



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

Optimización del proceso de eliminación
de CO₂ y acumulación simultánea de PHAs en
Nostoc Muscorum

Autora:

Gutiérrez Abadía, Julia

Tutoras:

Lebrero Fernández, Raquel

Ángeles Torres, Roxana

Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente

Valladolid, enero de 2020.





RESUMEN - ABSTRACT

Resumen

El biogás representa, hoy en día, una de las fuentes de energía renovables con mayor potencial. Sin embargo, la presencia de otros componentes, además del CH₄, limitan su uso, y los elevados costes de limpieza (*upgrading*) del biogás para obtener un biometano de alta calidad reducen su competitividad. En este estudio se ha realizado la implementación de un proceso biotecnológico de *upgrading* de biogás en un fotobiorreactor tubular inoculado con un consorcio de cianobacterias y bacterias acoplado a una columna de absorción con el fin de obtener un biometano apto para la inserción en las redes de distribución españolas de gas natural. Para aumentar la competitividad de este proceso, se ha estudiado la posibilidad del aprovechamiento de la biomasa producida en el proceso anterior para la obtención de productos de alto valor añadido. Con este último objetivo, se analizó la capacidad de acumulación de bioplásticos (polihidroxibutiratos o PHB) por parte de la cianobacteria *Nostoc Muscorum* con CO₂ como sustrato, sometiendo a esta cianobacteria a diferentes niveles de estrés a través de limitaciones de nitrógeno y fósforo y a distintas concentraciones y fuentes de carbono.

Palabras clave

Biogás, biometano, fotobiorreactor, PHBs, cianobacterias



Abstract

Biogas represents nowadays a renewable energy source with a large potential. However, the presence of contaminants apart from CH₄ limits their use, and the high costs associated to current cleaning (upgrading) technologies to obtain a high quality biomethane reduce its competitiveness. This study focused on the implementation of a biotechnological biogas upgrading process using a closed photobioreactor inoculated with a cyanobacterial and bacterial consortium coupled to an external absorption column. The photosynthetic upgrading process was optimized in order to obtain a biomethane composition complying with the Spanish requirements to be injected into the natural gas grid. To increase the cost-effectiveness of the process, the possibility of producing high value-added products using the biomass produced in that process was analyzed. For this purpose, the ability of *Nostoc muscorum* to accumulate bioplastics (polyhydroxybutyrates, PHB) using CO₂ as a carbon source was tested under different conditions of nitrogen and phosphorus limitation and supplementation of additional carbon sources.

Keywords

Biogas, biomethane, photobioreactor, PHBs, cyanobacteria.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	12
1.1	<i>Problemática del dióxido de carbono</i>	<i>12</i>
1.2	<i>Producción de biogás.....</i>	<i>12</i>
1.3	<i>Biogás como combustible. Tratamiento de revalorización</i>	<i>15</i>
1.3.1	Técnicas fisicoquímicas para la eliminación de impurezas	18
1.3.1.1	Eliminación del dióxido de carbono	18
1.3.1.2	Eliminación del vapor de agua	18
1.3.1.3	Eliminación del ácido sulfhídrico.....	19
1.3.1.4	Eliminación de los siloxanos.....	19
1.3.1.5	Eliminación del amoníaco.....	20
1.3.2	Técnicas fisicoquímicas disponibles para la revalorización del biogás.....	20
1.3.2.1	PSA (pressure swing adsorption).....	20
1.3.2.2	Técnicas de absorción. Disolventes utilizados.....	21
1.3.2.2.1	Agua.....	21
1.3.2.2.2	Disolvente orgánico.....	21
1.3.2.2.3	Aminas.....	22
1.3.2.3	Técnica de membranas.....	22
1.3.3	Técnicas biológicas disponibles para la revalorización del biogás.....	22
1.4	<i>Problemática plásticos derivados del petróleo</i>	<i>24</i>
1.5	<i>Biopolímeros.....</i>	<i>24</i>
1.5.1	PHAs	24
2	OBJETIVOS.....	28
3	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1	<i>Acumulación de PHBs.....</i>	<i>30</i>
3.1.1	Inóculo y medio de cultivo.....	30
3.1.2	Ensayos batch.....	31
	<input type="checkbox"/> Test 1. Estudio de la influencia de la limitación de nutrientes (N y P) en la acumulación de PHB con control sobre el pH	32
	<input type="checkbox"/> Test 2. Estudio de la influencia de la limitación de nutrientes (N y P) y la adición de ácidos grasos volátiles (AGVs) en la acumulación de PHB con control sobre el pH	33
	<input type="checkbox"/> Test 3. Estudio de la acumulación de PHB con deficiencia de nutrientes (N y P) y adición de AGVs desde tiempo cero.....	34
3.1.3	Procedimiento experimental.....	34



3.2 Operación en continuo de un fotobiorreactor cerrado para upgrading de biogás.....	35
3.2.1 Inóculo y medio de cultivo.....	35
3.2.2 Sistema experimental	37
3.2.3 Procedimiento experimental.....	40
3.2.4 Análisis experimentales y métodos analíticos.....	41
3.3 Métodos analíticos.....	42
3.3.1 Cromatografía de gases.....	42
3.3.2 pH	42
3.3.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total	42
3.3.4 PHBs	43
3.3.5 Ácido grasos volátiles.....	45
3.3.6 Oxígeno disuelto	45
4 Resultados y discusión	46
4.1 Ensayos batch.....	46
4.1.1 Test 1: Estudio de la influencia de la limitación de nutrientes (N y P) en la acumulación de PHB con control sobre el pH	46
4.1.1.1 Concentración de CO ₂	46
4.1.1.2 pH	47
4.1.1.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total	48
4.1.1.4 Sólidos suspendidos totales y PHBs	50
4.1.2 Test 2. Estudio de la influencia de la limitación de nutrientes (N y P) y la adición de ácidos grasos volátiles (AGVs) en la acumulación de PHB con control sobre el pH	52
4.1.2.1 Concentración de CO ₂	52
4.1.2.2 pH	53
4.1.2.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total	54
4.1.2.4 Sólidos suspendidos totales y PHBs	56
4.1.3 Test 3. Estudio de la acumulación de PHB con deficiencia de nutrientes (N y P) y adición de AGVs desde tiempo cero	57
4.1.3.1 Concentración de CO ₂	57
4.1.3.2 pH	58
4.1.3.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total	59
4.1.3.4 Sólidos suspendidos totales y acumulación de PHBs	60
4.2 Fotobiorreactor tubular cerrado.....	62
4.2.1 Eliminación de CO ₂ y H ₂ S.....	62
4.2.2 pH	65
4.2.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total	66
4.2.4 Oxígeno disuelto	66
4.2.5 Sólidos suspendidos totales y productividad de la biomasa.....	67



