediastrum* sp., *Micractinium* sp. y *Scenedesmus* sp, empleando un TRH de 14-15 días y VCO de 1 g SV ·L<sup>-1</sup> ·día<sup>-1</sup>. En este último estudio la producción de CH<sub>4</sub> es ligeramente superior a la obtenida con biomasa de *C. vulgaris*, si bien hay que tener en cuenta que las diferentes especies de microalgas empleadas podrían ser responsables de estas diferencias. Passos y Ferrer, (2015) emplearon biomasa de *Oocystis* sp. con una VCO de 0,7 g SV ·L<sup>-1</sup> ·día<sup>-1</sup> y un TRH de 20 días, obteniendo una producción de CH<sub>4</sub> de 80 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup> y una eliminación de DQO y SV de

#### 4. Discusión

---

alrededor del 30%. Estos valores concuerdan con los presentados en otros estudios, en los que se obtuvo una eliminación de DQO del 33% empleando TRH 16 días y VCO de  $1 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  durante la digestión anaerobia (Ras et al., 2011). De forma similar a los reactores anteriormente evaluados, el CSTR alimentado con *C. vulgaris* fresca (operado durante el desarrollo de esta Tesis) resultó en una eliminación de materia orgánica total del 36% de DQO y 32% de SV, remarcando una vez más la dificultad de degradación que presenta esta biomasa.

Dado que la biomasa de microalgas tiene un alto contenido proteico, se analizó la influencia de la baja relación de C/N sobre la producción de  $\text{CH}_4$  en los reactores semi-continuos. La degradación de proteínas conduce a una acumulación de  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  (Ward et al., 2014), que puede resultar en la inhibición del proceso de digestión anaerobia (Yenigün y Demirel, 2013). Durante la operación de CSTR alimentado con *C. vulgaris*, se determinó una mineralización de nitrógeno del 52%, es decir, nitrógeno orgánico convertido en  $\text{NH}_4^+$ , y una concentración de  $\text{NH}_4^+$  de  $828,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  en el efluente del digestor. Teniendo en consideración que el pH promedio durante la digestión fue de 7,2, se calculó la concentración de  $\text{NH}_3$  en el reactor ( $13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Esta concentración está sensiblemente por debajo del rango inhibitorio. Más concretamente, la literatura científica indica que las concentraciones inhibitorias para  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_3$  son de  $1500\text{-}1700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectivamente (Koster y Lettinga, 1984; Mc Carty y McKinney, 1961). Ras et al. (2011) emplearon biomasa de *C. vulgaris* fresca como sustrato en el proceso de digestión anaerobia a un TRH de 16 días y VCO de  $1 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ . Observaron una mineralización de N del 19%, que aumento a 68% al incrementar el TRH a 28 días. Los resultados obtenidos en esta Tesis del porcentaje de mineralización con biomasa fresca de *C. vulgaris* son mayores de los esperados teniendo en cuenta el estudio de Ras et al. (2011). Sin embargo, se asemejan a la mineralización obtenida por estos autores empleando un TRH más alto. Esta diferencia podría deberse a la menor VCO aplicada en comparación con la empleada en esta Tesis ( $1,5 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ). Además, uno de los efectos de la inhibición por nitrógeno de las bacterias metanogénicas es la acumulación en el reactor de AGVs (Stamatelatou et al., 2011), compuestos que tampoco se detectaron en los efluentes anaerobios de los CSTR realizados en esta Tesis.

Los resultados utilizando biomasa de microalgas (*C. vulgaris*) cultivada en diferentes medios en la producción de biogás en discontinuo (BMP) fueron distintos

#### 4. Discusión

---

atendiendo al tipo de cultivo, mostrando mayor biodegradabilidad la biomasa cultivada en agua residual (52%) en comparación con el medio sintético (39%). Este hecho se atribuyó a un mayor contenido en lípidos de esta biomasa y a posibles diferencias en la estructura de la pared. En la digestión anaerobia en modo semi-continuo, la producción de  $\text{CH}_4$  disminuyó ( $85 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$ ) en comparación con el BMP ( $139 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$ ).

Como conclusión, se puede remarcar que el empleo de microalgas como sustrato para la digestión anaerobia tiene grandes posibilidades atendiendo a su potencial metanogénico teórico y su fácil cultivo como sustrato. Sin embargo, la presencia de la pared dificulta de modo considerable su uso ya que no es fácilmente degradable por las bacterias hidrolíticas. Para superar este problema, es importante considerar el empleo de pretratamientos que provoquen la ruptura o solubilización de estas paredes. De este modo, el uso de biomasa pretratada permitiría aumentar la biodegradabilidad de esta biomasa e incrementar la producción de  $\text{CH}_4$ .

### 4.3. Producción de metano a partir de biomasa pretratada

#### 4.3.1. Pretratamientos termoquímicos

Como se mencionó anteriormente, la pared celular es una de las principales barreras para la eficiente biotransformación de la biomasa de microalgas en productos de valor añadido y biocombustibles. En este contexto, la aplicación de un pretratamiento que rompa o debilite la pared celular, produciendo un incremento de la materia orgánica en la fracción soluble puede mejorar sensiblemente los rendimientos del proceso de producción de biocombustibles en términos de productividad y rendimientos finales. La realización de un pretratamiento para hidrolizar/solubilizar la materia orgánica y hacer la biomasa más accesible a los biocatalizadores o microorganismos que la van a transformar es un proceso comúnmente utilizado en los procesos de obtención de biocombustibles y bioproductos a partir de biomasa algal.

Para evaluar el efecto de los distintos pretratamientos estudiados en esta Tesis sobre la solubilización de la materia orgánica de microalgas, se utilizaron diversos parámetros como la solubilización de carbohidratos, proteínas y DQO, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ solubilización} = \frac{(fMOs - iMOs)}{(iMOt - iMOs)} * 100 \quad (1)$$

Dónde: *MO* indica la materia orgánica presente, ya sea expresada en términos de componentes macromoleculares (proteínas o carbohidratos) o DQO; *iMOt* se refiere a la materia orgánica total inicial; *iMOs*, es la materia orgánica inicial en el soluble; y *fMOs*, es la materia orgánica soluble final, es decir tras la aplicación del pretratamiento evaluado.

Los pretratamientos empleados sobre la biomasa de *C. vulgaris* tuvieron un efecto variable sobre la solubilización de carbohidratos (Artículo 1, Figura 1.A). Más concretamente, cuando se utilizaron pretratamientos térmicos a 120 °C durante 20 y 40 minutos, se solubilizaron entre un 55-60% de los carbohidratos. Sin embargo, se pudo comprobar que la solubilización de carbohidratos producida por los tratamientos termoquímicos ácidos fue mayor. El tratamiento ácido a 120 °C durante 40 minutos, aumentó el contenido de carbohidratos en la fracción soluble hasta 7 veces (90%

#### 4. Discusión

---

solubilización). La solubilización observada al emplear condiciones alcalinas no fue relevante, a excepción de los casos en que se combinó con tratamiento térmico. De estos resultados puede concluirse que la acción combinada de la temperatura y un catalizador ácido fue el pretratamiento más efectivo para provocar la ruptura de la pared celular de la microalga, permitiendo una mayor solubilización de la materia orgánica en términos de carbohidratos. Sin embargo, a pesar de haber obtenido mayores solubilizaciones, el empleo de pretratamientos ácidos afecta la digestión anaerobia, reduciendo la producción de biogás como se comentará a continuación.

En relación a la solubilización de proteínas, no se obtuvieron diferencias significativas con los distintos pretratamientos empleados en comparación con la biomasa inicial, a excepción del caso en que se empleó la combinación de tratamiento térmico con álcali. En estas condiciones se observó un aumento de proteínas de 1,9 veces con respecto al inicial, correspondiente a un 40% de solubilización (Artículo 1, Figura 1.B). Cho et al. (2013) realizaron ensayos comparativos del efecto de diferentes pretratamientos sobre una mezcla de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. En su estudio, tras la aplicación de un pretratamiento alcalino a pH 13, observaron un incremento de la materia orgánica soluble de 4,2 mayor que la registrada en la biomasa sin tratar, correspondiente a un 20% de solubilización. Sin embargo, este estudio evalúa la solubilización en base a DQO. Las bajas solubilizaciones obtenidas por estos autores tras los tratamientos empleados pueden ser atribuidas a glicosilación no enzimática de proteínas (reacciones de Maillard), por las cuales se produce la repolimerización de aminoácidos y azúcares reductores (Bougrier et al., 2008). Estas reacciones están altamente influenciadas por factores tales como la elevada temperatura y pH (Bougrier et al., 2008).

Para evaluar el efecto del pretratamiento sobre la producción de CH<sub>4</sub>, se realizaron ensayos en batch de digestión anaerobia utilizando como sustrato la biomasa algal pretratada en las diferentes condiciones y biomasa fresca como muestra control. Este tipo de ensayos nos permiten establecer la producción de CH<sub>4</sub> y, por tanto, la biodegradabilidad anaerobia de un sustrato específico. Tras el primer set de pretratamientos termoquímicos (ácidos y alcalinos a 120 °C) (Artículo 1, Figura 3), las producciones de CH<sub>4</sub> obtenidas fueron superiores (63-65% y 68% a 120 °C combinado con ácido y álcali, respectivamente) a las obtenidas con la biomasa sin tratar, a excepción de los pretratamientos basados únicamente en la adición de ácido o álcali,

#### 4. Discusión

---

en los cuales se obtuvo incluso menor biodegradabilidad (32% y 34%, respectivamente). Cho et al. (2013) observaron un aumento en la solubilización de materia orgánica tras un pretratamiento alcalino sobre una mezcla de biomasa de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Sin embargo, obtuvieron producciones de CH<sub>4</sub> inferiores a las obtenidas a partir de la biomasa sin tratar, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio con este tipo de pretratamiento. Este hecho hace suponer que, a pesar de haber aumentado la fracción soluble, estos pretratamientos generan compuestos que causan la inhibición de los microorganismos anaerobios.

En los ensayos de digestión anaerobia utilizando biomasa pretratada con catalizadores ácidos y alcalinos combinados con temperatura (120 °C), los tiempos de reacción empleados (20 ó 40 min) para ambos tipos de pretratamientos no influyeron de forma relevante en la producción de CH<sub>4</sub>, variando en un rango de 63-68% de biodegradabilidad anaerobia (termo-ácido y termo-alcalino, respectivamente). Sin embargo, cuando la biomasa de microalgas fue tratada térmicamente, sin ningún tipo de aditivo químico, el tiempo de pretratamiento tuvo un efecto notable en la producción de CH<sub>4</sub>. Más concretamente, en los experimentos de 40 minutos de tratamiento la producción fue 1,9 veces superior con respecto a la biomasa no tratada. Teniendo en consideración que la solubilización de la materia orgánica en estos pretratamientos térmicos fue menor que la obtenida en los tratamientos termoquímicos, se puede concluir que la adición de estos químicos podría estar ejerciendo una inhibición de la digestión anaerobia por la posible formación de compuestos secundarios durante el proceso de pretratamiento. Otros estudios relacionados con la producción de biogás a partir de biomasa de microalgas pretratadas también han mostrado que no hay necesariamente una relación directamente proporcional entre los valores de solubilización de materia orgánica y la producción de CH<sub>4</sub> (Alzate et al., 2012; Cho et al., 2013; González-Fernández et al., 2013). Así, un mayor contenido en materia orgánica soluble en el sustrato tras la aplicación de un pretratamiento no implica necesariamente una mayor productividad de CH<sub>4</sub>. Contrariamente, Passos et al. (2013b) observaron una linealidad entre la solubilización obtenida tras el pretratamiento de una mezcla de *Chlorella* y *Scenedesmus* con microondas a distintas energías específicas (21,8, 43,6 y 65,4 MJ kg<sup>-1</sup> ST) y el aumento en la producción de CH<sub>4</sub>. La falta de correlación entre el aumento de la solubilización y la producción de biogás evidencian que la composición de la materia orgánica solubilizada es la que determina la producción de CH<sub>4</sub> en el proceso de digestión anaerobia. Cada tipo de

pretratamiento afecta de manera diferente a la estructura celular de las microalgas, de forma que la materia orgánica liberada tiene distinta composición, y por tanto, también lo es la producción de CH<sub>4</sub>.

#### 4.3.2. Pretratamientos térmicos

##### 4.3.2.1. Efecto sobre la solubilización de materia orgánica

El efecto del tratamiento térmico sobre la pared celular depende de la especie de microalga y de la temperatura empleada. La exposición a temperaturas por debajo de 60 °C puede promover mecanismos de autohidrólisis como consecuencia de la liberación de enzimas hidrolíticas al medio que se produce como respuesta biológica del microorganismo (Carvajal et al., 2013; Mahdy et al., 2014b). Mahdy et al. (2014a), utilizando pretratamientos térmicos a 50 °C durante 24-48h, observaron un aumento en la solubilización de carbohidratos del 10-15% en *Chlorella* sp. y del 30% en *Scenedesmus* sp. sin que se produjera rotura de la pared celular. Esta solubilización fue atribuida a la liberación de exopolímeros y no a material intracelular liberado. El efecto producido por temperaturas superiores, en el rango de 70-100 °C, aunque es específico de la especie, resulta en una rotura o desestabilización de la pared celular, incluso pudiendo formar poros en su superficie. González-Fernández et al. (2012a) observaron que, tras el tratamiento a 70 o 90 °C durante 3 h sobre biomasa de *Scenedesmus obliquus*, se obtuvo un aumento de 4 y 4,4 veces respectivamente, en el contenido de material soluble, con respecto a la biomasa sin tratar. El análisis de microscopia de fluorescencia con tinción verde Sytox reveló daño sobre la superficie celular de la biomasa tratada a 90 °C. Este colorante penetra en las células a través de la pared dañada incorporándose a los ácidos nucleicos, de modo que la ruptura celular permite su penetración, pudiendo observarse de este modo la desestructuración de la pared celular. Mediante esta técnica, se observó que el pretratamiento a 90 °C había causado daños en las células, mientras que a 70 °C no se observó tinción aunque la solubilización de materia orgánica a ambas temperaturas fue muy similar. *Scenedesmus* se caracteriza por poseer una pared muy robusta dada la gran resistencia que le confiere la presencia de polímeros como la “esporopolenina”. Otros estudios utilizando como sustrato una mezcla compuesta principalmente por

#### 4. Discusión

---

*Chlamydomonas* y *Nitzschia*, y tras un tratamiento de 75-95 °C durante 10 h, obtuvieron incrementos de solubilización de la materia orgánica únicamente del 20% (Passos et al., 2013a). Algunos autores han obtenido altas producciones de CH<sub>4</sub> utilizando biomasa de *Chlamydomonas* sin pretratar (Mahdy et al., 2014a; Mussnug et al., 2010). Estos resultados demuestran la gran biodegradabilidad de esta especie. Por tanto, la baja solubilización obtenida por Passos et al. (2013a) podría deberse a la presencia de *Nitzschia* en el cultivo, ya que esta especie es una diatomea y su pared celular contiene sílice como componente estructural (Sumper y Brunner, 2006) lo que le confiere una gran resistencia. Los distintos resultados de solubilización de materia orgánica producidos por el pretratamiento térmico obtenidos por los diferentes autores se atribuyen a la diferente composición que presentan las paredes celulares de estos microorganismos. En los pretratamientos térmicos a temperaturas superiores de 100 °C, además del efecto térmico, existen otros efectos adicionales a la temperatura, ya que a estas temperaturas se produce un aumento de presión en el reactor (Passos et al., 2014) que también contribuye a la rotura de la pared celular. En los experimentos realizados en esta Tesis, el pretratamiento térmico empleado corresponde a este grupo, ya que se ha empleado temperaturas de 120, 140, 160 y 180 °C.

Los resultados de solubilización de compuestos macromoleculares en *C. vulgaris* tras los pretratamientos térmicos empleados fueron variables (Artículo 1, Figura 1.A). Más concretamente, al emplear pretratamientos térmicos a 120 °C durante 20 y 40 minutos, se logró un incremento de la solubilización de carbohidratos, en la fase soluble de 4 y 4,5 veces con respecto a la biomasa sin tratar, lo cual se correspondió con un 55-60% de solubilización. Para determinar si un aumento de temperatura se correspondería con mayores porcentajes de solubilización de carbohidratos, se aumentó el rango de temperatura a 140, 160 y 180 °C durante 10 y 20 min (Artículo 2, Figura 1). En este caso, la solubilización aumentó paralelamente al aumento de temperatura, observándose solubilizaciones de 42%, 54% y 69% para 140, 160 y 180 °C, respectivamente. Así mismo se observó, que tiempo de reacción empleado, no tenían un efecto remarcable.

En relación a la solubilización de proteínas, los pretratamientos a 120 °C no mostraron diferencias significativas en el contenido de proteína soluble en comparación con la biomasa sin pretratar (Artículo 1, Figura 1B). Sin embargo, durante el empleo de pretratamientos a temperaturas superiores a 140 °C, se observó un

#### 4. Discusión

---

aumento de la solubilización del 12% que aumentó hasta el 45% cuando la temperatura se incrementó hasta 160 y 180 °C (Artículo 2, Figura 1). Cho et al. (2013) obtuvieron resultados de solubilización similares tras un pretratamiento térmico a 120 °C durante 30 minutos de biomasa de microalgas. Estos autores obtuvieron un incremento del material orgánico soluble (en base a DQO) de 5,5 veces utilizando una mezcla de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Passos y Ferrer, (2015) utilizaron biomasa de *Oocystis* sp., y observaron un incremento en la solubilización de materia orgánica del 15% (SV) tras la aplicación de un pretratamiento térmico a 130 °C durante 15 minutos. En este estudio la temperatura y no el tiempo de reacción fue la variable más importante para el aumento de solubilización de la materia orgánica, ya que al aumentar el tiempo de reacción de 15 a 30 minutos no aumentó la solubilización. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestros ensayos. En un estudio más reciente, Wang et al. (2017) emplearon *Chlorella* sp. cultivada en digestato rico en nitrógeno y pretratada a 121 °C durante 18 minutos para la producción de biogás. La solubilización obtenida tras el pretratamiento fue del 15% en DQO, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos en esta Tesis, en los cuales se obtuvo una solubilización del 18 % en DQO a 120 °C 40 minutos. Desafortunadamente, en el estudio de Wang et al. (2017) no se detalla la composición macromolecular obtenida en la biomasa tras las condiciones de cultivo empleadas así como su solubilización tras el pretratamiento.

Como conclusión, nuestros resultados muestran que la solubilización producida por los pretratamientos térmicos sobre la biomasa de *C. vulgaris* fue similar o inferior (en el caso de las proteínas) a las observadas en los pretratamientos termoquímicos. El aumento del contenido de carbohidratos en la fracción soluble producida por el pretratamiento térmico fue proporcional al aumento de la temperatura. Sin embargo, la producción de CH<sub>4</sub> fue similar a la obtenida empleando biomasa pretratada a 120 °C 40 minutos (sección 4.3.2.2). En base a estos resultados, y con el objetivo de reducir el coste energético del pretratamiento, se seleccionaron estas condiciones de pretratamiento para los estudios posteriores.

En un intento de estimar si las mejoras en la producción de CH<sub>4</sub> obtenidas con la biomasa pretratada justificaban el coste energético adicional que supone el pretratamiento, se llevó a cabo un estudio para evaluar los requerimientos energéticos del pretratamiento térmico que se discutirán en el siguiente apartado (4.3.2.2). Para

#### 4. Discusión

---

este estudio se emplearon los resultados obtenidos en el BMP utilizando biomasa con pretratada térmicamente a 120 °C durante 40 minutos. El análisis demostró que el pretratamiento podría tener un balance energético positivo (Artículo 1, sección 3.2.2) si se realizaba a altas cargas de biomasa (Mendez et al., 2013; Passos et al., 2013b). Por este motivo, se realizó un nuevo ensayo para valorar el efecto del pretratamiento sobre biomasa concentrada (Artículo 3). Se realizaron pretratamientos a diferentes concentraciones (16, 32, 65 y 130 g ST ·L<sup>-1</sup>) y los resultados mostraron que la solubilización de carbohidratos era mayor a las concentraciones de biomasa más altas. Más concretamente, el aumento de carga resultó en una solubilización del 60% en el caso de la carga más concentrada (130 g ST ·L<sup>-1</sup>) siendo del 39% en la más diluida (16 g ST ·L<sup>-1</sup>) (Artículo 3, Figura 1). Los resultados obtenidos para la carga más diluida se corresponden con las solubilizaciones de carbohidratos observadas en los ensayos anteriores con pretratamiento térmico a 120 °C durante 40 minutos. El incremento de la solubilización observado a mayores cargas de biomasa (32, 65 y 130 g ST ·L<sup>-1</sup>) muestran la efectividad del pretratamiento. Esta diferente solubilización podría deberse a la interacción de una fracción de los carbohidratos solubilizados con otros productos solubilizados durante el pretratamiento para formar moléculas más complejas. Sin embargo, sería necesario un estudio más detallado sobre la naturaleza de la fracción solubilizada para comprender en mayor profundidad los procesos derivados del empleo de estos tratamientos.

La solubilización de proteínas no presentó un patrón similar al de los carbohidratos. El pretratamiento térmico a 120°C no produjo efecto sobre la solubilización de proteínas independientemente de la concentración de biomasa empleada. En el pretratamiento térmico pueden darse procesos de desnaturalización de las proteínas debido a la desorganización y a la destrucción de las interacciones hidrofílicas y puentes de hidrógeno localizados en la superficie proteica, de forma que el interior hidrófobo interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada. De este modo, una precipitación de la fracción proteica solubilizada durante el pretratamiento no quedaría reflejada en el análisis de la fracción soluble realizado.

Paralelamente a este estudio, y como comparativa, se analizó el efecto de este pretratamiento sobre la biomasa de *Scenedesmus* sp. (Artículo 3, Figura 1). En este caso, la solubilización de carbohidratos presentó una tendencia similar a la

observada en *C. vulgaris*, de forma que aumentaba paralelamente al incremento en la concentración de biomasa. De igual modo que en *C. vulgaris*, el empleo del pretratamiento no ejerció un efecto remarcable sobre la solubilización de proteínas. Sarat Chandra et al. (2014) observaron un incremento en la solubilización del TOC (Carbono orgánico total) con el aumento de la concentración de la biomasa (1 a 5 g SV ·L<sup>-1</sup>) al emplear pretratamiento térmico a 100, 120 y 150 °C durante 20, 40 y 60 minutos sobre biomasa de *Scenedesmus dimorphus* tras extracción lipídica. Al igual que la solubilización de carbohidratos observada en este estudio, el aumento de concentración de sustrato durante el pretratamiento supuso un aumento en el porcentaje de solubilización.

De los resultados obtenidos del estudio de pretratamiento de la biomasa de la microalga *C. vulgaris*, puede concluirse que la solubilización de carbohidratos y proteínas aumenta notablemente al emplear pretratamientos termoquímicos. Sin embargo, son los pretratamientos térmicos (a 120 °C, 40 minutos) los que, a pesar de producir menores solubilizaciones de materia orgánica, incrementan la producción de CH<sub>4</sub> en la digestión anaerobia. Además, en el caso de esta microalga, el pretratamiento térmico sigue siendo igual de efectivo en la solubilización de la materia orgánica cuando se realiza a altas concentraciones de biomasa.

#### **4.3.2.2. Producción de metano en BMP y digestor CSTR de biomasa pretratada térmicamente**

Como se ha explicado anteriormente, la pared de las microalgas dificulta en gran medida la accesibilidad de las bacterias anaerobias a la materia orgánica de las microalgas, y es necesario realizar un pretratamiento para aumentar la solubilización de esta. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto que este pretratamiento ejerce sobre el proceso de digestión anaerobia y, por lo tanto, en la producción de biogás. En los ensayos en BMP (en discontinuo), con los sustratos pretratados térmicamente en presencia de catalizadores ácidos o básicos, como se mencionó anteriormente, la mayor solubilización de biomasa no se correspondió con una mayor producción de CH<sub>4</sub>. Sin embargo, cuando la biomasa de microalgas fue sometida únicamente a la acción de la temperatura, y según el tiempo de reacción empleado, las diferencias en la producción de CH<sub>4</sub> fueron notables. Para la biomasa pretratada térmicamente durante 40 minutos, la generación de biogás en BMP fue considerablemente superior

#### 4. Discusión

---

al obtenido con la biomasa no tratada ( $267.7 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$ ;  $477 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$ ) incrementándose 1,9 veces. Estos resultados son superiores a los obtenidos a mayor temperatura y se corresponde con una biodegradabilidad del 76%. Por el contrario, cuando el pretratamiento se realizó durante 20 minutos, la producción de  $\text{CH}_4$  obtenida en BMP fue menor, siendo de  $180 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$ , lo cual equivaldría al 51% de biodegradabilidad. Otros estudios también muestran producciones de  $\text{CH}_4$  superiores tras la exposición de la biomasa a un pretratamiento térmico. Passos y Ferrer (2015) observaron incrementos en la biodegradabilidad de la microalga *Oocystis* sp. tras una exposición a  $130 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. En estas condiciones alcanzó una producción de  $\text{CH}_4$  de  $170 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$  ( $113 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$ ), siendo un 39% mayor que la obtenida con la biomasa sin pretratar. La producción de  $\text{CH}_4$  obtenido por estos autores es sustancialmente inferior a la obtenida en el presente estudio, probablemente por la diferente especie de microalga empleada. Además, estos autores refieren una mayor resistencia de las microalgas a la degradación debida a que se cultivaron en agua residual, dando lugar a la formación de flóculos. Cho et al. (2013) emplearon una mezcla de 70% de *Chlorella* sp. y 30% de *Scenedesmus* sp. pretratada térmicamente a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  30 minutos y obtuvieron una producción de  $\text{CH}_4$  de  $405 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g SV}^{-1}$ , lo cual se corresponde con las producciones obtenidas en esta Tesis ( $477 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$ ) (Artículo 1, Figura 3). Estos investigadores también observaron que el incremento en la producción de  $\text{CH}_4$  no estaba directamente relacionado con la solubilización. Aunque la solubilización de DQO durante el pretratamiento térmico fue inferior a la obtenida en el resto de los pretratamientos evaluados por estos autores, la producción de biogás fue superior con la biomasa pretratada térmicamente. Este hecho también ha sido destacado en otros estudios (Alzate et al., 2012; González-Fernández et al., 2012b, 2012c). De este modo, cabe concluir que el pretratamiento térmico empleado, a pesar de no ser tan eficiente en la solubilización de la materia orgánica de microalgas como otros pretratamientos, es el que muestra los mejores resultados de producción de  $\text{CH}_4$ , ya que además de aumentar la accesibilidad de la materia orgánica al ataque de las bacterias, no se generan compuestos secundarios que inhiban la digestión anaerobia en los procesos en discontinuo (BMP).

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de aumentar la producción de  $\text{CH}_4$  mediante el aumento de la temperatura de pretratamiento, se realizaron pretratamientos térmicos a  $140$ ,  $160$  y  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ . No se observaron diferencias relevantes

#### 4. Discusión

---

en la biodegradabilidad de la biomasa con el tiempo de reacción empleados (Artículo 2, Tabla 1) siendo estos de 10 y 20 minutos. En este caso, la producción de CH<sub>4</sub> fue notablemente superior a la obtenida con la biomasa sin tratar, incrementándola entre 1,4-1,6 veces, correspondiendo a un 64% de biodegradabilidad en el caso del pretratamiento a 160 °C frente a 44% de la biomasa fresca (Artículo 2, Tabla 1; Figura 3). Este pretratamiento fue el que produjo mejores producciones de CH<sub>4</sub>. Sin embargo, no se observó mejora con respecto al pretratamiento térmico a 120 °C durante 40 minutos en términos de producción de CH<sub>4</sub>, hecho por el cual se establecieron estas últimas condiciones como el pretratamiento más efectivo y rentable en comparación con la producción de CH<sub>4</sub> obtenida empleando temperaturas superiores.

Una vez seleccionado el pretratamiento con mejores rendimientos, se procedió a evaluar la producción de CH<sub>4</sub> utilizando biomasa de *C. vulgaris* pretratada a alta concentración de biomasa (32, 65 y 130 g ST ·L<sup>-1</sup>) empleando como control 16 g ST ·L<sup>-1</sup>. No se observó disminución en la producción de biogás (Artículo 2, Figura 3), y las diferencias entre las diferentes cargas de sustrato empleadas no fueron remarcables. Sin embargo, a pesar de haber obtenido mayores solubilizaciones de carbohidratos en los pretratamientos a mayor concentración de biomasa (Artículo 3, Figura 1), la producción de CH<sub>4</sub> no se vio afectada, probando de nuevo que la producción de CH<sub>4</sub> no está directamente relacionada con la solubilización de materia orgánica durante el pretratamiento. Se concluye que el incremento en la concentración de biomasa en el pretratamiento no afectó negativamente la generación de biogás. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la influencia del coste del pretratamiento sobre el coste final del CH<sub>4</sub> producido por digestión anaerobia puede reducirse ya que el coste está muy influenciado por la cantidad de sustrato empleado (Ec 3, Artículo 1). De acuerdo con esta ecuación, el empleo de mayor carga de biomasa implicaría una mayor producción de CH<sub>4</sub>, traduciéndose en mayor producción energética en comparación con la obtenida a partir de menores concentraciones de biomasa. Esta mayor producción compensaría el coste energético del pretratamiento resultando, por tanto, en un balance energético positivo.

Como se ha comentado anteriormente (sección 4.2.3), es importante evaluar el comportamiento de un sustrato de la digestión anaerobia en semi-continuo para identificar factores que pudieran resultar en inhibición del proceso. En este contexto, la digestión anaerobia de la biomasa de microalgas pretratadas a 120 °C durante 40

#### 4. Discusión

---

minutos fue evaluada como sustrato en un reactor CSTR. La producción de CH<sub>4</sub> se comparó con la obtenida en las mismas condiciones de alimentación con biomasa sin tratar (Artículo 5, Tabla 1). Como ya ocurrió en los ensayos en discontinuo (BMP) (Artículo 2, Figura 3), los rendimientos en CH<sub>4</sub> en los CSTR alimentados con biomasa pretratada fueron superiores. Este hecho se debe a la mayor accesibilidad de la microbiota anaerobia del reactor a la materia orgánica de la biomasa algal pretratada. En este caso, se obtuvo un incremento de 1,5 veces la producción de CH<sub>4</sub> en el reactor alimentado con biomasa pretratada (126 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup>) con respecto a un reactor alimentado con biomasa fresca (Artículo 5, Tabla 1). Sin embargo, estas producciones, al igual que en el caso del reactor CSTR de biomasa sin pretratar, fueron sustancialmente inferiores a las obtenidas en BMP, el que se obtuvo el doble de producción de CH<sub>4</sub>. El descenso de la producción de CH<sub>4</sub> obtenida en modo de alimentación en semi-continuo pueden deberse a procesos de inhibición en el reactor CSTR por la acumulación de compuestos tóxicos. Passos y Ferrer (2015) utilizando en un CSTR alimentado con biomasa de *Oocystis* sp. pretratada a 130 °C 15 minutos a una carga orgánica de 0,7 g SV ·L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> y un TRH de 20 días, obtuvieron una producción de CH<sub>4</sub> de 170 mL CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup> (110 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup>). Schwede et al. (2013), empleando *Nannochloropsis salina*, pretratada a 120 °C durante 2 h, aumentaron la producción de CH<sub>4</sub> de 0,13 a 0,27 L CH<sub>4</sub> ·g SVin<sup>-1</sup>. González-Fernández et al. (2013) empleando menores temperaturas de pretratamiento (*Scenedesmus* sp. pretratada a 90 °C durante 15 minutos) lograron una producción de 96,9 mL CH<sub>4</sub> ·g tDQO in<sup>-1</sup> para una VCO de 1 kg DQO ·m<sup>-3</sup>·dia<sup>-1</sup>, y 111,4 mL CH<sub>4</sub> ·g tDQO in<sup>-1</sup> para una VCO de 2,5 kg DQO ·m<sup>-3</sup>·dia<sup>-1</sup>. Estas producciones de CH<sub>4</sub> fueron 2,9 veces y 3,4 veces superiores a las obtenidas con la biomasa sin tratar. Estos resultados muestran la efectividad del pretratamiento empleado para incrementar la producción de biogás. Sin embargo, los distintos valores obtenidos se deben a las distintas especies empleadas en los distintos estudios, dado que la mayor o menor efectividad del pretratamiento es especie-dependiente, influenciando la posterior producción de biogás.