4.2.6 Aniones.....	68
4.2.7 Población microalgal	69
5 Conclusiones.....	72
Bibliografía.....	74



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del biogás (Bailón y col., 2012).....	14
Tabla 2.. Especificaciones de calidad del gas procedentes de fuentes no convencionales introducido en el sistema gasista, BOE-A-2018-14557.(España, 2018).....	17
Tabla 3. Propiedades físicas del PHB y PP (Balaji y col., 2013).....	25
Tabla 4. ES medio basal modificado.....	30
Tabla 5. Disolución de micronutrientes	30
Tabla 6. Concentración inicial de nitrógeno y fósforo en el medio basal ES para los experimentos realizados en el Test 1	32
Tabla 7. Concentración de nitrógeno y fósforo en el medio basal ES y condiciones de adición de AGVs para los experimentos realizados en el Test 2.....	33
Tabla 8. Concentración de nitrógeno y fósforo en el medio basal ES y condiciones de adición de AGVs para los experimentos realizados en el Test 3.....	34
Tabla 9. Principales poblaciones de microalgas en el inóculo del fotobiorreactor tubular	36
Tabla 10. Composición del Medio Brunner Modificado.....	36
Tabla 11. Solución de elementos traza SL-4 del medio Brunner modificado.....	36
Tabla 12. Solución de elementos traza SL-6 del medio Brunner modificado.....	37
Tabla 13. Descripción de las etapas del experimento en función de la concentración de carbono inorgánico en el medio basal.....	41
Tabla 14. Condiciones cromatográficas para el análisis de PHB	44
Tabla 15. Condiciones cromatográficas para el análisis de PHB: temperatura detector	44
Tabla 16. Concentración de carbono orgánico total (COT) en los reactores batch durante el test 1	49
Tabla 17. Concentración de carbono inorgánico (CI) en los reactores batch durante el test 1	49
Tabla 18. Concentración de nitrógeno total (NT) en los reactores batch durante el test 1.....	50
Tabla 19. Concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y PHBs en los reactores batch durante el test 1.....	51
Tabla 20. Concentración de carbono orgánico total (COT) en los reactores batch durante el test 2	54
Tabla 21. Concentración de carbono inorgánico (CI) en los reactores batch durante el test 2	55
Tabla 22. Concentración de nitrógeno total (NT) en los reactores batch durante el test 2.....	55
Tabla 23. Concentración de sólidos suspendidos totales(SST) y PHBs en los reactores batch durante el test 2.....	56



Tabla 24. Concentración de carbono orgánico total (COT) en los reactores batch durante el test 3	59
Tabla 25. Concentración de carbono inorgánico (CI) en los reactores batch durante el test 3	60
Tabla 26. Concentración de nitrógeno total (NT) en los reactores batch durante el test 3.....	60
Tabla 27. Concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y PHBs en los reactores batch durante el test 3.....	61
Tabla 29. Valores promedio de COT, CI y NT en el fotobiorreactor tubular.....	66
Tabla 30. Oxígeno disuelto y temperatura en el caldo de cultivo en el fotobiorreactor tubular	67
Tabla 31. Concentración de SST y productividad en el fotobiorreactor tubular	67
Tabla 32. Concentración de aniones (N-NO ₂ ⁻ , N-NO ₃ ⁻ , P-PO ₄ ⁻³ , SO ₄ ⁻²) en el fotobiorreactor tubular	68
Tabla 33. Evolución de las poblaciones del inóculo durante la operación en el fotobiorreactor tubular	69

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Gráfico evolución de la concentración de CO ₂ en la atmósfera de los últimos años. Fuente: climate.nasa.gov	12
Imagen 2. Proceso de producción y tratamiento de biogás hasta su aprovechamiento energético	16
Imagen 3. Fórmula química del PHB.....	25
Imagen 4. Proceso de síntesis y biodegradación del PHB	26
Imagen 5. Filamentos de <i>N. muscorum</i>	27
Imagen 6. Esquema del sistema de biorreactores	31
Imagen 7. Diagrama de flujo del fotobiorreactor tubular	37
Imagen 8. Cámara de mezcla y columna de absorción del sistema experimental ..	38
Imagen 9. Fotobiorreactor tubular	39



ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Concentración de CO ₂ durante el test 1	46
Gráfica 2. pH en los reactores durante el test 1	47
Gráfica 3. Concentración de CO ₂ durante el test 2	52
Gráfica 4. pH en los reactores durante el test 2	53
Gráfica 5. Concentración de CO ₂ durante el test 3	57
Gráfica 6. pH durante el test 3	58
Gráfica 7. Eliminación de CO ₂ y H ₂ S (%) en el fotobiorreactor tubular	63
Gráfica 8. Composición del biometano en el fotobiorreactor tubular	64
Gráfica 9. Valores de pH en el fotobiorreactor tubular	65



1 INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática del dióxido de carbono

Las emisiones de CO₂ son las principales causantes del cambio climático. Estas se producen, en su mayoría, debido a la utilización desmedida de combustibles fósiles y han provocado niveles de CO₂ en la atmósfera que han aumentado un 30% desde la etapa preindustrial (Anderson y col., 2016; López y col., 2013; IPCC 2013).

La concentración de CO₂ en la atmósfera continúa creciendo año tras año tal y como se muestra en la imagen 1 obtenida a través del instituto dedicado al cambio climático de la NASA, que recoge los datos de concentración de CO₂ en la atmósfera desde el observatorio de Mauna Loa en Hawaii desde el año 2005:

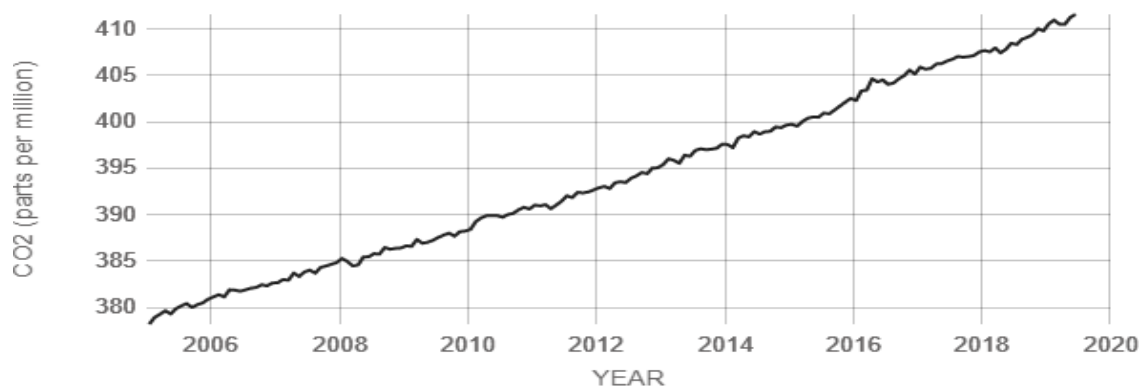


Imagen 1. Gráfico evolución de la concentración de CO₂ en la atmósfera de los últimos años. Fuente: climate.nasa.gov

Como se puede observar, la concentración de CO₂ no ha cesado en su ascenso a pesar de la creciente inversión y desarrollo de energías renovables y la mejora de las tecnologías de producción y transformación de energía, que presentan hoy en día unos rendimientos mucho mayores a los anteriores.

1.2 Producción de biogás

El biogás es producido mediante un proceso de digestión anaerobia de materia orgánica, como los lodos de las estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas (EDAR) o la fracción orgánica de residuos domésticos, además de residuos de industrias alimentarias y papeleras (Awe y col., 2018).

La materia orgánica también puede ser descompuesta en condiciones aeróbicas a partir de microorganismos (bacterias y protozoos, principalmente) tras un proceso exotérmico en el que la materia orgánica se transforma en compost, CO₂, agua y minerales. A diferencia del proceso anaerobio, no se obtiene un producto aprovechable energéticamente (biogás). Económicamente es menos rentable debido a la oxigenación necesaria para el proceso (Shilev y col., 2007)

El proceso de digestión anaerobia se lleva a cabo en cuatro fases mezclando procesos químicos y biológicos siendo, en este orden: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Wilken y col., 2017)

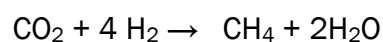
En primer lugar, la hidrólisis consiste en la rotura de moléculas de larga cadena en otras más simples. La biomasa está compuesta por grandes polímeros, principalmente proteínas, grasas y carbohidratos que, tras este proceso, se reducen a aminoácidos, ácidos grasos y azúcares simples. Algunos de estos productos, como el hidrógeno y el acetato, servirán como iniciador de la metanogénesis. La mayoría, sin embargo, deberán pasar previamente por un proceso de acidogénesis para potenciar su rotura y producir metano.

La acidogénesis se lleva a cabo por bacterias acidogénicas que dividen moléculas grandes que aún quedan en el digestor. Estas bacterias originan un ambiente ácido en el tanque, produciendo amoníaco, hidrógeno, CO₂, H₂S y ácidos grasos volátiles, entre otros. Estos compuestos protagonizarán la problemática de utilización del biogás.

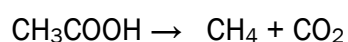
El proceso de acidogénesis no es suficiente para la producción de metano, por lo que es necesario un proceso intermedio denominado acetogénesis. Los microorganismos encargados de esta fase convierten parte de los productos generados durante la acidogénesis en ácido acético, hidrógeno y CO₂, productos útiles para la producción de metano.

La última etapa es la metanización. En ella, se produce metano a partir de los productos de la acetogénesis. También se utilizan productos de las etapas anteriores, aunque en menor medida.

Las reacciones de metanización llevadas a cabo son las siguientes:



(Reacción de metanización a partir de la hidrogenación del CO₂)



(Reacción de metanización a partir de la descomposición del ácido acético)

Aunque el metano también puede ser producido a partir de la hidrogenación del CO_2 , la mayor parte se produce a través de la reacción de descomposición del ácido acético.

El producto gaseoso final es el biogás, una mezcla de metano y CO_2 , principalmente. También se produce un lodo o fracción sólida que contiene la parte que no es digerida anaeróbicamente. A esta parte se le conoce como digestato y es utilizado como fertilizante debido a su alto contenido en nutrientes. Sin embargo, su desarrollo se ve frenado debido a problemas de contaminación del suelo y de dificultad de transporte debido a su alto contenido en agua. Contando con su utilización como biofertilizante, el balance de residuos derivados del proceso se reduce a prácticamente cero.

A escala industrial, la producción del biogás se lleva a cabo en biodigestores anaerobios, donde se crea el ecosistema óptimo para el proceso. Existen diferentes tecnologías para la producción de biogás, como la digestión en base seca, digestión en un paso o dos pasos. Dependiendo de ello, de la materia prima y el sistema de almacenamiento y tratamiento se obtendrá un biogás con diferente composición y pureza. PlanET Biogas Solutions Inc., EnviTec Anlagenbau GmbH & Co KG, agriKomp GmbH... son varios ejemplos de plantas dedicadas a la producción de biogás a escala industrial.

La composición del biogás en función del residuo utilizado como materia prima se detalla en la tabla 1.