El análisis de la materia orgánica total del reactor alimentado con biomasa pretratada reveló eliminaciones del 50% DQO y 41% SV. Este es un porcentaje ligeramente superior al contenido en materia orgánica soluble presente en el caudal de entrada, indicando por tanto que el material particulado resultante del pretratamiento tiene una composición más fácilmente degradable por los microorganismos anaerobios

#### 4. Discusión

---

que las microalgas intactas (Artículo 4, Figura 1). Passos y Ferrer, (2015) observaron una eliminación de SV del 40% en el reactor alimentado con biomasa pretratada. En cuanto a la materia orgánica soluble, más de un 90% de la DQO soluble introducida en el reactor alimentado con biomasa pretratada fue eliminado (Artículo 4, 1).

En el proceso de digestión anaerobia, la relación C/N es de suma importancia para el correcto funcionamiento del digestor, como se indicó en la sección 4.2.1. Debido al alto contenido proteico de las microalgas, esta biomasa tiene una baja relación C/N. Esta característica puede resultar perjudicial para el proceso de digestión anaerobia puesto que puede derivar en acumulación de productos secundarios nitrogenados que afectan a la estabilidad del proceso, y por tanto, resulta de particular relevancia su análisis. El porcentaje de mineralización de nitrógeno obtenido en el reactor alimentado con biomasa pretratada (78%) fue mayor que el de biomasa sin pretratar (52%). De este modo, a pesar de no aumentar notablemente la solubilización proteica, el pretratamiento mejoró la mineralización de nitrógeno durante la digestión. Sin embargo, cabe destacar en este punto que una alta mineralización puede suponer una disminución de la producción de  $\text{CH}_4$ , ya que una concentración elevada de  $\text{NH}_4^+$  puede resultar inhibitoria para las poblaciones bacterianas (tal y como se ha descrito en la sección 1.2.2). Así mismo, el  $\text{NH}_3$  es un compuesto altamente inhibitorio incluso a concentraciones menores que la de  $\text{NH}_4^+$ . El equilibrio  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  puede desplazarse hacia una u otra forma en función del pH y la temperatura del reactor. El pH medido a lo largo del proceso de digestión anaerobia se situó alrededor de 7,2. El digestor alimentado con biomasa pretratada presentó una concentración de  $1141 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$  y  $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$ . La concentración de  $\text{NH}_4^+$  que los microorganismos metanógenos pueden tolerar varía entre  $1500\text{-}1700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Koster y Lettinga, 1984), mientras que las concentraciones tolerables para el  $\text{NH}_3$  son incluso menores, produciéndose inhibición total a concentraciones de  $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Mc Carty y McKinney, 1961). Diversos estudios han demostrado que estos rangos pueden variar dependiendo de la aclimatación del inóculo empleado en la digestión, pudiendo aumentar los valores de TAN (*total ammonia nitrogen*,  $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ) hasta rangos de  $5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , siendo las concentraciones de FAN (*free ammonia nitrogen*,  $\text{NH}_3$ ) las que más limitan la producción de  $\text{CH}_4$  (Yenigün y Demirel, 2013). En el caso concreto de los digestores empleados en esta Tesis, no se observó inhibición por altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NH}_3$ . Los valores registrados en los efluentes ( $1141 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_3$ , respectivamente) estuvieron siempre por debajo de los valores inhibitorios. Mahdy et

#### 4. Discusión

---

al. (2015a) emplearon biomasa de *C. vulgaris* pretratada enzimáticamente con proteasas, para alimentar un reactor CSTR. Estos autores observaron una clara inhibición de las poblaciones anaerobias debida a las elevadas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  producida por la degradación de proteínas durante el pretratamiento ( $1896 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Así, a pesar de tener una mineralización de nitrógeno similar a la obtenida en este estudio (77%), la alta concentración de  $\text{NH}_4^+$  en el influente del reactor resultó en la inhibición del proceso de digestión. El que se produzca en el reactor una alta mineralización de nitrógeno es un factor importante, no solo porque se evitan los posibles efectos negativos que una alta concentración de  $\text{NH}_4^+$  pueda producir sobre los microorganismos anaerobios, sino también porque efluentes ricos en nutrientes pueden ser empleados como medio de cultivo para las microalgas (Ramos-Suárez y Carreras, 2014).

Puesto que uno de los efectos más obvios de la inhibición del proceso de digestión anaerobia es la acumulación de productos intermedios como son los AGVs (Angelidaki y Ahring, 1993; González-Fernández y García-Encina, 2009), se analizó el contenido en AGV en el efluente del reactor con el objetivo de establecer si existía inhibición de los microorganismos metanogénicos. No se observó acumulación de los mismos y, por lo tanto, se concluyó que no existían fenómenos de inhibición causados por los AGVs que afectaran la producción de biogás.

Para identificar potenciales inhibiciones en un reactor se evalúan normalmente parámetros físico-químicos como los utilizados anteriormente. Sin embargo, otra manera para evaluar si existen procesos de inhibición es la identificación de las poblaciones microbianas dentro del reactor con el fin de determinar si algún tipo de bacteria ha sido inhibida. Dado que los parámetros físico-químicos no fueron determinantes en la identificación del factor causante de la baja producción de  $\text{CH}_4$ , se realizaron análisis para la determinación de la microbiota presente en el reactor.

### 4.4. Microbioma anaerobio

El análisis de las comunidades bacterianas se llevó a cabo en los reactores alimentados con biomasa pretratada térmicamente y biomasa fresca de *Chlorella vulgaris*. Dado que no se detectó presencia de inhibidores típicos en el reactor, se realizó este análisis para elucidar la causa de la baja producción de CH<sub>4</sub>. La evaluación de las poblaciones se realizó mediante técnicas genéticas de pirosecuenciación. Desafortunadamente, una elevada proporción de las secuencias obtenidas fueron adscritas a microorganismos no cultivables, dificultando el análisis en profundidad de las relaciones metabólicas entre las distintas poblaciones presentes en el fango.

A pesar de ello, a partir de las secuencias en las que se pudo llegar al nivel de género, se determinó la variedad microbiológica en los CSTR (Artículo 5, Tabla 3). Se observó que, aun habiendo predominancia de anaerobios, la proporción de microorganismos aerobios encontrado en el CSTR alimentado con biomasa fresca fue superior (44%) al del CSTR alimentado con biomasa pretratada (22%) y al del inóculo (15%). A partir de estos resultados se puede inferir, que la biomasa de *C. vulgaris* sin pretratar, que mantiene la pared celular intacta, es menos accesible al ataque de las bacterias hidrolíticas, provocando una disminución de la población de bacterias fermentadoras. También se observó una elevada proporción de microorganismos proteolíticos (55%) en comparación con sacarolíticos (11%) en el reactor alimentado con biomasa pretratada. El porcentaje de microorganismos proteolíticos también fue mayor comparado con los observados en el inóculo inicial (18%) y el reactor alimentado con biomasa sin tratar (26%). Este dato concuerda con el tipo de sustrato empleado, rico en proteínas, y la mejor accesibilidad en la biomasa pretratada.

En cuanto a la identificación de los microorganismos, los filos más abundantes fueron los mismos en el inóculo inicial y en ambos reactores, pero variando su proporción. Los grupos bacterianos más abundantes identificados en el inóculo inicial, el CSTR alimentado con biomasa fresca y el CSTR alimentado con biomasa pretratada fueron *Proteobacteria* (13%, 50% y 6%), *Bacteroidetes* (12%, 19% y 22%), *Chloroflexi* (23%, 9% y 25%) y *Firmicutes* (9%, 8% y 12%), respectivamente.

En el inóculo inicial los filos más representados fueron *Chloroflexi*, (fam. *Anaerolineaceae*); *Proteobacteria* para (*Alfa-* y *Gammaproteobacteria*) con fam.

#### 4. Discusión

---

*Rhodobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Syntrophaceae* y *Helicobacteraceae*); *Bacteroidetes* (clase *Bacteroidia*, fam. *Rikenellaceae* y *Porphyromonadaceae*, clase *Sphingobacteriia*, fam. ST-12K33); *Firmicutes* (clase *Clostridia*, fam. *Ruminococcaceae*, *Christensenellaceae* y *Peptostreptococcaceae*); *Spirochaetes* (fam. *Spirochaetales Incertae Sedis* y *Spirochaetaceae*) y *Actinobacteria* (fam. *Propionibacteriaceae* e *Intrasporangiaceae*).

En el reactor alimentado con biomasa sin pretratar, el filo *Proteobacteria* fue el mayoritario, representado en un 37% por el grupo *Alfaproteobacteria* (familias *Shinella*, *Rhizobiaceae*, *Comamonadaceae*, *Rhodocyclaceae* (*Betaproteobacteria*) y *Pseudomonadaceae* (*Gammaproteobacteria*). *Shinella*, a pesar de ser un género comúnmente encontrado en reactores aerobios, también se ha aislado en reactores UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket) (An et al., 2006). Esta bacteria podría estar involucrada en la degradación de compuestos recalcitrantes presentes en la pared de *C. vulgaris* ya que se ha encontrado en reactores que degradaban materiales como ensilado de pasto y materiales lignocelulósicos (H. Wang et al., 2010; Yan et al., 2012). Por el contrario, en el CSTR con biomasa pretratada, las *Alfaproteobacteria* solo representaron un 6% de la población microbiana, apareciendo representantes de las familias *Campylobacteraceae*, *Syntrophaceae* y *Comamonadaceae*.

El filo *Bacteroidetes*, se encontró en ambos reactores en proporciones similares. Las especies pertenecientes a la clase *Bacteroidia* son estrictamente anaerobios, y de forma mayoritaria, degradan proteínas. La mayoría de los grupos estaban formados por bacterias no cultivables, lo cual dificulta el esclarecimiento de la función metabólica de estos microorganismos en los reactores.

El filo *Chloroflexi* estuvo ampliamente representado en todos los reactores analizados (22,6% en el inóculo, 9,1% en el CSTR con microalga fresca y 25%, en el CSTR con microalga pretratada), formados en su mayoría por los géneros *Leptolinea*, *Anaerolinea* y *Longilinea*, también encontrados en otros reactores anaerobios (Yamada et al., 2006, 2007). *Anaerolineae*, microorganismos anaerobios estrictos cuyos principales productos de fermentación son acetato, lactato y H<sub>2</sub>. ha sido descrito frecuentemente en reactores anaerobios.

En el filo *Firmicutes*, prácticamente la totalidad de las secuencias pertenecieron al orden *Clostridiales*, constituido por anaerobios obligados. La mayoría

#### 4. Discusión

---

de las secuencias pertenecieron a especies no cultivables o que no pudieron identificarse más allá del nivel género e incluso familia, por lo que de nuevo imposibilita conocer la función metabólica específica. En general, el género *Clostridium* y similares llevan a cabo la hidrólisis de compuestos macromoleculares y la fermentación de subproductos, aunque algunos géneros son capaces de metabolizar carbohidratos o proteínas. Las familias *Ruminococcaceae*, *Peptostreptococcaceae* y *Christensenellaceae* solo se detectaron en el inóculo, siendo los dos primeros frecuentemente localizados en ambientes anaerobios (Cardinali-Rezende et al., 2016; Tang et al., 2015).

Finalmente cabe remarcar que un alto número de las secuencias analizadas tenían similitud de secuencia relativamente baja con especies cultivadas, lo que hace difícil establecer el papel funcional de los taxones identificados. Es por ello que se debe realizar un esfuerzo en la investigación para obtener la determinación de los microorganismos aún no cultivados y que aparecen de forma frecuente en este tipo de reactores. Este conocimiento de las poblaciones microbianas implicadas sería de gran ayuda para la optimización de los sistemas de digestión anaerobia alimentados con microalgas.

### 4.5. Microorganismos alternativos a las microalgas para la producción de biogás: Cianobacterias

Como se ha discutido anteriormente, el uso de microalgas para la producción de biogás implica el empleo de pretratamientos que rompan la pared celular para aumentar la solubilización de partículas más complejas y mejorar el acceso de los microorganismos anaerobios al material intracelular. Sin embargo, este proceso implica costes adicionales ya que supone añadir una etapa de pretratamiento al proceso. El empleo de cianobacterias como sustrato para la producción de biogás implicaría la eliminación de esta etapa de pretratamiento, puesto que estos microorganismos tienen paredes celulares más lábiles y, por tanto, podrían ser sustratos más accesibles a los microorganismos anaerobios. El empleo de cianobacterias para la producción de biogás, así como su uso para la eliminación de contaminantes en aguas residuales, ha sido poco estudiado y la literatura científica disponible es, por tanto, muy limitada. En esta Tesis, se realizó un análisis comparativo del crecimiento de varias especies de cianobacterias (*Aphanizomenon ovalisporum*, *Synechocystis* sp, *Anabaena planctonica* y *Borzia trilocularis*) y se compararon con la microalga *Chlorella vulgaris*. *C. vulgaris* se utilizó como microorganismo modelo dada su facilidad de cultivo en agua residuales para evaluar el comportamiento de las cianobacterias.

#### 4.5.1. Cultivo y productividad

Los diferentes microorganismos fotosintéticos empleados fueron cultivados en medio sintético y agua residual urbana. El empleo de aguas residuales como medio de cultivo es muy importante para hacer económicamente viable la producción de biomasa microalga. Mediante la combinación del proceso de depuración de agua y la producción de un biocombustible como el biogás es posible reducir los costes de ambos procesos facilitando la comercialización de estas tecnologías. El empleo de medio sintético asegura una completa disponibilidad de nutrientes para los microorganismos cultivados. Sin embargo, el empleo de aguas residuales implica que algunos de los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos no estén disponibles, o estén presentes en concentraciones inferiores a

#### 4. Discusión

---

las establecidas como óptimas para el crecimiento. La composición del medio, junto con el empleo de distintas condiciones de cultivo como la temperatura, influye en el crecimiento así como en la composición bioquímica de los microorganismos fotosintéticos.