	Residuo urbano	Lodos EDAR	Residuo agrónomo	Residuo industria alimentaria
CH_4 %vol	50-60	55-77	50-75	60-80
CO_2 %vol	34-38	19-45	19-50	26
N_2 %vol	0-5	<1	<1	
O_2 %vol	0-1	<1-2	<1-3	
H_2O	Saturación	Saturación	Saturación	Saturación
H_2S mg/m ³	70-650	63-3000	3-7000	<21500
NH_3 ppm			50-100	
Siloxanos ppm		2-15	<0,4	

Tabla 1. Composición del biogás (Bailón y col., 2012)

Como se puede observar en la tabla 1, el metano es el componente principal del biogás, puede oscilar entre 40 – 80 % en volumen. También contiene CO₂ y otros gases en pequeñas cantidades como H₂S, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, compuestos orgánicos de cadena corta como ácidos orgánicos volátiles y siloxanos y vapor de agua.

1.3 Biogás como combustible. Tratamiento de revalorización

El uso de este gas renovable en detrimento de otras fuentes de energía no renovables es crítico en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero para llegar a los objetivos impuestos por el acuerdo de París.

Por ello, según el Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE), el biogás es la única energía renovable que puede usarse para cualquiera de las grandes aplicaciones energéticas: eléctrica, térmica o como carburante.

Además de ser una fuente de energía renovable, el proceso de digestión anaerobia contribuye a la reducción de residuos en los vertederos y de la cantidad de gases de efecto invernadero enviados a la atmósfera. Contando con el CO₂ producido durante el proceso, el balance global de la emisión y captación de CO₂, por las plantas que lo aprovecharán y serán utilizadas para la producción de biogás, es cero.

Sin embargo, la inversión en este biocombustible se ve frenada debido al tratamiento que hay que realizar posteriormente ya que algunos de sus componentes (H₂S, siloxanos, amoníaco...) pueden ocasionar problemas en la maquinaria durante la combustión.

En este sentido, el CO₂ y N₂ producen una disminución en el poder calorífico del biogás, el O₂ conlleva peligro de explosión y el H₂S y el NH₃ son altamente corrosivos para la maquinaria. Del mismo modo, la deposición de siloxanos como inquemados tras el proceso de combustión conllevan un mal funcionamiento en la instrumentación de la instalación (Abatzoglou y col., 2009; Persson y col., 2007; Ryckeboesch y col., 2011).

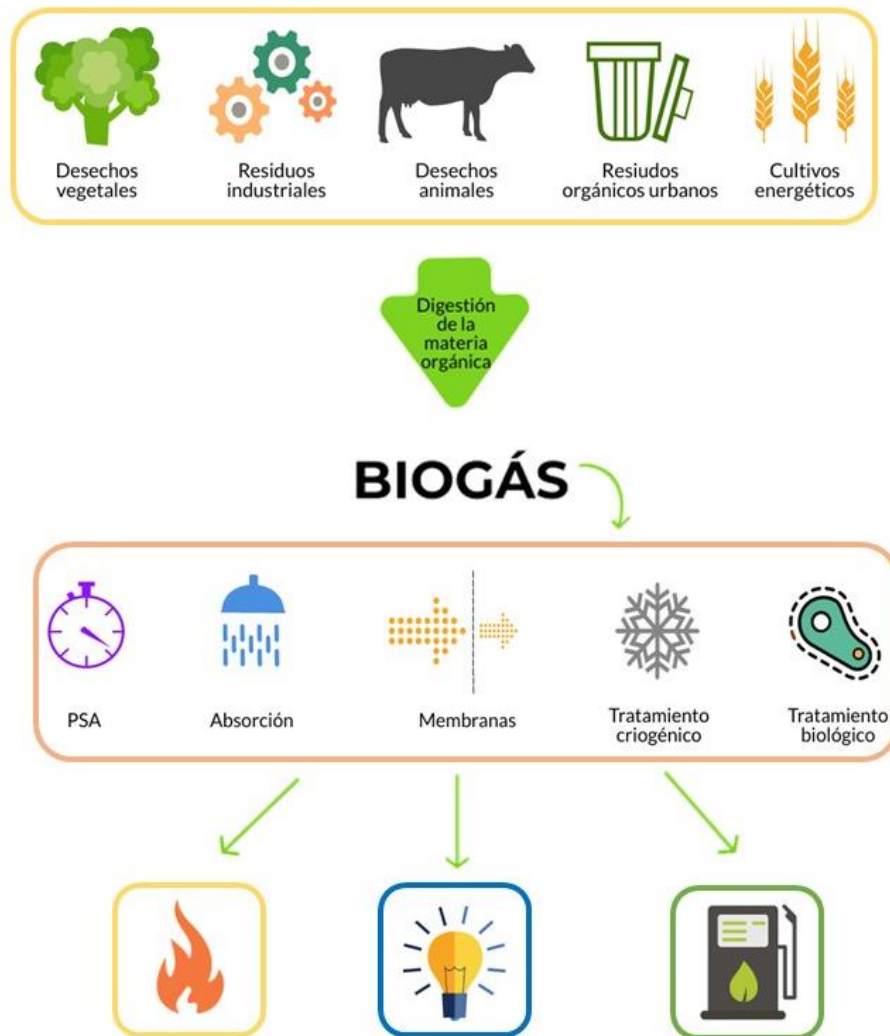


Imagen 2. Proceso de producción y tratamiento de biogás hasta su aprovechamiento energético (adaptado de Wilken y col., 2017)

Tras la separación de las impurezas, el gas resultante, conocido como biometano, adquirirá unas características similares a las del gas natural, aunque, debido a la presencia de carburos de cadenas más largas en el gas natural, el poder calorífico del gas natural será algo superior al del biometano. Una vez obtenido el biometano, éste puede ser utilizado bien para su inyección directa en la red de gas natural o como combustible de vehículos, pero, en ambos casos, deberá cumplir ciertas especificaciones y requisitos en cuanto a su composición (Sun y col., 2015).

En particular, para su distribución en la red española de gas natural existen ciertas restricciones sobre su nivel de pureza que vienen detallados en los protocolos de detalle PD-01 y PD-02, resolución 8 de octubre de 2018 del Real Decreto 949/2001, por la que se especifica la calidad del biometano (Tabla 2.. Especificaciones de

calidad del gas procedentes de fuentes no convencionales introducido en el sistema gasista, BOE-A-2018-14557.Tabla 2).