Las cianobacterias seleccionadas fueron crecidas en modo batch empleando medio de cultivo sintético (BG-11) en condiciones de iluminación constante a 25 °C. Para el cultivo en agua residual, se utilizaron las especies que tuvieron mejores producciones en medio sintético. Los cultivos realizados utilizando agua residual se llevaron a cabo a diferentes temperaturas (22, 27, 32 °C) en modo batch, mientras que en el cultivo semi-continuo se utilizó la temperatura óptima seleccionada en base a los resultados obtenidos en los cultivos en discontinuo.

En los experimentos realizados en medio sintético, el valor  $\mu_{\max}$  en la microalga ( $1,2 \text{ día}^{-1}$ ; Artículo 6, Figura 1A) fue considerablemente mayor al obtenido por cualquiera de las especies de cianobacterias, cuyos máximos fueron de  $0,5\text{-}0,6 \text{ día}^{-1}$  en el caso de *A. planctonica*, *A. ovalisporum* y *Synechocystis* sp, respectivamente, y  $0,4 \text{ día}^{-1}$  para la cianobacteria *B. trilocularis* (Artículo 6, Figura 1B). Las tasas de crecimiento obtenidas son similares a las obtenidas en otros estudios en los que se ha evaluado el cultivo de distintas especies de cianobacterias (Lürling et al., 2013).

Las productividades obtenidas por las cianobacterias presentaron un patrón diferente al encontrado en *C. vulgaris* ( $0,5 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ), siendo de  $0,12 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  para *A. planctonica*, *B. trilocularis*, y  $0,1 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  para *A. ovalisporum* (Artículo 6, Figura 2B). En estas especies el crecimiento fue constante desde los primeros días, y se mantuvo en fase exponencial durante todo el tiempo de cultivo (13-15 días). Sin embargo, *Synechocystis* sp., al igual que *Chlorella* presentaron una fase de crecimiento exponencial seguida de una fase estacionaria, por lo que la productividad fue mayor al inicio del cultivo. Resulta complicado establecer una comparativa con la literatura existente puesto que cada estudio se ha realizado en condiciones de cultivo distintas (configuraciones de los fotobiorreactores empleados, intensidad lumínica aplicada, etc.), y estos factores afectan significativamente al crecimiento. En este sentido, la investigación realizada en esta Tesis ofrece resultados comparativos del crecimiento de cianobacterias y *C. vulgaris* cultivadas en las mismas

#### 4. Discusión

---

condiciones de iluminación constante (2,5 klux), agitación por burbujeo y una temperatura de 25 °C.

Se realizó el análisis de la distribución macromolecular de la biomasa recogida tras el cultivo. *C. vulgaris* presentó una composición de carbohidratos y proteínas de 25% y 68%, respectivamente. Este perfil con un elevado contenido en proteínas, es característico de esta especie de microalga (sección 4.1.2). Las cianobacterias *Synechocystis* sp. y *B. trilocularis* mostraron composiciones similares con un contenido en la fracción proteica del 64% y un contenido en carbohidratos de entre 26 y 30%. Por el contrario, *A. ovalisporum* y *A. planctonica* exhibieron composiciones proteicas menores (38%), aumentando la fracción de carbohidratos (42 y 63%, respectivamente). La composición macromolecular de las cianobacterias es variable dependiendo de la especie. Por ejemplo, *Arthrospira máxima* y *A. platensis* presentan composiciones de 10-16% de carbohidratos y 62-72% en proteínas (Bohutskyi y Bouwer, 2013), mientras que otras cianobacterias como algunas pertenecientes al género *Anabaena* pueden acumular carbohidratos (40%) (Moussa, 2012).

Con objeto de evaluar el proceso global de producción de biomasa y de biogás, se analizó la producción de CH<sub>4</sub> obtenida a partir de cada microorganismo teniendo en cuenta la biomasa obtenida durante el cultivo. Estos resultados se expresan como mL CH<sub>4</sub> ·L<sup>-1</sup> de cultivo y se discutirán en mayor detalle en el siguiente apartado (sección 4.5.2). Los resultados obtenidos concluyeron que las mejores especies de cianobacterias en base a su producción de biomasa y CH<sub>4</sub> eran *A. ovalisporum* y *A. planctonica*. Estos fueron los microorganismos empleados para la evaluación del cultivo en agua residual y el análisis posterior de su potencial metanogénico.

En cuanto al cultivo en aguas residuales, se investigó la influencia de distintas temperaturas (22, 27 y 32 °C) sobre *C. vulgaris* y las cianobacterias seleccionadas. En los ensayos de *C. vulgaris* no se observó ningún efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la concentración de biomasa final. Contrariamente, en el caso de las cianobacterias, el crecimiento se vio afectado por la temperatura (Artículo 7, Figura 1). La velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) obtenida por *A. ovalisporum* fue de 0,43 y 0,53 dia<sup>-1</sup> a 22 y 27 °C, respectivamente, mientras que *A. planctonica*

#### 4. Discusión

---

presentó  $0,47 \text{ día}^{-1}$  a  $32 \text{ °C}$ . Las  $\mu_{\text{max}}$  correspondientes a menores temperaturas ( $22$  y  $27 \text{ °C}$ ) para *A. planctonica* fueron de  $0,38 \text{ día}^{-1}$ . Sin embargo, a pesar de presentar la menor  $\mu_{\text{max}}$ , fue en estas temperaturas donde se obtuvo mayor concentración de biomasa al finalizar el cultivo ( $1,6 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ ). A pesar de la mayor velocidad específica presentada por *A. ovalisporum* a  $22$  y  $27 \text{ °C}$ , la concentración de biomasa final a los 11 días del cultivo fue similar a la de *A. planctonica*. En esta especie aunque no se observó fase estacionaria, la velocidad de crecimiento en fase exponencial disminuyó tras los dos primeros días de cultivo. Otros autores, utilizando cultivos de cianobacterias del mismo género que las utilizadas en este estudio obtuvieron tasas de crecimiento mayores, siendo de  $0,93 \text{ día}^{-1}$  para *Anabaena* sp. y  $0,87 \text{ día}^{-1}$  para *Aphanizomenon gracile* a  $25$  y  $32,5 \text{ °C}$ , respectivamente (Lürling et al., 2013). No obstante, hay que remarcar que estos estudios fueron realizados en condiciones de cultivo en medio sintético. Conviene señalar que los valores obtenidos en los cultivos de cianobacterias crecidas en aguas residuales son inferiores a los observados previamente en los cultivos con medio sintético ( $0,6 \text{ día}^{-1}$ ) (Artículo 6, Figura 1.B). La ausencia o disponibilidad de nutrientes afecta notablemente a la tasa fotosintética y, por tanto, al crecimiento de los microorganismos, así como a su composición celular (Jiang et al., 2012). Las concentraciones de biomasa más altas en este estudio fueron obtenidas al emplear las temperaturas de cultivo más bajas. Estos resultados no concuerdan con los de estudios que indican que las cianobacterias crecen mejor a altas temperaturas (Jöhnk et al., 2008). Es el caso de los “blooms” de cianobacterias producidos en lagos, ríos, etc, al aumentar la temperatura ambiental.

Dados los resultados obtenidos en los cultivos realizados en modo discontinuo a distintas temperaturas, el cultivo en condiciones de operación semi-continuo se realizó a  $22 \text{ °C}$  con un TRH de 3 días (Artículo 7, Figura 3). *C. vulgaris* presentó una concentración de biomasa estable a lo largo del cultivo con un promedio de  $0,42 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ . En el caso de *A. ovalisporum*, la concentración de biomasa se mantuvo estable a  $0,58 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ , mientras que *A. planctonica* mostró un aumento en su concentración hasta el octavo día, en el cuál alcanzó su máxima concentración ( $0,71 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Ramos Tercero et al. (2014) emplearon *Chlorella protothecoides* cultivada en agua residual, y obtuvieron concentraciones similares aplicando un THR de 1.26 días. Puesto que todavía había nutrientes disponibles en el medio, observaron que al incrementar el TRH, la concentración de biomasa aumentaba. En el estudio desarrollado en esta Tesis, a pesar de emplear un TRH más alto (3 días) que el

#### 4. Discusión

---

empleado por Ramos Tercero et al. (2014) (1,3 días), la concentración de biomasa fue similar ( $0,47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ DW}$ ). El TRH empleado durante el cultivo de cianobacterias fue establecido en base a la eliminación de nutrientes observada en los cultivos en batch, en los cuales no se detectaron estos compuestos tras 3 días de cultivo. De este modo, cabe sugerir que se podría conseguir un incremento de la concentración celular de estos cultivos reduciendo las eliminaciones no biológicas (volatilización, precipitación) de los nutrientes mediante un mayor control del cultivo, como se comentará más adelante.

El crecimiento de microorganismos fotosintéticos (*C. vulgaris* y cianobacterias) en agua residual también se evaluó en términos de eliminación de nutrientes ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ). En los cultivos en batch, el amonio contenido en el agua fue eliminado totalmente a los 4 días. Los pH de los cultivos inoculados con cianobacterias oscilaron entre 8,6 y 10,8. El cálculo de la conversión de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NH}_3$  reveló que un 95% del  $\text{NH}_4^+$  había sido eliminado vía *stripping* en el segundo día de cultivo (pH=10,8) para *A. ovalisporum* y *A. planctonica* a 32 °C. Esta eliminación fue ligeramente menor en los cultivos operados a menores temperaturas (70-80% en *A. planctonica* y 66-39% en *A. ovalisporum*, a 22 y 27 °C, respectivamente). Para *C. vulgaris*, la volatilización de este compuesto a 27 y 32 °C fue del 61 y 44% (pH=9,5 y 9). Estas pérdidas por *stripping* suponen una disminución de la concentración de nitrógeno disponible para los microorganismos, lo que se traduce en una menor asimilación. Renuka et al. (2013) emplearon agua residual para el crecimiento en discontinuo de un consorcio de cianobacterias (*Phormidium* sp. *Limnothrix* sp. *Anabaena* sp. *Westiellopsis* sp. y *Fischerella* sp.) en condiciones de temperatura ambientales ( $17\pm 2$ – $36\pm 3$  °C noche/día). En su estudio observaron una eliminación de N- $\text{NH}_4^+$  del 76% a las 6 h, llegando al 100% a los 10 días de cultivo. A pesar de alcanzar valores de pH de 10,2 al segundo día de cultivo, las mayores eliminaciones (80-85%) se produjeron durante las primeras 6 h, en las que el pH se mantuvo a 8,5, por lo que las pérdidas por volatilización fueron mínimas. Cabe señalar que la mejor asimilación de nitrógeno observada en el estudio de Renuka et al. (2013) podría deberse al empleo de un consorcio de distintas cianobacterias, al contrario que en el caso de esta Tesis en que se empleó un monocultivo. La mayor eficiencia de los consorcios, en comparación con organismos puros, ha sido demostrada en varios estudios en los que los consorcios muestran mejor supervivencia, producción de biomasa y eliminación de nutrientes (Silva-Benavides y Torzillo, 2012). En las

#### 4. Discusión

---

poblaciones mixtas, una asimilación menor por parte de un grupo de microorganismos puede ser compensada por otras especies presentes en el consorcio.

En el cultivo de biomasa en semi-continuo a 22 °C (Artículo 7, Figura 4), se observó un rápido descenso de la concentración de amonio en los 4 primeros días de cultivo, más concretamente una eliminación del 92% para *C. vulgaris*, del 95% para *A. ovalisporum* y del 93% para *A. planctonica*. A partir del cuarto día de cultivo se observó un ligero incremento en la concentración de amonio que fue atribuido a un descenso en la concentración de biomasa. Estos resultados sugieren que parte de las células muertas podrían estar liberando materia orgánica al cultivo, incrementando ligeramente el contenido de nitrógeno en el medio. Contrariamente, en el cultivo de *A. planctonica* no se observó aumento de amonio a lo largo de todo el periodo de cultivo, lo que indicaría que el cultivo no alcanzó la fase de muerte celular (Artículo 7, Figura 3). Al igual que en los cultivos en batch, la evaluación de las pérdidas de nitrógeno vía *stripping* debido a los altos pH alcanzados durante el cultivo ( $10,1 \pm 0,8$ ,  $9,3 \pm 0,4$  y  $10,8 \pm 0,2$ ) fueron del 74, 47 y 95% para *C. vulgaris*, *A. ovalisporum* y *A. planctonica*, respectivamente. Una vez más, los altos pH alcanzados causaron una baja disponibilidad de nitrógeno asimilable. Un control del pH durante el cultivo evitaría pérdidas de los nutrientes disponibles en el medio lo que podría conducir a un mayor crecimiento de la biomasa debido a la mayor disponibilidad de nitrógeno (Park y Craggs, 2010).

En relación a la asimilación de  $\text{PO}_4^{3-}$ , se produjo una eliminación total de este compuesto a los 3 días de cultivo en batch para *A. planctonica*, mientras que tardó 4 días en el caso de *A. ovalisporum* y *C. vulgaris*. En los cultivos en semi-continuo, en ninguno de los casos se llegó a eliminar completamente el  $\text{PO}_4^{3-}$ , alcanzando valores de eliminación de 94, 84 y 69% en los cultivos de *C. vulgaris*, *A. planctonica* y *A. ovalisporum*, respectivamente. Otros estudios de cultivo de cianobacterias en aguas residuales mostraron eliminaciones de 97% P- $\text{PO}_4^{3-}$  (Renuka et al., 2013). Los diferentes porcentajes de eliminación observados pueden ser debidos a las diferentes especies empleadas. Además, se ha demostrado que la concentración de N en el medio de cultivo afecta a la asimilación del P. Beuckels et al. (2015) observaron que en las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, la asimilación de P era mayor cuando se empleaban concentraciones de N en el medio  $40\text{-}50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , disminuyendo por debajo de  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de N. De este modo, dados los resultados

#### 4. Discusión

---

obtenidos en esta Tesis respecto a los porcentajes de eliminación del  $\text{PO}_4^{3-}$  se podría pensar que la pérdida de  $\text{NH}_4^+$  por volatilización pudo influir en una menor asimilación del  $\text{PO}_4^{3-}$ ,

La caracterización macromolecular de la biomasa cultivada en agua residual en batch muestra un contenido en carbohidratos en el rango 36-46 % (SST) para *A. ovalisporum* y 40-48 % (SST) para *A. planctonica* (Artículo 7, Figura 2). En ningún caso se vio relación entre la temperatura empleada en los diferentes cultivos y el contenido en carbohidratos. Se pudo observar que el contenido en carbohidratos experimentó un descenso en comparación con el obtenido durante el cultivo en medio sintético (42 y 63% para *A. ovalisporum* y *A. planctonica*, respectivamente), siendo más pronunciado en *A. ovalisporum* a 22 °C (36%) y en *A. planctonica* a 27 °C (40%). Estos resultados fueron distintos a los obtenidos con *C. vulgaris*, en los que el contenido en carbohidratos fue del 38% cuando se utilizó agua residual como medio de cultivo, mientras que en medio sintético el contenido en carbohidratos fue un 23% ST (sección 4.1.2).

El cultivo de microorganismos fotosintéticos en medios con baja concentración en nitrógeno, como es el caso del agua residual urbana, puede afectar el metabolismo de las microalgas y producir un aumento en la producción de carbohidratos y lípidos, disminuyendo el contenido proteico (Pancha et al., 2014). Sin embargo, este aumento del contenido en carbohidratos no se ha observado en el caso de las cianobacterias utilizadas en este trabajo (Artículo 7, Figura 2). Durante el cultivo en semi-continuo utilizando agua residual (Artículo 7, Tabla 1), se observó un ligero descenso de contenido de carbohidratos con respecto al cultivo en batch. Al igual que en el caso de la microalga *C. vulgaris*, la prevalencia de la fracción proteica se asoció a una mayor disponibilidad de nitrógeno en el medio, dado que se suplementaba el cultivo con medio fresco diariamente.

Con respecto a las proteínas, al igual que en el caso de los carbohidratos, no se observaron diferencias con la temperatura en el cultivo en batch en aguas residuales (Artículo 7, Figura 2). El contenido en proteínas fue inferior al obtenido en medio sintético (38% para *A. ovalisporum* y *A. planctonica*) para todos los microorganismos empleados, siendo estas de 19-23% para *A. ovalisporum* y 17-19% en el cultivo de *A. planctonica*. Este hecho también fue observado en el caso de la

microalga, con un contenido del 13-18%, mientras que en medio sintético presentó en torno al 58% de proteínas. La disminución del contenido en proteínas con respecto a la biomasa crecida en medio sintético corrobora la importante función desempeñada por el nitrógeno en la distribución macromolecular de los microorganismos fotosintéticos. Este hecho también fue observado en el caso de la microalga, con un contenido del 13-18%, mientras que en medio sintético presentó en torno al 58% de proteínas. Este menor contenido en proteínas con respecto a la biomasa crecida en medio sintético corrobora la importante función desempeñada por el nitrógeno en la distribución macromolecular de los microorganismos fotosintéticos. Este hecho, junto al aumento de lípidos en cultivos con baja concentración de nitrógeno, ha sido observado por otros autores (Illman et al., 2000; Pancha et al., 2014). La baja concentración en nitrógeno del agua residual ( $90,3 \pm 20,1 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ ) promovió el aumento de lípidos en detrimento de la fracción proteica. *A. ovalisporum* mostró un contenido en lípidos de 22-32% y *A. planctónica* del 28-32%. En el cultivo en semi-continuo en agua residual se observó un contenido en proteínas superior (37 y 31% STT para *A. ovalisporum* y *A. planctónica*) a los encontrados en la biomasa cultivada en batch, para ambas cianobacterias. Como se ha comentado previamente, la adición de medio fresco diario durante la operación del reactor en modo semi-continuo, y por consiguiente de nitrógeno disponible, podría ser el responsable del ligero incremento de la fracción proteica. De este modo, la adición de medio fresco en el modo de operación semi-continuo condujo a un mayor porcentaje de compuestos nitrogenados intracelulares frente a los cultivos en modo batch. Este hecho ha sido observado con anterioridad empleando *Scenedesmus obliquus* cultivada en agua residual (Ruiz et al., 2013).

#### 4.5.2. Digestión anaerobia: análisis de la producción potencial de biometano

La producción de  $\text{CH}_4$  a partir de biomasa de cianobacterias se realizó utilizando como sustrato la biomasa obtenida en los distintos tipos de cultivos ensayados, tanto en medio sintético como en agua residual urbana. En el cultivo realizado en medio sintético (Artículo 6, Figura 3), la biomasa de cianobacterias sin ningún tipo de pretratamiento, mostró biodegradabilidades de 50% en el caso de *B. trilocularis* ( $168 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$ ;  $255 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$ ) y *A. planctónica* ( $187 \text{ mL}$

#### 4. Discusión

---

$\text{CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$ ; 284 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$ ) y del 64% para *A. ovalisporum* (223 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$ ; 288 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$ ) y *Synechocystis* sp. (220 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g DQOin}^{-1}$ ; 380 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$ ). Estos valores son significativamente superiores a los encontradas con la biomasa de *C. vulgaris* sin pretratar (en torno al 36%). Además, estas cianobacterias presentaron productividades metanogénicas superiores durante los primeros días de digestión (2,3 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{dia}^{-1}$ ) a la obtenida con *C. vulgaris* (1,5 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{dia}^{-1}$ ). Este hecho indica que las cianobacterias no necesitan de pretratamiento previo a la digestión anaerobia, al contrario que *C. vulgaris*. Las características estructurales de la pared de ambos tipos de microorganismos parecen ser las responsables de estas diferencias. *C. vulgaris* posee una pared celular formada por compuestos poliméricos que hacen de ella una barrera altamente resistente a la degradación (Takeda, 1996). Las cianobacterias son más fácilmente digeribles y, por lo tanto, la producción de  $\text{CH}_4$  fue mayor al emplear estos microorganismos como sustrato que al emplear la microalga modelo *C. vulgaris*. Desafortunadamente, no existen muchos estudios de digestión anaerobia de cianobacterias. Samson y Leduy (1982) emplearon la cianobacteria *Arthrospira máxima* para la producción de biogás en continuo, utilizando TRH de 33 días y VCO de 0,97 g SV  $\cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ . Estos autores obtuvieron una producción de  $\text{CH}_4$  de 0,26 L  $\text{CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$ . Más recientemente, Aramrueang et al. (2016) obtuvieron producciones de 0,37 L  $\text{CH}_4 \cdot \text{g SVin}^{-1}$  al digerir *Spirulina platensis* en digestores en batch a 35 °C. Este resultado fue incluso superior a las producciones obtenidas en este estudio (Artículo 6, Tabla 3), quedando reflejada la facilidad de algunas cianobacterias a ser digeridas sin necesidad de establecer un pretratamiento.

A pesar de haber obtenido mayor biodegradabilidad en los ensayos anaerobios empleando biomasa de cianobacterias como sustrato, la utilización de estos microorganismos fotosintéticos como sustrato para la digestión anaerobia es cuestionada por sus bajas tasas de crecimiento de en comparación con las microalgas (Blair et al., 2014; Bouterfas et al., 2002). Con objeto de establecer la viabilidad de las cianobacterias como sustrato para la digestión anaerobia, analizando también la fase de crecimiento, se expresó la producción de  $\text{CH}_4$  por litro de cultivo. Las cianobacterias con mejores resultados fueron *A. ovalisporum* y *A. planctonica*. Con ambas especies fue posible obtener 520-600 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$  cultivo, mientras que con la microalga *C. vulgaris* se obtuvo 483 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$  cultivo (Artículo 6, Tabla 3). Estos valores confirman que, a pesar de que las cianobacterias presentan menores tasas de crecimiento en

#### 4. Discusión

---

medio sintético, este puede ser compensado por el incremento en la producción de CH<sub>4</sub>. En principio, la generación de biogás a partir de microorganismos fotosintéticos debe realizarse en combinación con procesos que impliquen la disminución de los costes de producción de dicha biomasa como es el tratamiento de agua residual urbana. De este modo, el acoplamiento de la producción de biogás y el proceso de biorremediación de aguas residuales a partir de microalgas generaría un doble beneficio medioambiental y energético (Olguín, 2012; Sturm y Lamer, 2011).

Dados los prometedores resultados de potencial metanogénico obtenidos en los cultivos en medio sintético se evaluó la capacidad de estas especies para crecer en agua residual. Con este objetivo se realizaron estudios de producción de biogás en modo discontinuo (BMP) utilizando como sustrato la biomasa de *C. vulgaris* y de cianobacterias cultivadas en aguas residuales en modo semi-continuo (Artículo 7, Figura 5). En los ensayos con *C. vulgaris*, la producción de CH<sub>4</sub> cultivada en aguas residuales (184 mL CH<sub>4</sub> ·g DQO in<sup>-1</sup>) fue mayor que la obtenida con la biomasa cultivada en medio sintético (126 mL CH<sub>4</sub> ·g DQO in<sup>-1</sup>), correspondiendo a un 52% de biodegradabilidad. Esos resultados fueron superiores a los esperados, ya que la biodegradabilidad de esta microalga sin pretratar suele ser inferior al 40% (Mendez et al., 2013; Wang y Park, 2015). Este hecho, podría deberse al mayor contenido en lípidos de esta biomasa (promovido por el crecimiento en agua residual con baja disponibilidad de N), ya que los lípidos tienen mayor potencial metanogénico que las proteínas y los carbohidratos (Tabla 1.1) En el caso de las cianobacterias, se obtuvieron biodegradabilidades (62% para *A. ovalisporum* y 74% para *A. planctonica*) más altas que la obtenida con la microalga *C. vulgaris*. Durante los primeros días de digestión, correspondientes a la etapa de hidrólisis, la producción de CH<sub>4</sub> con las cianobacterias fue mayor que la de la microalga (*Chlorella vulgaris*). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en ensayos anteriores y reafirma la teoría de que las paredes celulares de las cianobacterias resultan más fácilmente degradables.

Los pocos datos existentes en la literatura sobre digestión anaerobia de cianobacterias se centran en la digestión de *Spirulina* sp. Markou et al. (2013) empleando *Arthrospira platensis* con diferente contenido en carbohidratos a distintos TRH, obtuvieron producciones de 123-203 mL CH<sub>4</sub> ·g DQO in<sup>-1</sup>. En su estudio comprobaron que las mayores producciones de biogás se obtenían al emplear la biomasa con mayor contenido en carbohidratos. En nuestro estudio, dado el menor

#### 4. Discusión

---

contenido en carbohidratos de la biomasa cultivada en agua residual con respecto a la biomasa cultivada en medio sintético, no se puede establecer una relación directa entre el contenido en carbohidratos y la producción de CH<sub>4</sub>. Sin embargo, en el caso de *A. planctónica*, las producciones de CH<sub>4</sub> fueron iguales o superiores a las obtenidas con la biomasa cultivada en medio sintético (Artículo 6, Tabla 2; Artículo 7, Figura 5). A pesar de la disminución del contenido en carbohidratos y proteínas, el aumento del contenido en lípidos en *A. planctónica* (11% agua residual vs 1-3% medio sintético) podría ser el responsable del incremento en la producción de CH<sub>4</sub> (240 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup> en agua residual vs 199 mL CH<sub>4</sub> ·g DQOin<sup>-1</sup> en medio sintético) a los 30 días de digestión. De hecho, los lípidos son los componentes macromoleculares con mayor rendimiento específico de CH<sub>4</sub> (1,014 STP L CH<sub>4</sub> ·g SV<sup>-1</sup>) (Angelidaki y Sanders, 2004).

El crecimiento en agua residual con bajo contenido en nitrógeno favorece la acumulación de carbohidratos y/o lípidos y, por tanto, la utilización de biomasa cultivada en estas condiciones podría conducir a mejores producciones de biogás. Por ejemplo, Mahdy et al. (2016) cultivaron *C. vulgaris* en agua residual. La biomasa cultivada en estas condiciones presentó mayor contenido en carbohidratos (40% SSV) y menor contenido en proteínas (33%) que la biomasa cultivada en medio sintético (24% SSV carbohidratos y 69% SSV de proteínas). En el proceso de digestión anaerobia con un TRH de 20 días y VCO de 1,5 kg DQO ·m<sup>-3</sup>·día<sup>-1</sup> utilizando como sustrato la biomasa rica en carbohidratos pretratada enzimáticamente se obtuvo una producción de CH<sub>4</sub> de 136.9 mL CH<sub>4</sub> g DQO in<sup>-1</sup> y una concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 856 mg·L<sup>-1</sup>. En las mismas condiciones, utilizando como sustrato la biomasa algal rica en proteínas (crecida en medio sintético), se obtuvo una producción de CH<sub>4</sub> sensiblemente inferior (128 mL CH<sub>4</sub> ·g DQO in<sup>-1</sup>) y un contenido en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> superior (1895 mg·L<sup>-1</sup>). Es más, este cambio en el medio de cultivo evitó la inhibición por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> observada al emplear como sustrato *C. vulgaris* cultivada en medio sintético (Mahdy et al., 2015a).





## ***5. Conclusiones***



### 5.1. Conclusiones

- 1.- Todos los pretratamientos térmicos evaluados aumentaron la solubilización de carbohidratos y proteínas de la biomasa de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Los tratamientos térmicos aumentaron las solubilizaciones de carbohidratos al incrementar la temperatura a 160-180 °C. Los mejores resultados de solubilización se obtuvieron en los tratamientos térmicos catalizados por agentes químicos. El tratamiento termo-ácido produjo mayor solubilización de carbohidratos mientras que el termo-alcálido solubilizó preferentemente las proteínas.
- 2.- No se observó un efecto significativo de la temperatura de pretratamiento sobre, la producción de CH<sub>4</sub>, estableciéndose como óptimo el pretratamiento a 120 °C durante 40 minutos. A pesar de la mayor solubilización de materia orgánica obtenida con el pretratamiento térmico con catalizadores químicos, la producción de CH<sub>4</sub> fue inferior a la obtenida con la biomasa pretratada térmicamente sin catalizador. Estas diferencias entre la solubilización de materia orgánica y producción de CH<sub>4</sub> podrían deberse a la formación durante el pretratamiento catalizado con agentes químicos de compuestos difícilmente biodegradables. El empleo de biomasa pretratada de *Scenedesmus* sp. como sustrato resultó en menores producciones de biogás en comparación con la biomasa pretratada de *C. vulgaris*, probablemente debido a las diferentes características de la pared celular, siendo en *Scenedesmus* sp. más difícilmente degradable. Este hecho confirma la necesidad de adecuar el pretratamiento empleado a la microalga usada como sustrato en la digestión anaerobia.
- 3.- El aumento de la concentración de biomasa durante el pretratamiento térmico a 120 °C durante 40 minutos, no afectó la solubilización de materia orgánica ni la producción de CH<sub>4</sub>, lo que supone un aspecto crucial para disminuir el gasto energético del pretratamiento.
- 4.- La producción de CH<sub>4</sub> empleando biomasa pretratada térmicamente, en condiciones de operación en semi-continuo en reactores CSTR, resultó en un incremento de la producción de CH<sub>4</sub> del 50% con respecto al uso de *C. vulgaris* sin tratar. A pesar del incremento en la producción de biogás con respecto a la biomasa sin tratar, los valores obtenidos fueron comparativamente más bajos que

## 5. Conclusiones

---

los obtenidos en la digestión en modo discontinuo (BMP). Sin embargo, no se registraron niveles de  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NH}_3$  en rangos inhibitorios, ni la presencia de otros compuestos (AGVs) que puedan explicar la baja producción de biogás.

- 5.- El análisis de la población microbiana de los CSTR alimentados con *C. vulgaris* sin pretratar y pretratada térmicamente reveló una gran diversidad. En ambos ensayos predominaron los órdenes *Bacteroidales* y *Clostridiales*. En el proceso de digestión anaerobia utilizando biomasa sin pretratar las *Proteobacteria* fueron predominantes, indicando la dificultad de degradación esta biomasa. En el reactor alimentado con biomasa pretratada, las bacterias proteolíticas fueron predominantes en comparación con las sacarolíticas debido a la gran cantidad de proteínas contenida en la biomasa algal.
- 6.- Las cianobacterias cultivadas en medio sintético mostraron tasas de crecimiento un 50% inferiores a las de la microalga *C. vulgaris*. Sin embargo, su biodegradabilidad anaerobia fue significativamente mayor (50% para *B. trilocularis* y *A. planctónica*, 64% para *A. ovalisporum* y *Synechocystis* sp. y 34% para *C. vulgaris*), demostrándose que es posible obtener buenas producciones de biogás por litro de cultivo utilizando cianobacterias sin pretratar.
- 7.- El crecimiento en discontinuo de las cianobacterias y la microalga *C. vulgaris* utilizando agua residual urbana (limitación de nutrientes) fue similar en las condiciones de cultivo empleadas, demostrando que las cianobacterias pueden utilizarse como microorganismos fotosintéticos alternativos para la depuración de aguas residuales. Durante el cultivo en semi-continuo, se obtuvieron producciones ligeramente superiores para las cianobacterias en comparación con *C. vulgaris*, a pesar de que las eliminaciones de nutrientes fueron inferiores a las obtenidas en modo discontinuo. La digestión anaerobia de la biomasa de cianobacterias cultivada en estas condiciones de cultivo, no se vio limitada por la pared celular. Las producción de  $\text{CH}_4$  utilizando como sustrato *A. ovalisporum* y *A. planctonica* cultivadas en agua residual sin ningún tipo de pretratamiento fue un 20 y un 40% superior al obtenido con la biomasa de *C. vulgaris*.
- 8.- Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las cianobacterias pueden ser una alternativa a las microalgas muy prometedora para la depuración de aguas residuales, con el valor añadido de ser más accesibles al ataque

hidrolítico de las bacterias anaerobias. De este modo, se facilitaría el proceso de digestión anaerobia eliminando la costosa etapa de pretratamiento.