Para su inyección en redes de distribución deberá tener una composición en metano superior al 90%, un contenido en oxígeno inferior al 1%, contenido de CO₂ inferior al 2%, además de limitaciones en la concentración de otros componentes como hidrógeno, monóxido de carbono, amoníaco, siloxanos, mercurio, derivados del benceno y microorganismos.

Componente	Unidad	Mínimo	Máximo
Metano	mol %	90	
CO ₂	mol %		2
H ₂	mol %		5
C. Halogenados	mg/m ³		
Amoníaco	mg/m ³		3
Mercurio			1
Siloxanos	mg/m ³		10
Benceno, Tolueno, Xileno	mg/m ³		500
Microorganismos		Técnicamente puro	
Polvo/Partículas		Técnicamente puro	

Tabla 2.. Especificaciones de calidad del gas procedentes de fuentes no convencionales introducido en el sistema gasista, BOE-A-2018-14557.(España, 2018)

*Los valores de la tabla 2 están expresados en condiciones de referencia: [0°C, Volumen (0 °C, 1,01325 bar)]

Además, la legislación suele incluir un poder calorífico mínimo.

Existen diferentes métodos para realizar el acondicionamiento o *upgrading* de biogás que se elegirán en función de su coste, eficacia, concentraciones de impurezas, necesidad de reactivos y de equipamiento. Por lo general, los tratamientos utilizados en la actualidad se basan en procesos físico-químicos, y su coste elevado conlleva que el biogás no sea un combustible económicamente atractivo con respecto a los combustibles fósiles, siendo su poder calorífico inferior y su coste de obtención mayor. Todo ello se traduce en menos investigación, menor inversión en nuevas tecnologías y, por tanto, en una baja eficiencia del proceso productivo (Toledo-Cervantes y col., 2016).

1.3.1 Técnicas fisicoquímicas para la eliminación de impurezas

En función de la impureza a eliminar, las técnicas de eliminación son las siguientes.

1.3.1.1 Eliminación del dióxido de carbono

La técnica más utilizada es la absorción en la que se utilizan disolventes para los cuales el CO₂ presenta una alta solubilidad, dominante con respecto a la del metano (Thrän y col., 2014a). Tras el proceso, se liberará el metano en una corriente gaseosa mientras que el CO₂ permanecerá con la corriente líquida del disolvente. Los disolventes más utilizados son agua, aminas o disolventes orgánicos (Awe y col., 2018).

También pueden utilizarse técnicas fisicoquímicas como la adsorción. En el caso particular del biogás, se utiliza una técnica conocida como PSA (*pressure swing adsorption*) en columnas empacadas verticales con adsorbentes como carbón activo, sílica-gel y zeolitas, entre otros, con un proceso que engloba secuencias de adsorción del gas, despresurización, desorción y posterior presurización (Patterson y col., 2011). Es una técnica muy efectiva para la separación de CO₂ del metano ya que aprovechan la diferencia de comportamiento que presentan estos dos gases sobre la superficie tras ser sometidos a diferencias de presión. Sin embargo, ha de tener una etapa previa de secado y haber separado el H₂S previamente por su dificultad a la hora de la desorción (Allegue y col., 2014).

Las tecnologías basadas en membranas también son utilizadas para la eliminación del CO₂ presente en el biogás. Mediante el uso de una membrana semipermeable el CO₂ pasará a través de la membrana debido a su mayor facilidad para atravesar la barrera, dejando la corriente de metano exenta de este componente (Bauer y col., 2013).

Finalmente, la diferencia en los puntos de ebullición de ambos componentes puede ser utilizada para separarlos mediante destilación criogénica.

1.3.1.2 Eliminación del vapor de agua

El biogás, al salir del biodigestor, también tiene vapor de agua que, de no ser retirado condensaría en las tuberías y sería una causa de corrosión (Allegue y col., 2014).

Este vapor de agua se puede separar mediante condensación, absorción en soluciones de glicol o adsorción en sílica-gel, óxidos de aluminio o tamices moleculares (Hosseini y col., 2014)

Mediante un aumento de la presión y disminución de la temperatura, el vapor de agua condensará y con una posterior descompresión seguida de un enfriamiento, el vapor de agua será fácilmente separado del resto de la corriente (Awe y col., 2018).

1.3.1.3 Eliminación del ácido sulfhídrico

El H_2S , producido durante la reducción por parte de los microorganismos del azufre contenido en los compuestos orgánicos digeridos, se separa del metano en casi todas las técnicas de valorización de biogás. La eficiencia de la técnica utilizada conlleva mayor coste y será elegida en función de las necesidades requeridas para el producto final.

Para la eliminación del H_2S se utilizan columnas de absorción, siendo la absorción química uno de los métodos más utilizados, utilizando agua, aminas o disolventes orgánicos.

Otra opción para la eliminación del H_2S es la adsorción, utilizando carbón activo como adsorbente de tal forma que el H_2S se quedará adherido a la superficie de este material. También se recurre a la impregnación de la superficie de carbón activo con yoduro de potasio o permanganato, carbonato de potasio u óxido de zinc como catalizadores (Hosseini y col., 2014)

La precipitación es una alternativa que se implementa en el propio digestor anaerobio mediante la adición de iones férricos y ferrosos en forma de cloruros o sulfatos. Se formarán sales de sulfatos férricos que precipitarán y serán eliminados junto con el digestato, evitando que el H_2S salga en el biogás (Persson y col., 2007).

1.3.1.4 Eliminación de los siloxanos

Los siloxanos, presentes en muy bajas concentraciones, están presentes en el biogás debido, principalmente, a la presencia de productos cosméticos en las aguas residuales (Gilson y col. 2013). Son altamente perjudiciales para el funcionamiento de maquinaria ya que cuando están presentes en un proceso de combustión del biogás, se convierten en óxido de silicio que se deposita en los equipos y conlleva la pérdida de rendimiento del sistema y pueden causar averías en los mismos (Petersson y col., 2009).

Los siloxanos pueden ser eliminados mediante adsorción en carbón activo pero, este no se regenera fácilmente por lo que el coste es elevado (Persson y col., 2007;

Ryckebosch y col., 2011). También mediante absorción, usando disolventes orgánicos.