### 5.2. Futuras líneas de investigación

Con el objetivo de continuar la línea de investigación sobre el empleo de pretratamientos, el trabajo futuro debería enfocarse en diversos puntos:

- Profundizar en la identificación de microorganismos anaerobios de reactores alimentados con microalgas, así como evaluar su contribución metabólica, para entender los procesos biológicos producidos en el digestor, y mejorar su optimización.
- Empleo de diversas estrategias para la mejora de la producción de CH<sub>4</sub> a partir de microalgas pretratadas: modificación de los parámetros operacionales del digestor (OLR, HRT) o el empleo de co-digestión con otros sustratos.

En relación a la utilización de cianobacterias para la depuración de efluentes residuales, es necesario profundizar en mayor detalle en:

- El empleo de especies de cianobacterias que ya se cultivan con fines comerciales (como es el caso de *Spirulina* sp.) y análisis de su crecimiento en efluentes residuales para evaluar su capacidad de biorremediación.
- Optimización de los parámetros de cultivo para maximizar las tasas de crecimiento y asimilación de nitrógeno y fósforo, minimizando las pérdidas de estos elementos por procesos de stripping o precipitación.

Tras la optimización de los procesos de biorremediación de efluentes residuales empleando biomasa fotosintética (microalgas y cianobacterias) a escala laboratorio, es necesario desarrollar en un proceso integrado la recolección y procesado (pretratamiento y digestión anaerobia) de la biomasa obtenida. Esta integración debe ser escalada y optimizada para la obtención de producciones a mayor escala. Finalmente, es necesario analizar la viabilidad económica y la realización de estudios de ciclo de vida del proceso integrado.



# **Referencias**

- Abatzoglou, N., Boivin, S., 2009. A review of biogas purification processes. *Biofuels, Bioprod. Bior.* 3, 42–71.
- Abeliovich, A., Azov, Y., 1976. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 801–6.
- Afi, L., Metzger, P., Largeau, C., Connan, J., Berkaloff, C., Rousseau, B., 1996. Bacterial degradation of green microalgae: incubation of *Chlorella emersonii* and *Chlorella vulgaris* with *Pseudomonas oleovorans* and *Flavobacterium aquatile*. *Org. Geochem.* 25, 117–130.
- Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., Ahmad Asad, S., Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., et al., 2014. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *Sci. World J.* 2014, 1–21.
- Allard, B., Templier, J., 2000. Comparison of neutral lipid profile of various trilaminar outer cell wall (TLS)-containing microalgae with emphasis on algaenan occurrence. *Phytochemistry* 54, 369–380.
- Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I., 2014. Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. *Chem. Eng. J.* 243, 405–410.
- Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I., 2012. Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresour. Technol.* 123, 488–494.
- An, D.-S., Im, W.-T., Yang, H.-C., Lee, S.-T., 2006. *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 443–448.
- Andrade, M.R., Costa, J.A.V., 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture* 264, 130–134.
- Angelidaki, I., Ahring, B., 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: Effect of temperature. *Water Res.* 28, 727–731.

## Referencias

---

- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1993. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 560–564.
- Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3, 117–129.
- Anwar, N., Wang, W., Zhang, J., Li, Y., Chen, C., Liu, G., Zhang, R., 2016. Effect of sodium salt on anaerobic digestion of kitchen waste. *Water Sci. Technol.* 73, 1865–1872.
- Aramrueang, N., Rapport, J., Zhang, R., 2016. Effects of hydraulic retention time and organic loading rate on performance and stability of anaerobic digestion of *Spirulina platensis*. *Biosyst. Eng.* 147, 174–182.
- Arcila, J.S., Buitrón, G., 2016. Microalgae-bacteria aggregates: effect of the hydraulic retention time on the municipal wastewater treatment, biomass settleability and methane potential. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2862–2870.
- Astals, S., Musenze, R.S., Bai, X., Tannock, S., Tait, S., Pratt, S., Jensen, P.D., 2015. Anaerobic co-digestion of pig manure and algae: Impact of intracellular algal products recovery on co-digestion performance. *Bioresour. Technol.* 181, 97–104.
- Atkinson, A.W., Gunning, B.E.S., John, P.C.L., 1972. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: Ultrastructure, chemistry, and incorporation of <sup>14</sup>C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* 107, 1–32.
- Banerjee, C., Gupta, P., Mishra, S., Sen, G., Shukla, P., Bandopadhyay, R., 2012. Study of polyacrylamide grafted starch based algal flocculation towards applications in algal biomass harvesting. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 456–461.
- Banks, C.J., Heaven, S., 2013. Optimisation of biogas yields from anaerobic digestion by feedstock type, in: Wellinger, A., Murphy, J., Baxter, D. (Eds.), *The Biogas Handbook*. Woodhead publishing, pp. 131–165.
- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M., Pires, J.C.M., 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 1489–1500.
- Batista, A.P., Moura, P., Marques, P.A.S.S., Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., 2014. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel* 117, 537–543.

## Referencias

---

- Becker, W., 2004. Microalgae in Human and Animal Nutrition, in: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture : Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 312–351.
- Beuckels, A., Depraetere, O., Vandamme, D., Foubert, I., Smolders, E., Muylaert, K., 2013. Influence of organic matter on flocculation of *Chlorella vulgaris* by calcium phosphate precipitation. *Biomass Bioenerg.* 54, 107–114.
- Beuckels, A., Smolders, E., Muylaert, K., 2015. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Res.* 77, 98–106.
- Bilad, M.R., Arafat, H.A., Vankelecom, I.F.J., 2014. Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: a review. *Biotechnol. Adv.* 32, 1283–300.
- Black, J.R., Yin, Q.-Z., Rustad, J.R., Casey, W.H., 2007. Magnesium isotopic equilibrium in chlorophylls. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8690–8691.
- Blair, M.F., Kokabian, B., Gude, V.G., 2014. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *J. Environ. Chem. Eng.* 2, 665–674.
- Boelee, N.C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C.J.N., Wijffels, R.H., 2011. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. *Water Res.* 45, 5925–5933.
- Bogen, C., Klassen, V., Wichmann, J., Russa, M. La, Doebbe, A., Grundmann, M., Uronen, P., Kruse, O., et al., 2013. Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. *Bioresour. Technol.* 133, 622–626.
- Bohutskyi, P., Betenbaugh, M.J., Bouwer, E.J., 2014. The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. *Bioresour. Technol.* 155, 366–372.
- Bohutskyi, P., Bouwer, E.J., 2013. Biogas production from algae and cyanobacteria through anaerobic digestion: a review, analysis, and research needs, in: Lee, J.W. (Ed.), *Advanced Biofuels and Bioproducts*. Springer New York, New York, NY, pp. 873–975.
- Boles, E., Hollenberg, C.P., 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 85–111.
- Bougrier, C., Delgenès, J.P., Carrère, H., 2008. Effects of thermal treatments on five different

## Referencias

---

- waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion. *Chem. Eng. J.* 139, 236–244.
- Bouterfas, R., Belkoura, M., Dauta, A., 2002. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. *Hydrobiologia* 489, 207–217.
- Braun, R., Huber, P., Meyrath, J., 1981. Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. *Biotechnol. Lett.* 3, 159–164.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557–577.
- Brown, M.R., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 145, 79–99.
- Burczyk, J., Dworzanski, J., 1988. Comparison of sporopollenin-like algal resistant polymer from cell wall of *Botryococcus*, *Scenedesmus* and *Lycopodium clavatum* by GC-pyrolysis. *Phytochemistry* 27, 2151–2153.
- Burczyk, J., Hesse, M., 1981. The ultrastructure of the outer cell wall-layer of *Chlorella* mutants with and without sporopollenin. *Plant Syst. Evol.* 138, 121–137.
- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 19, 360–369.
- Camiro-Vargas, T.K., Hernández-Ayón, J.M., Valenzuela-Espinoza, E., Delgadillo-Hinojosa, F., Cajal-Medrano, R., 2005. Dissolved inorganic carbon uptake by *Rhodomonas* sp. and *Isochrysis aff. galbana* determined by a potentiometric technique. *Aquac. Eng.* 33, 83–95.
- Cañizares, R.O., Domínguez, A.R., 1993. Growth of *Spirulina maxima* on swine waste. *Bioresour. Technol.* 45, 73–75.
- Carballa, M., Regueiro, L., Lema, J.M., 2015. Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 103–111.
- Cardinali-Rezende, J., Rojas-Ojeda, P., Nascimento, A.M.A., Sanz, J.L., 2016. Proteolytic bacterial dominance in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor assessed by 454 pyrosequencing technology. *Chemosphere* 146, 519–525.

## Referencias

---

- Carrère, H., Antonopoulou, G., Affes, R., Passos, F., Battimelli, A., Lyberatos, G., Ferrer, I., 2015. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. *Bioresour. Technol.* 199, 386–397.
- Carvajal, A., Peña, M., Pérez-Elvira, S., 2013. Autohydrolysis pretreatment of secondary sludge for anaerobic digestion. *Biochem. Eng. J.* 75, 21–31.
- Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X., 2006. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnol. Prog.* 22, 1490–1506.
- Čater, M., Fanel, L., Malovrh, Š., Logar, R.M., 2015. Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. *Bioresour. Technol.* 186, 261–269.
- Cavalier-Smith, T., 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* 57, 953–994.
- Cembella, A.D., Antia, N.J., Harrison, P.J., 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *Crit. Rev. Microbiol.* 10, 317–391.
- Chandrasekhar, K., Lee, Y.-J., Lee, D.-W., 2015. Biohydrogen production: strategies to improve process efficiency through microbial routes. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 8266–8293.
- Chen, C.Y., Chen, Y.C., Huang, H.C., Ho, S.H., Chang, J.S., 2015. Enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using innovative photobioreactors with optimal light source arrangements. *Bioresour. Technol.* 191, 407–413.
- Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., Chang, J.S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* 102, 71–81.
- Chen, H., Zhou, D., Luo, G., Zhang, S., Chen, J., 2015. Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47, 427–437.
- Chen, J., Zheng, F., Guo, R., 2015. Algal Feedback and Removal Efficiency in a Sequencing Batch Reactor Algae Process (SBAR) to Treat the Antibiotic Cefradine. *PLoS One* 10, 1–11.
- Chen, P.H., Oswald, W.J., 1998. Thermochemical treatment for algal fermentation. *Environ. Int.*

## Referencias

---

- 24, 889–897.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064.
- Cheng, J., Sun, J., Huang, Y., Feng, J., Zhou, J., Cen, K., 2013. Dynamic microstructures and fractal characterization of cell wall disruption for microwave irradiation-assisted lipid extraction from wet microalgae. *Bioresour. Technol.* 150, 67–72.
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Labavitch, J.M., VanderGheynst, J.S., 2011. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. *Process Biochem.* 46, 1927–1933.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
- Cho, S., Luong, T.T., Lee, D., Oh, Y.-K., Lee, T., 2011. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102, 8639–8645.
- Cho, S., Park, S., Seon, J., Yu, J., Lee, T., 2013. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresour. Technol.* 143, 330–336.
- Chojnacka, K., Zielińska, A., 2012. Evaluation of growth yield of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 437–445.
- Choong, Y.Y., Norli, I., Abdullah, A.Z., Yhaya, M.F., 2016. Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review. *Bioresour. Technol.* 209, 369–379.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, 1st ed. E & FN Spon, London.
- Christenson, L., Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29, 686–702.
- Colleran, E., Finnegan, S., Lens, P., 1995. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67, 29–46.

## Referencias

---

- Collos, Y., Harrison, P.J., 2014. Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Mar. Pollut. Bull.* 80, 8–23.
- Conrad, R., 2007. Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. *Adv. Agron.* 96, 1–63.
- Converti, A., Scapazzoni, S., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., 2006. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 8–16.
- Correll, D.L., 1998. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review, in: *Journal of Environmental Quality*. pp. 261–266.
- Couderchet, M., Schmalfuß, J., Böger, P., 1996. Incorporation of Oleic Acid into Sporopollenin and Its Inhibition by the Chloroacetamide Herbicide Metazachlor. *Pestic. Biochem. Physiol.* 55, 189–199.
- Cuellar-Bermudez, S.P., Garcia-Perez, J.S., Rittmann, B.E., Parra-Saldivar, R., 2015. Photosynthetic bioenergy utilizing CO<sub>2</sub>: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. *J. Clean. Prod.* 98, 53–65.
- Day, J.G., Slocombe, S.P., Stanley, M.S., 2012. Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresour. Technol.* 109, 245–51.
- De-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2004. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Res.* 38, 4222–46.
- de Aguiar do Couto, E., Calijuri, M.L., Assemany, P.P., Tango, M.D., da Fonseca Santiago, A., 2015. Influence of solar radiation on nitrogen recovery by the biomass grown in high rate ponds. *Ecol. Eng.* 81, 140–145.
- De Clerck, O., Bogaert, K.A., Leliaert, F., 2012. Diversity and Evolution of Algae: Primary Endosymbiosis, in: Piganeau, G. (Ed.), *Advances in Botanical Research: Genomic Insights into the Biology of Algae*. Academic Press, pp. 55–86.
- de Godos, I., Blanco, S., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R., 2009a. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresour. Technol.* 100, 4332–4339.
- de Godos, I., González, C., Becares, E., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2009b. Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular

## Referencias

---

- biofilm photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 187–194.
- de Morais, M.G., Costa, J.A.V., 2007. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Convers. Manag.* 48, 2169–2173.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., Verstraete, W., 2012. Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresour. Technol.* 112, 1–9.
- Demuez, M., Mahdy, A., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2015. Enzymatic cell disruption of microalgae biomass in biorefinery processes. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 1955–1966.
- Dhar, B.R., Youssef, E., Nakhla, G., Ray, M.B., 2011. Pretreatment of municipal waste activated sludge for volatile sulfur compounds control in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 102, 3776–3782.
- Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., Willats, W.G.T., 2012. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Front. Plant Sci.* 3, 7.
- Douglas, S.E., 1994. Chloroplast Origins and Evolution, in: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 91–118.
- Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., Machat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachleder, V., Vitova, M., 2009. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 179–185.
- Drosg, B., Braun, R., Bochmann, G., Al Saedi, T., 2013. Analysis and characterisation of biogas feedstocks, in: Wellinger, A., Murphy, J., Baxter, D. (Eds.), *The Biogas Handbook*. Woodhead publishing, pp. 52–84.
- Du, Z., Mohr, M., Ma, X., Cheng, Y., Lin, X., Liu, Y., Zhou, W., Chen, P., et al., 2012. Hydrothermal pretreatment of microalgae for production of pyrolytic bio-oil with a low nitrogen content. *Bioresour. Technol.* 120, 13–18.
- Edwards, M., Watson, L., 2011. Aquaculture Explained Cultivating *Laminaria digitata*. *Irish sea Fish. board* 26, 1–71.
- Eixler, S., Karsten, U., Selig, U., 2006. Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris*

## Referencias

---

- (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia* 45, 53–60.
- Franke-Whittle, I.H., Walter, A., Ebner, C., Insam, H., 2014. Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Manag.* 34, 2080–2089.
- Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M., Nagai, S., 1990. Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 719–723.
- Gelin, F., Volkman, J., Largeau, C., Derenne, S., Sinninghe Damsté, J., De Leeuw, J., 1999. Distribution of aliphatic, nonhydrolyzable biopolymers in marine microalgae. *Org. Geochem.* 30, 147–159.
- Ghadiryfar, M., Rosentrater, K.A., Keyhani, A., Omid, M., 2016. A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 54, 473–481.
- Giardi, M.T., Pace, E., 2005. Photosynthetic proteins for technological applications. *Trends Biotechnol.* 23, 257–263.
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., 1959. Biological Conversion of Light Energy to the Chemical Energy of Methane. *Appl. Microbiol.* 7, 219–227.
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H.B., 1957. Anaerobic digestion of Algae. *Appl. Microbiol.* 5, 47–55.
- González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2012a. Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods. *J. Appl. Phycol.* 25, 991–999.
- González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2012b. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnol. Adv.* 30, 1655–61.
- González-Fernández, C., García-Encina, P.A., 2009. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass Bioenerg.* 33, 1065–1069.
- González-Fernández, C., León-Cofreces, C., García-Encina, P.A., 2008. Different pretreatments for increasing the anaerobic biodegradability in swine manure. *Bioresour. Technol.* 99,

## Referencias

---

8710–4.