1.3.1.5 Eliminación del amoniaco

El amoniaco presente en el biogás, debido a su formación durante el proceso de biodegradación de las proteínas, se separa de la corriente principal gracias a su alta solubilidad en agua. Si su concentración es baja, suele ser eliminado a la vez que el vapor de agua (Petersson y col., 2009).

1.3.2 Técnicas fisicoquímicas disponibles para la revalorización del biogás

Anteriormente, se han enumerado técnicas de eliminación de cada una de las impurezas presentes en el biogás. A continuación, se detallarán algunas de las tecnologías disponibles comercialmente utilizadas para la revalorización del biogás industrialmente o bien que se encuentran todavía en etapa de investigación (Petersson y col., 2009; Wilken y col., 2017).

1.3.2.1 PSA (pressure swing adsorption)

Ya se ha mencionado anteriormente el uso de la técnica de PSA (*pressure swing adsorption*) para la eliminación del CO₂ mediante su adsorción sobre la superficie de un material adsorbente activo, comúnmente zeolitas o carbón activo, sometido a una elevada presión. Este material adsorbente se regenera de manera secuencial mediante la despresurización de la cámara y, posteriormente, comienza la carga de nuevo. Una planta industrial para este fin dispone de varias torres trabajando en paralelo para que, cuando en una de las líneas, el material adsorbente se satura, la corriente de biogás a tratar pasa por la siguiente línea que ha sido previamente regenerada y, mientras tanto, la línea saturada pasa a fase de regeneración. Durante esta fase de regeneración, la presión del recipiente disminuye en varios pasos. El gas desorbido durante la primera o segunda etapa de despresurización suele ser devuelto a la corriente de biogás sin tratar, mientras que las corrientes de gas resultantes de las siguientes etapas pueden ser enviadas a la columna siguiente puesto que se trata, casi por completo, de metano (Grande, 2011; Bauer y col., 2013; Muñoz y col., 2015)

Si la corriente de biogás contiene H₂S, este será irreversiblemente adsorbido por el material adsorbente, impidiendo su regeneración. Algo parecido pasa con la presencia de vapor de agua, que destruye la estructura de este material. Por esto,

estos dos componentes han de ser eliminados de la corriente antes de entrar en las columnas de PSA (Allegue y col., 2014).

1.3.2.2 Técnicas de absorción. Disolventes utilizados.

También se ha hablado del uso de técnicas de absorción para la eliminación de CO_2 y otras impurezas como el H_2S . Este método, como ya se ha comentado, se basa en que el CO_2 y otras impurezas son más soluble que el metano en ciertos disolventes (Thrän y col., 2014b; Towler y col., 2013). La implementación industrial de esta técnica se realiza con una columna empacada para aumentar la superficie de contacto entre la corriente de biogás y la de líquido, que fluyen en contracorriente por la columna. El líquido abandonará la columna enriquecido en las impurezas mientras que la corriente gaseosa habrá aumentado su concentración en CH_4 .

A continuación, se van a detallar los tres ejemplos de tecnologías de absorción utilizadas en función del líquido absorbente que son: agua, compuestos orgánicos para absorción física y compuestos orgánicos para absorción química.

1.3.2.2.1 Agua

La solubilidad del CO_2 y demás impurezas en agua es más alta que la del metano (Towler y col., 2013) por lo que será disuelto por la corriente de agua mientras que la corriente de gas a la salida de la columna estará enriquecida en metano. Esta es la técnica más utilizada para la revalorización del biogás (Towler y col., 2013).

Este proceso se realiza a presiones de entre 6 y 10 bar para realizar la separación (Abatzoglou y col., 2009; "EBA Biomethane & Biogas Report", 2015; Muñoz y col., 2015; Ryckebosch y col., 2011; Tynell y col., 2007). La corriente de agua con los contaminantes del biogás pasará entonces por un flash donde se separará una corriente principalmente de agua de una corriente gaseosa mayormente formada por CO_2 , pero que contiene una pequeña parte de metano. Debido a la presencia de metano, esta corriente será redirigida junto con la corriente de entrada a la columna para una mayor eficiencia del sistema (Kapdi y col., 2005; Muñoz y col., 2015).

Para la reutilización de la corriente de agua, ésta deberá ser tratada en una columna de desorción donde será puesta en contacto con aire, de tal forma que las impurezas residuales sean expulsadas junto con el aire, sin embargo, ni el N_2 ni el O_2 podrán ser separados de la corriente líquida (Awe y col., 2018).

1.3.2.2.2 Disolvente orgánico

En el caso de la utilización de un disolvente orgánico como, por ejemplo, polietilenglicol, la planta de revalorización será más pequeña puesto que el CO_2 es

más soluble en estos disolventes que en agua. Además, el H_2S , agua, oxígeno y nitrógeno pueden ser eliminados simultáneamente con el CO_2 .

Existen disolventes industriales para esta aplicación como el Selexol® y Genosorb® con gran afinidad por el CO_2 y H_2S , compuestos por una mezcla de dimetiléteres y polietilenglicol (Tock y col., 2010).

1.3.2.2.3 Aminas

En la absorción química, se usan aminas (monoetanolaminas, dietanolaminas, etc.) y soluciones alcalinas (KOH , K_2CO_3 , $Fe(OH)_3$, $NaOH$, (Lasocki y col., 2015) como disolventes junto con una columna empacada. El disolvente utilizado se regenerará mediante calor, aunque se pierde parte del disolvente en cada ciclo debido a su evaporación. En caso de que el biogás contenga H_2S , este deberá ser separado antes del tratamiento (Muñoz y col., 2015).

1.3.2.3 Técnica de membranas

Estas membranas se producen a partir de materiales permeables ante el CO_2 , agua, H_2S y O_2 , mientras que el nitrógeno y metano únicamente atraviesan la membrana en muy bajas concentraciones (Ryckebosch y col., 2011).

Mediante un proceso de enfriamiento de la corriente de salida de la membrana que contiene el metano y nitrógeno se separan estos dos componentes debido a la diferencia de sus puntos de ebullición. Aunque se trata de una técnica con una tasa de eliminación de impurezas muy alta, no está implementada industrialmente debido a su elevado coste energético (Bauer y col., 2013; Thrän y col., 2014a)

Estas técnicas físico-químicas convencionales presentan un rendimiento elevado debido conocimiento y control que ya se tiene sobre ellas. No obstante, conllevan un alto coste energético y un importante uso de compuestos químicos, lo que limita estos métodos económica y medioambientalmente (Muñoz col., 2015)

1.3.3 Técnicas biológicas disponibles para la revalorización del biogás

Los métodos biológicos tienen un impacto ambiental mucho más limitado y unos costes de operación inferiores con respecto a los de las técnicas fisicoquímicas (Muñoz y col., 2015; Raeesossadati col., 2014)), por lo que representan una alternativa muy prometedora a los métodos fisicoquímicos.

Aunque existen varias técnicas biológicas de *upgrading* de biogás, este trabajo sólo se va a centrar en procesos fotosintéticos de eliminación de CO₂ utilizando consorcios de microalgas y bacterias.

Las microalgas, microorganismos procariotas fotosintéticos, aprovechan el CO₂ del biogás como fuente de carbono siempre y cuando estén en presencia de luz tras una serie de reacciones REDOX convirtiéndolo en biomasa (López y col., 2013; Raeesossadati y col., 2014). Esta biomasa obtenida del proceso puede ser valorizada posteriormente para su aprovechamiento en diferentes aplicaciones.

El oxígeno expulsado tras la actividad fotosintética de las microalgas es aprovechado por bacterias oxidantes de H₂S presentes en el medio que oxidarán el H₂S, componente tóxico y altamente contaminante, convirtiéndolo en sulfato (Bahr y col., 2014). También serán capaces de oxidar compuestos orgánicos a CO₂ utilizando el O₂ liberado por la actividad fotosintética de las microalgas como aceptor de electrones (Muñoz y col., 2015; Toledo-Cervantes y col., 2016).

Para que este proceso sea posible, es necesaria la transferencia previa tanto del CO₂ como del H₂S desde el biogás a la fase líquida. Las microalgas son altamente tolerantes a concentraciones altas de CO₂, con tolerancias de hasta el 60% de CO₂ (Miyairi, 1995; Wang y col., 2013), pero su actividad puede verse inhibida por la presencia de H₂S (Kao y col., 2012) por lo que la actividad oxidante de las bacterias es crucial para el proceso. El CO₂ y demás impurezas gaseosas, por tanto, han de disolverse en el medio basal para lo que se utiliza una columna de absorción externa interconectada con el fotobiorreactor. El medio de cultivo del fotobiorreactor se recircula a través de la columna en contracorriente con el biogás, teniendo lugar la transferencia de ambos contaminantes. La alcalinidad de la mezcla del medio es una variable limitante del proceso, siendo un potenciador para la transferencia de masa del CO₂ y del H₂S del biogás al medio por tratarse de gases ácidos (Perez-García y col., 2011).

Una vez se han disuelto el CO₂ y el H₂S en el medio, la corriente gaseosa de salida ha sido purificada, obteniendo un flujo de biometano. Por otro lado, el medio con el CO₂ y el H₂S del biogás ya disueltos pasa por el fotobiorreactor donde los microorganismos realizarán la secuencia de reacciones fotosintéticas y oxidantes mencionadas anteriormente convirtiendo este CO₂ en biomasa mediante un proceso fotosintético por parte de las microalgas.

El funcionamiento y viabilidad de este proceso en fotobiorreactores abiertos ha sido ampliamente demostrado (Muñoz y col., 2015; Toledo-Cervantes y col., 2016). Sin embargo, hay estudios que indican el interés de su implementación en fotobiorreactores cerrados puesto que, ofrecen una mayor eficiencia fotosintética y altos rendimientos de productividad de biomasa (Arbib y col., 2013; Chisti, 2007; Muñoz y col., 2015).

Con el fin de la valorización de la biomasa producida a lo largo de este proceso, se estudió la opción de la acumulación de bioplásticos; otra vía de investigación actualmente en auge debido a los problemas acarreados por la utilización de plásticos convencionales.

1.4 Problemática plásticos derivados del petróleo

La producción masiva de plásticos conlleva un gran impacto medioambiental, no sólo a lo largo de su proceso productivo sino, también, debido a su nula biodegradabilidad y, por lo tanto, su problemático desecho por su difícil tratamiento y la contaminación de los recursos naturales como ríos y mares. La tasa anual de producción de residuos plásticos asciende a 25×10^6 toneladas (Khardenavis y col., 2007; Li y col., 2008; Zhu y col., 2003).

Además de los problemas ecológicos que conlleva la producción de plásticos, también se está estudiando la migración de componentes tóxicos desde estos materiales hasta los compuestos que los acompañan, especialmente en los embalajes de productos alimentarios, sobre todo en el caso de los plásticos reciclados. Por último, el reciclaje del plástico tiene un coste económico elevado y una repetitividad limitada a un número determinado de usos en función del producto (Melnicki y col., 2009; Rivard y col., 1995; Witt y col., 1997).

1.5 Biopolímeros

Los biopolímeros se presentan hoy en día como la principal alternativa para reducir el impacto medioambiental producido por los plásticos provenientes de la explotación petrolífera. En función de la materia prima y el proceso de producción, existen diferentes clases de bioplásticos.

1.5.1 PHAs

Dentro de los bioplásticos, los PHAs, poli-hidroxialcanoatos, son de los más estudiados actualmente debido a sus características similares a las de los plásticos provenientes del petróleo. Los PHAs son biopolímeros que acumulan ciertos microorganismos como reserva de energía, especialmente cuando se encuentran bajo limitación de componentes como oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre o elementos traza y, a su vez, tienen exceso de fuentes de carbono.

El PHB, ácido poli-β-hidroxibutírico (Imagen 3), es una de las variantes de los PHAs más estudiadas debido a sus semejantes características con el polipropileno (PP) (Tabla 3) (Bucci y col., 2007; Lee, 1996). Este bioplástico presenta una elevada procesabilidad siendo posible su extrusión, moldeo, conversión a fibras, láminas y su adición a otras clases de bioplásticos para mejorar sus características (Kabilan y col., 2012; Khosravi-Darani y col., 2015).