González-Fernández, C., Mahdy, A., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2016. Impact of temperature and photoperiod on anaerobic biodegradability of microalgae grown in urban wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 106, 16–23.

González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B., García-González, M.C., 2011a. Evaluation of anaerobic codigestion of microalgal biomass and swine manure via response surface methodology. *Appl. Energy* 88, 3448–3453.

González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B., García-González, M.C., 2011b. Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium treating pig slurry. *Bioresour. Technol.* 102, 960–966.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2013. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresour. Technol.* 129, 219–223.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012a. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioprod. Bior.* 6, 205–218.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012b. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresour. Technol.* 110, 610–6.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012c. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenerg.* 40, 105–111.

González-Fernández, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B., 2015. Anaerobic digestion of microalgal biomass: challenges, opportunities and research needs. *Bioresour. Technol.* 198, 896–906.

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.

Gouveia, L., Oliveira, A.C., 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 269–274.

## Referencias

---

- Grobbelaar, J.U., 2004. Algal Nutrition, in: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 97–115.
- Gruber-Brunhumer, M.R., Jerney, J., Zohar, E., Nussbaumer, M., Hieger, C., Bochmann, G., Schagerl, M., Obbard, J.P., et al., 2015. *Acutodesmus obliquus* as a benchmark strain for evaluating methane production from microalgae: Influence of different storage and pretreatment methods on biogas yield. *Algal Res.* 12, 230–238.
- Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Ramluckan, K., Bux, F., 2014. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. *Fuel* 128, 46–52.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33, 243–260.
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., Mayfield, S., 2010. Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels* 1, 763–784.
- Harun, R., Danquah, M.K., 2011. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chem. Eng. J.* 168, 1079–1084.
- He, P.J., Mao, B., Shen, C.M., Shao, L.M., Lee, D.J., Chang, J.S., 2013. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 129, 177–181.
- He, S., Fan, X., Katukuri, N.R., Yuan, X., Wang, F., Guo, R.-B., 2016. Enhanced methane production from microalgal biomass by anaerobic bio-pretreatment. *Bioresour. Technol.* 204, 145–151.
- Heimann, K., Cirés, S., 2015. N<sub>2</sub>-Fixing Cyanobacteria: Ecology and Biotechnological Applications, in: Kim, S.-K. (Ed.), Handbook of Marine Microalgae. Academic Press, pp. 501–515.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Hu, B., 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 1978–1995.
- Hii, Y.S., Soo, C.L., Chuah, T.S., Mohd-Azmi, A., Abol-Munafi, A.B., 2011. Interactive effect of ammonia and nitrate on the nitrogen uptake by *Nannochloropsis* sp. *J. Sustain. Sci. Manag.* 6, 60–68.

## Referencias

---

- Ho, S.H., Li, P.J., Liu, C.C., Chang, J.S., 2013. Bioprocess development on microalgae-based CO<sub>2</sub> fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.* 145, 142–149.
- Ho, S.H., Ye, X., Hasunuma, T., Chang, J.S., Kondo, A., 2014. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae: a critical review. *Biotechnol. Adv.* 32, 1448–1459.
- Hoiczky, E., Hansel, A., 2000. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* 182, 1191–9.
- Hopkins, W.G., Hüner, N.P.A., 2008. *Introduction to Plant Physiology*, 4th ed. John Wiley & Sons.
- Illman, A., Scragg, A., Shales, S., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 631–635.
- Inglesby, A.E., Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L., van Hille, R.P., 2015. Anaerobic digestion of *Spirulina* sp. and *Scenedesmus* sp.: a comparison and investigation of the impact of mechanical pre-treatment. *J. Appl. Phycol.* 27, 1891–1900.
- Jamieson, T.S., Stratton, G.W., Gordon, R., Madani, A., 2003. The use of aeration to enhance ammonia nitrogen removal in constructed wetlands. *Can. Biosyst. Eng. J.* 45, 9–14.
- Ji, M.-K., Abou-Shanab, R.A.I., Kim, S.-H., Salama, E.-S., Lee, S.-H., Kabra, A.N., Lee, Y.-S., Hong, S., et al., 2013. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecol. Eng.* 58, 142–148.
- Jiang, Y., Yoshida, T., Quigg, A., 2012. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiol. Biochem.* 54, 70–77.
- Jöhnk, K.D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P., Stroom, J.M., 2008. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Glob. Chang. Biol.* 14, 495–512.
- Khalil, Z.I., Asker, M.M.S., El-Sayed, S., Kobbia, I.A., 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1225–1231.

## Referencias

---

- Kim, M., Baek, J., Yun, Y., Junsim, S., Park, S., Kim, S., 2006. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 812–816.
- Kim, S., Park, J., Cho, Y.-B., Hwang, S.-J., 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresour. Technol.* 144, 8–13.
- Kinnunen, V., Craggs, R., Rintala, J., 2014. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in a laboratory-scale accumulating-volume reactor. *Water Res.* 57, 247–257.
- Klassen, V., Blifernez-Klassen, O., Wobbe, L., Schlüter, A., Kruse, O., Mussnug, J.H., 2016. Efficiency and biotechnological aspects of biogas production from microalgal substrates. *J. Biotechnol.* 234, 7–26.
- Klut, M.E., Bisalputra, T., Antia, N.J., 1983. Agglutination of the chlorophycean flagellate *Dunaliella tertiolecta* by treatment with lectins or divalent cations at alkaline pH. *J. Phycol.* 19, 112–115.
- Koster, I.W., Lettinga, G., 1984. The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agric. Wastes* 9, 205–216.
- Kroes, R., Schaefer, E.J., Squire, R.A., Williams, G.M., 2003. A review of the safety of DHA45-oil. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1433–1446.
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M., Tys, J., 2014. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 735–741.
- Krzmarzick, M.J., Crary, B.B., Harding, J.J., Oyerinde, O.O., Leri, A.C., Myneni, S.C.B., Novak, P.J., 2012. Natural niche for organohalide-respiring *Chloroflexi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 393–401.
- Kylin, A., Das, G., 1967. Calcium and Strontium as Micronutrients and Morphogenetic Factors for *Scenedesmus*. *Phycologia* 6, 201–210.
- Lam, M.K., Lee, K.T., 2015. Bioethanol Production from Microalgae, in: *Handbook of Marine Microalgae*. Elsevier, pp. 197–208.

## Referencias

---

- Ledda, C., Schievano, A., Scaglia, B., Rossoni, M., Acién Fernández, F.G., Adani, F., 2016. Integration of microalgae production with anaerobic digestion of dairy cattle manure: an overall mass and energy balance of the process. *J. Clean. Prod.* 112, 103–112.
- Lee, I.-S., Parameswaran, P., Rittmann, B.E., 2011. Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge. *Bioresour. Technol.* 102, 10266–10272.
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.* 101, S75–S77.
- Lefebvre, O., Quentin, S., Torrijos, M., Godon, J.J., Delgenès, J.P., Moletta, R., 2007. Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 61–9.
- Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F., De Clerck, O., 2012. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 31, 1–46.
- López, M.J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López-González, J.A., Verstichel, S., Debeer, L., Wierinck, I., Moreno, J., 2013. Bidelignification of agricultural and forest wastes: Effect on anaerobic digestion. *Biomass Bioenerg.* 58, 343–349.
- Lorente, E., Farriol, X., Salvadó, J., 2015. Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. *Fuel Process. Technol.* 131, 93–98.
- Lü, F., Ji, J., Shao, L., He, P., 2013. Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. *Biotechnol. Biofuels* 6, 92.
- Lüring, M., Eshetu, F., Faassen, E.J., Kosten, S., Huszar, V.L.M., 2013. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshw. Biol.* 58, 552–559.
- Ma, J., Zhao, Q.-B., Laurens, L.L.M., Jarvis, E.E., Nagle, N.J., Chen, S., Frear, C.S., 2015. Mechanism, kinetics and microbiology of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion of algal biomass. *Biotechnol. Biofuels* 8, 141–153.
- Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2016. Enzymatic pretreatment of *Chlorella vulgaris* for biogas production: Influence of urban wastewater as a sole nutrient source on macromolecular profile and biocatalyst efficiency. *Bioresour. Technol.* 199, 319–325.

## Referencias

---

- Mahdy, A., Fotidis, I.A., Mancini, E., Ballesteros, M., González-Fernández, C., Angelidaki, I., 2017. Ammonia tolerant inocula provide a good base for anaerobic digestion of microalgae in third generation biogas process. *Bioresour. Technol.* 225, 272–278.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2015a. Protease pretreated *Chlorella vulgaris* biomass bioconversion to methane via semi-continuous anaerobic digestion. *Fuel* 158, 35–41.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014a. Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. *Energy Convers. Manag.* 85, 551–557.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014b. Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. *Energy* 78, 48–52.
- Mahdy, A., Mendez, L., Blanco, S., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014c. Protease cell wall degradation of *Chlorella vulgaris*: Effect on methane production. *Bioresour. Technol.* 171, 421–427.
- Mahdy, A., Mendez, L., Tomás-Pejó, E., del Mar Morales, M., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2015b. Influence of enzymatic hydrolysis on the biochemical methane potential of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 1299–1305.
- Maity, J.P., Bundschuh, J., Chen, C.Y., Bhattacharya, P., 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. *Energy*.
- Markou, G., 2015. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* and *Chlorella* in ammonia-rich wastewater: optimization of nutrient removal and biomass production. *Bioresour. Technol.* 193, 35–41.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2013. Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-methane production through anaerobic digestion. *Fuel* 111, 872–879.
- Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D., 2012. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2661–70.

## Referencias

---

- Markou, G., Georgakakis, D., 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl. Energy* 88, 3389–3401.
- Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K., 2014a. Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. *Water Res.* 65, 186–202.
- Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K., 2014b. Ammonia inhibition on *Arthrospira platensis* in relation to the initial biomass density and pH. *Bioresour. Technol.* 166, 259–65.
- Marsolek, M.D., Kendall, E., Thompson, P.L., Shuman, T.R., 2014. Thermal pretreatment of algae for anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 151, 373–7.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232.
- Mc Carty, P.L., McKinney, R.E., 1961. Salt toxicity in anaerobic digestion. *J Water Pollut. Control Fed.* 33, 399–415.
- McDermott, G., Prince, S.M., Freer, A.A., Hawthornthwaite-Lawless, A.M., Papiz, M.Z., Cogdell, R.J., Isaacs, N.W., 1995. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* 374, 517–521.
- McIntosh, S., Vancov, T., 2010. Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresour. Technol.* 101, 6718–27.
- Mendez, L., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014. Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. *Appl. Energy* 129, 238–242.
- Mendez, L., Mahdy, A., Timmers, R.A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2013. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour. Technol.* 149, 136–141.
- Molinuevo-Salces, B., González-Fernández, C., Gómez, X., García-González, M.C., Morán, A., 2012. Vegetable processing wastes addition to improve swine manure anaerobic digestion: Evaluation in terms of methane yield and SEM characterization. *Appl. Energy* 91, 36–42.
- Molinuevo-Salces, B., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2016. From piggery wastewater nutrients to biogas: Microalgae biomass revalorization through anaerobic

## Referencias

---

- digestion. *Renew. Energy* 96, 1103–1110.
- Montalescot, V., Rinaldi, T., Touchard, R., Jubeau, S., Frappart, M., Jaouen, P., Bourseau, P., Marchal, L., 2015. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresour. Technol.* 196, 339–46.
- Monteiro, C.M., Marques, A.P.G.C., Castro, P.M.L., Xavier Malcata, F., 2009. Characterization of *Desmodesmus pleiomorphus* isolated from a heavy metal-contaminated site: biosorption of zinc. *Biodegradation* 20, 629–641.
- Morales-Amaral, M. del M., Gómez-Serrano, C., Ación, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 2015. Production of microalgae using centrate from anaerobic digestion as the nutrient source. *Algal Res.* 9, 297–305.
- Moussa, S., 2012. Effect of different growth conditions on certain biochemical parameters of different cyanobacterial strains. *Malays. J. Microbiol.* 8, 266–272.
- Muñoz, J., Freile-Pelegrín, Y., Robledo, D., 2004. Mariculture of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatán, México. *Aquaculture* 239, 161–177.
- Muñoz, R., Guieysse, B., 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res.* 40, 2799–815.
- Mussnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150, 51–56.
- Nguyen, T.A.D., Pyo Kim, J., Sun Kim, M., Kwan Oh, Y., Sim, S.J., 2008. Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 1483–1488.
- Ni, W., Zhang, J., Ding, T., Stevenson, R.J., Zhu, Y., 2012. Environmental factors regulating cyanobacteria dominance and microcystin production in a subtropical lake within the Taihu watershed, China. *J. Zhejiang Univ. Sci. A* 13, 311–322.
- Nkemka, V.N., Murto, M., 2013. Biogas production from wheat straw in batch and UASB reactors: the roles of pretreatment and seaweed hydrolysate as a co-substrate. *Bioresour. Technol.* 128, 164–172.

## Referencias

---

- Nobre, B.P., Villalobos, F., Barragán, B.E., Oliveira, A.C., Batista, A.P., Marques, P.A.S.S., Mendes, R.L., Sovová, H., et al., 2013. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga--extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. *Bioresour. Technol.* 135, 128–36.
- Nolla-Ardèvol, V., Peces, M., Strous, M., Tegetmeyer, H.E., 2015. Metagenome from a *Spirulina* digesting biogas reactor: analysis via binning of contigs and classification of short reads. *BMC Microbiol.* 15, 277.
- Nurachman, Z., H, H., Rahmaniyah, W.R., Kurnia, D., Hidayat, R., Prijamboedi, B., Suendo, V., Ratnaningsih, E., et al., 2015. Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. *Algal Res.* 10, 25–32.
- Olguín, E.J., 2012. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnol. Adv.* 30, 1031–1046.
- Oliveira, M.A.C.L. de, Monteiro, M.P.C., Robbs, P.G., Leite, S.G.F., 1999. Growth and Chemical Composition of *Spirulina* Maxima and *Spirulina* Platensis Biomass at Different Temperatures. *Aquac. Int.* 7, 261–275.
- Overview of Algal Biofuel Supply Chain, 2012. , in: Sustainable Development of Algal Biofuels in the United States. National Academies Press, Washington, D.C., pp. 27–76.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., Mishra, S., 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour. Technol.* 156, 146–154.
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., 2010. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Sci. Technol.* 61, 633–639.
- Passos, F., Carretero, J., Ferrer, I., 2015a. Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. *Chem. Eng. J.* 279, 667–672.
- Passos, F., Ferrer, I., 2015. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Res.* 68, 364–373.
- Passos, F., García, J., Ferrer, I., 2013a. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresour. Technol.* 138, 79–86.

## Referencias

---

- Passos, F., Hom-Diaz, A., Blanquez, P., Vicent, T., Ferrer, I., 2016. Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. *Bioresour. Technol.* 199, 347–351.
- Passos, F., Solé, M., García, J., Ferrer, I., 2013b. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Appl. Energy* 108, 168–175.
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., Ferrer, I., 2015b. Algal biomass: physical pretreatments, in: *Pretreatment of Biomass*. Elsevier, pp. 195–226.
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., Ferrer, I., 2014. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: a review. *Bioresour. Technol.* 172, 403–412.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., De-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11–36.
- Petersson, A., 2013. Biogas cleaning, in: Wellinger, A., Murphy, J., Baxter, D. (Eds.), *The Biogas Handbook*. Woodhead publishing, pp. 329–341.
- Pobeheim, H., Munk, B., Müller, H., Berg, G., Guebitz, G.M., 2010. Characterization of an anaerobic population digesting a model substrate for maize in the presence of trace metals. *Chemosphere* 80, 829–836.
- Posadas, E., García-Encina, P.A., Domínguez, A., Díaz, I., Becares, E., Blanco, S., Muñoz, R., 2014. Enclosed tubular and open algal–bacterial biofilm photobioreactors for carbon and nutrient removal from domestic wastewater. *Ecol. Eng.* 67, 156–164.
- Posadas, E., García-Encina, P.A., Soltau, A., Domínguez, A., Díaz, I., Muñoz, R., 2013. Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal-bacterial biofilm bioreactors. *Bioresour. Technol.* 139, 50–58.
- Postma, P.R., Miron, T.L., Olivieri, G., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., 2015a. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresour. Technol.* 184, 297–304.
- Postma, P.R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., Olivieri, G., Ferrari, G., 2015b. Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined Pulsed Electric Field-Temperature treatment. *Bioresour. Technol.* 203, 80–88.
- Powell, N., Shilton, A.N., Pratt, S., Chisti, Y., 2008. Factors Influencing Luxury Uptake of

## Referencias

---

- Phosphorus by Microalgae in Waste Stabilization Ponds. *Environmental Sci. Technol.* 42, 5958–5962.
- Pratt, C., Parsons, S.A., Soares, A., Martin, B.D., 2012. Biologically and chemically mediated adsorption and precipitation of phosphorus from wastewater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 890–896.
- Přibyl, P., Cepák, V., Zachleder, V., 2013. Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.* 25, 545–553.
- Proulx, D., Lessard, P., De La Noüe, J., 1994. Traitement tertiaire d'un effluent domestique secondaire par culture intensive de la cyanobactérie *Phormidium bohneri*. *Environ. Technol.* 15, 449–458.
- Rajagopal, R., Massé, D.I., Singh, G., 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresour. Technol.* 143, 632–641.
- Ramos-Suárez, J.L., Carreras, N., 2014. Use of microalgae residues for biogas production. *Chem. Eng. J.* 242, 86–95.
- Ramos Tercero, E.A., Sforza, E., Morandini, M., Bertucco, A., 2014. Cultivation of *Chlorella protothecoides* with urban wastewater in continuous photobioreactor: Biomass productivity and nutrient removal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 1470–1485.
- Rani, R.U., Kumar, S.A., Kaliappan, S., Yeom, I.-T., Banu, J.R., Uma Rani, R., Adish Kumar, S., Kaliappan, S., et al., 2012. Low temperature thermo-chemical pretreatment of dairy waste activated sludge for anaerobic digestion process. *Bioresour. Technol.* 103, 415–424.
- Ras, M., Lardon, L., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2011. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 102, 200–206.
- Razzak, S.A., Hossain, M.M., Lucky, R.A., Bassi, A.S., de Lasa, H., 2013. Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27, 622–653.
- Remias, D., Lütz-Meindl, U., Lütz, C., 2005. Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *Eur. J. Phycol.* 40, 259–268.
- Renaud, S.M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G., Parry, D.L., 2002. Effect of temperature on growth,

## Referencias

---

- chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211, 195–214.
- Renuka, N., Sood, A., Ratha, S.K., Prasanna, R., Ahluwalia, A.S., 2013. Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *J. Appl. Phycol.* 25, 1529–1537.
- Richmond, A., 2004. *Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology*, 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Robbins, J.E., Gerhardt, S.A., Kappel, T.J., 1989. Effects of total ammonia on anaerobic digestion and an example of digester performance from cattle manure-protein mixtures. *Biol. Wastes* 27, 1–14.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112.
- Rodriguez, C., Alaswad, A., Benyounis, K.Y., Olabi, A.G., 2017. Pretreatment techniques used in biogas production from grass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 68, 1193–1204.
- Rodriguez, C., Alaswad, A., Mooney, J., Prescott, T., Olabi, A.G., 2015. Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. *Fuel Process. Technol.* 138, 765–779.
- Romero García, J.M., Acién Fernández, F.G., Fernández Sevilla, J.M., 2012. Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 112, 164–170.
- Rosen, B.H., Berliner, M.D., Petro, M.J., 1985. Protoplast induction in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Sci.* 41, 23–30.
- Rosenberg, J.N., Mathias, A., Korth, K., Betenbaugh, M.J., Oyler, G.A., 2011. Microalgal biomass production and carbon dioxide sequestration from an integrated ethanol biorefinery in Iowa: A technical appraisal and economic feasibility evaluation. *Biomass Bioenerg.* 35, 3865–3876.
- Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P.D., Arbib, Z., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., Perales, J.A., 2013. Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae in urban wastewater: prediction from a batch experiment. *Bioresour. Technol.* 127, 456–63.

## Referencias

---

- Sambusiti, C., Monlau, F., Ficara, E., Carrère, H., Malpei, F., 2013. A comparison of different pre-treatments to increase methane production from two agricultural substrates. *Appl. Energy* 104, 62–70.
- Samson, R., Leduy, A., 1982. Biogas production from anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1919–1924.
- Sarat Chandra, T., Suvitha, G., Mukherji, S., Chauhan, V.S., Vidyashankar, S., Krishnamurthi, K., Sarada, R., Mudliar, S.N., 2014. Statistical optimization of thermal pretreatment conditions for enhanced biomethane production from defatted algal biomass. *Bioresour. Technol.* 162, 157–165.
- Sawayama, S., Minowa, T., Dote, Y., Yokoyama, S., 1992. Growth of the hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 135–138.
- Scheller, H.V., Jensen, P.E., Haldrup, A., Lunde, C., Knoetzel, J., 2001. Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1507, 41–60.
- Schwede, S., Rehman, Z.-U., Gerber, M., Theiss, C., Span, R., 2013. Effects of thermal pretreatment on anaerobic digestion of *Nannochloropsis salina* biomass. *Bioresour. Technol.* 143, 505–511.
- Se-Kwon, K. (Ed.), 2015. *Handbook of Marine Microalgae*, 1st ed, *Handbook of Marine Microalgae*. Elsevier.
- Show, K.-Y., Lee, D.-J., 2014. Production of biohydrogen from microalgae, in: Pandey, A., Lee, D.-J., Chisti, Y., Soccol, C.R. (Eds.), *Biofuels from Algae*. Elsevier, pp. 189–204.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.* 27, 409–16.
- Silva-Benavides, A.M., Torzillo, G., 2012. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isoethrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *J. Appl. Phycol.* 24, 267–276.
- Singh, J., Saxena, R.C., 2015. An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance, in: Se-Kwon, K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae*. Elsevier, pp. 11–24.
- Smith, B.T., Davis, R.H., 2012. Sedimentation of algae flocculated using naturally-available,

## Referencias

---

- magnesium-based flocculants. *Algal Res.* 1, 32–39.
- Soeder, C.J., Hegewald, E., Fiolitakis, E., Grobbelaar, J.U., 1985. Temperature dependence of population growth in a green microalga: Thermodynamic characteristics of growth intensity and the influence of cell concentration. *Zeitschrift für Naturforsch. C* 40, 227–233.
- Solovchenko, A., Verschoor, A.M., Jablonowski, N.D., Nedbal, L., 2016. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. *Biotechnol. Adv.* 34, 550–564.
- Sørensen, I., Domozych, D., Willats, W.G.T., 2010. How have plant cell walls evolved? *Plant Physiol.* 153, 366–372.
- Spiden, E.M., Yap, B.H.J., Hill, D.R.A., Kentish, S.E., Scales, P.J., Martin, G.J.O., 2013. Quantitative evaluation of the ease of rupture of industrially promising microalgae by high pressure homogenization. *Bioresour. Technol.* 140, 165–171.
- Stamatelatou, K., Antonopoulou, G., Lyberatos, G., 2011. Production of biogas via anaerobic digestion, in: Luque, R., Campelo, J., Clark, J. (Eds.), *Handbook of Biofuels Production*. Woodhead Publishing, pp. 266–304.
- Stanier, G., 1988. Fine structure of cyanobacteria. *Methods Enzymol., Methods in Enzymology* 167, 157–172.
- Sturm, B.S.M., Lamer, S.L., 2011. An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production. *Appl. Energy* 88, 3499–3506.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H.H., Renganathan, S., 2016. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 55, 909–941.
- Sumper, M., Brunner, E., 2006. Learning from Diatoms: Nature's Tools for the Production of Nanostructured Silica. *Adv. Funct. Mater.* 16, 17–26.
- Sun, W., Qian, X., Gu, J., Wang, X.-J., Duan, M.-L., 2016. Mechanism and effect of temperature on variations in antibiotic resistance genes during anaerobic digestion of dairy manure. *Sci. Rep.* 6, 1–9.
- Sung, S., Liu, T., 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere* 53, 43–52.

## Referencias

---

- Takeda, H., 1996. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry* 42, 673–675.
- Tang, Y.-Q., Shigematsu, T., Morimura, S., Kida, K., 2015. Dynamics of the microbial community during continuous methane fermentation in continuously stirred tank reactors. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 375–383.
- Thajuddin, N., Subramanian, G., 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr. Sci.* 89, 47–57.
- Tijani, H., Abdullah, N., Yuzir, A., 2015. Integration of microalgae biomass in biomethanation systems. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 52, 1610–1622.
- Uggetti, E., Passos, F., Solé, M., Garfí, M., Ferrer, I., 2017. Recent Achievements in the Production of Biogas from Microalgae. *Waste Biomass Valor.* 8, 129–139.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.* 99, 4021–4028.
- Umen, J.G., 2014. Green algae and the origins of multicellularity in the plant kingdom. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, 1–27.
- Uysal, O., Ozge Uysal, F., Ekinci, K., 2015. Evaluation of Microalgae as Microbial Fertilizer. *Eur. J. Sustain. Dev.* 4, 77–82.
- van Donk, E., Hessen, D.O., 1995. Reduced digestibility of UV-B stressed and nutrient-limited algae by *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 307, 147–151.
- van Donk, E., Lüring, M., Hessen, D.O., Lokhorst, G.M., 1997. Altered cell wall morphology in nutrient-deficient phytoplankton and its impact on grazers. *Limnol. Oceanogr.* 42, 357–364.
- Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., 2013. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol.* 31, 233–9.
- Varel, V.H., Chen, T.H., Hashimoto, A.G., 1988. Thermophilic and mesophilic methane production from anaerobic degradation of the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Resour. Conserv. Recycl.* 1, 19–26.
- Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., Wangikar, P.P., 2015. Extremophilic micro-

## Referencias

---

- algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresour. Technol.* 184, 363–372.
- Vavilin, V.A., Lokshina, L.Y., Rytov, S.V., Kotsyurbenko, O.R., Nozhevnikova, A.N., Parshina, S.N., 1997. Modelling methanogenesis during anaerobic conversion of complex organic matter at low temperatures. *Water Sci. Technol.* 36, 531–538.
- Visviki, I., Santikul, D., 2000. The pH Tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 147–151.
- Volgusheva, A.A., Zagidullin, V.E., Antal, T.K., Korvatovsky, B.N., Krendeleva, T.E., Paschenko, V.Z., Rubin, A.B., 2007. Examination of chlorophyll fluorescence decay kinetics in sulfur deprived algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 559–564.
- Wahlen, B.D., Willis, R.M., Seefeldt, L.C., 2011. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresour. Technol.* 102, 2724–2730.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 707–718.
- Wang, H., Vuorela, M., Keränen, A.-L., Lehtinen, T.M., Lensu, A., Lehtomäki, A., Rintala, J., 2010. Development of microbial populations in the anaerobic hydrolysis of grass silage for methane production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 496–506.
- Wang, J., Liu, J., Liu, T., 2015. The difference in effective light penetration may explain the superiority in photosynthetic efficiency of attached cultivation over the conventional open pond for microalgae. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1–12.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R., 2010. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 1174–86.
- Wang, M., Lee, E., Dilbeck, M.P., Liebelt, M., Zhang, Q., Ergas, S.J., 2017. Thermal pretreatment of microalgae for biomethane production: experimental studies, kinetics and energy analysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 399–407.
- Wang, M., Park, C., 2015. Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge. *Biomass Bioenerg.* 80, 30–37.

## Referencias

---

- Ward, A.J., Lewis, D.M., Green, F.B., 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Res.* 5, 204–214.
- Wei, S., 2016. The application of biotechnology on the enhancing of biogas production from lignocellulosic waste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9821–9836.
- Wei, S., Zhang, H., Cai, X., Xu, J., Fang, J., Liu, H., 2014. Psychrophilic anaerobic co-digestion of highland barley straw with two animal manures at high altitude for enhancing biogas production. *Energy Convers. Manag.* 88, 40–48.
- Wellinger, A., Murphy, J., Baxter, D., 2013. *The biogas handbook: science, production and applications*, 1st ed. Woodhead publishing.
- Wieczorek, N., Kucuker, M.A., Kuchta, K., 2014. Fermentative hydrogen and methane production from microalgal biomass (*Chlorella vulgaris*) in a two-stage combined process. *Appl. Energy* 132, 108–117.
- Wirth, R., Lakatos, G., Böjti, T., Maróti, G., Bagi, Z., Kis, M., Kovács, A., Ács, N., et al., 2015a. Metagenome changes in the mesophilic biogas-producing community during fermentation of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *J. Biotechnol.* 215, 52–61.
- Wirth, R., Lakatos, G., Maróti, G., Bagi, Z., Minárovics, J., Nagy, K., Kondorosi, É., Rákhely, G., et al., 2015b. Exploitation of algal-bacterial associations in a two-stage biohydrogen and biogas generation process. *Biotechnol. Biofuels* 8, 59.
- Yamada, T., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Sekiguchi, Y., 2007. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2299–2306.
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., 2006. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1331–1349.
- Yamamoto, M., Kurihara, I., Kawano, S., 2005. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta* 221, 766–775.

## Referencias

---

- Yan, L., Gao, Y., Wang, Y., Liu, Q., Sun, Z., Fu, B., Wen, X., Cui, Z., et al., 2012. Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. *Bioresour. Technol.* 111, 49–54.
- Yanagi, M., Watanabe, Y., Saiki, H., 1995. CO<sub>2</sub> fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. *Energy Convers. Manag.* 36, 713–716.
- Yen, H.-W., Brune, D.E., 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* 98, 130–134.
- Yenigün, O., Demirel, B., 2013. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochem.* 48, 901–911.
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., Dou, C., 2011. Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 1215–1224.
- Zhong, W., Zhang, Z., Luo, Y., Qiao, W., Xiao, M., Zhang, M., 2012. Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source. *Bioresour. Technol.* 114, 281–286.