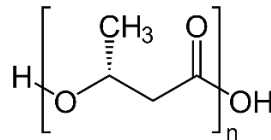


Imagen 3. Fórmula química del PHB

Es un material con estructura parcialmente cristalina, con una alta temperatura de fusión. No es soluble en agua, pero es completamente biodegradable. Tiene actividad óptica y propiedades piezoeléctricas (Rosa y col., 2004). Como ya se ha mencionado, algunas de sus propiedades, como por ejemplo su módulo de Young y su resistencia a la tracción, se asemejan a las del polipropileno. Sin embargo, su elongación al romper es ligeramente inferior (McChalicher y col., 2007).

Propiedades	PHB	PP
Temperatura de fusión (°C)	177	176
Cristalinidad (%)	60	50-70
Resistencia a la tracción (Mpa)	43	38
Alargamiento de rotura (%)	5	400

Tabla 3. Propiedades físicas del PHB y PP (Balaji y col., 2013)

El PHB se sintetiza en numerosos microorganismos, con fines de almacenamiento energético, incluyendo bacterias (Shrivastav y col., 2010), organismos recombinantes (Choi y col., 1999) y cianobacterias (Balaji y col., 2013; Haase y col., 2012a; Nishioka y col., 2001), entre otros. El mecanismo de síntesis pasa por la obtención de la acetil coenzima A (Acetil-CoA) mediante tres reacciones consecutivas (Balaji y col., 2013; Oeding y col., 1973). En primer lugar, la β-cetoliasa convierte dos moléculas de Acetil-CoA en una de acetoacetil-CoA. A continuación, la enzima acetoacetyl-CoA reductasa se encarga de convertir la Acetoactil-CoA en 3-

hidroxibutiril-CoA reduciendo un NADPH. Por último, la enzima PHB sintetasa cataliza la reacción que da lugar a una molécula de PHB a partir de la anterior (Imagen 4).

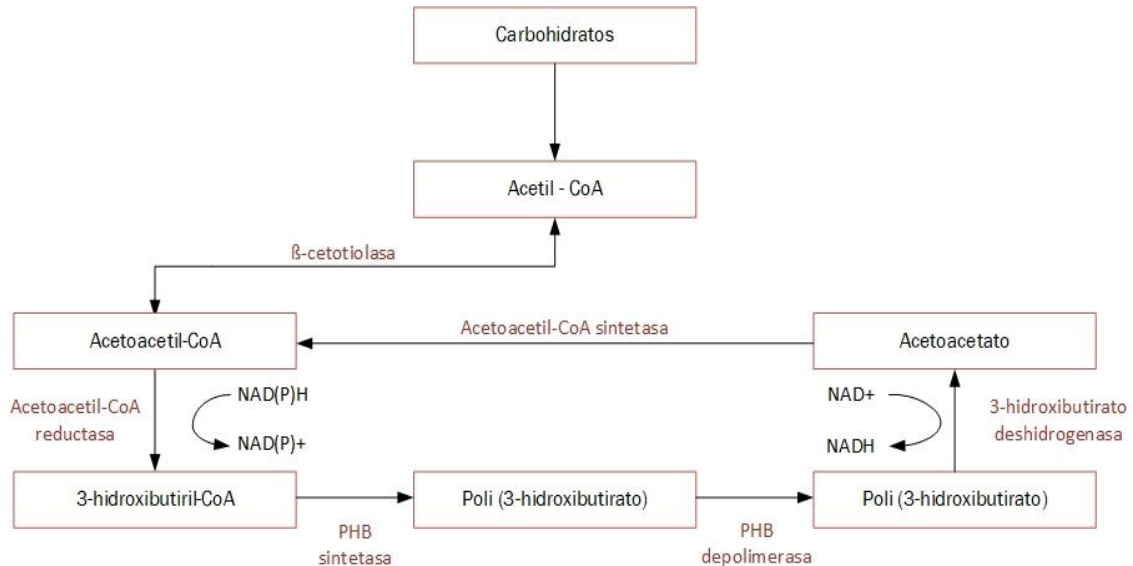


Imagen 4. Proceso de síntesis y biodegradación del PHB (Adaptado de Singh y col., 2017)

El proceso productivo explicado anteriormente tiene ciertos factores limitantes que impiden su desarrollo a escala industrial: el elevado coste económico del sustrato de carbono a utilizar y del aporte de oxígeno necesario (Khosravi-Darani y col., 2015). También influye la cepa de microorganismo utilizada, el proceso de inoculación y cultivo y el tratamiento final al que haya que someter el bioplástico.

Ciertas cianobacterias, organismos foto-autótrofos, han demostrado la capacidad de síntesis de PHB en condiciones foto-autotróficas (Haase y col., 2012b; Nishioka y col., 2001). Debido a esta actividad fotosintética, reducen al mínimo el requerimiento nutricional del proceso, surgiendo como una alternativa a la producción mediante procesos de fermentación bacterianos (Balaji y col., 2013).

De este modo, mediante la utilización de cianobacterias con el fin de producir PHBs se elimina CO₂, principal responsable del efecto invernadero. Para su crecimiento y mantenimiento también necesitan nutrientes inorgánicos como fosfato, nitrato, magnesio y calcio y macronutrientes derivados del hierro, magnesio, zinc, cobalto y cobre (Sharma y col., 2005). Además, estos microorganismos pueden cultivarse utilizando aguas residuales como fuente nutricional debido a la habilidad de utilizar el nitrógeno y fósforo. En particular, las aguas residuales de granjas, piscifactorías y estaciones depuradoras de aguas residuales son ricas en estos componentes.

Entre las cianobacterias que han demostrado acumular PHBs se encuentra la cianobacteria *Nostoc muscorum*. Pertenece a la familia de las Nostocaceae del reino de las bacterias, filo cyanobacteria. Este tipo de bacterias, conocidas también como algas verdeazuladas, se caracterizan por su actividad fotosintética y la capacidad de fijación del nitrógeno inorgánico (Rimsha y col., 2014; Saperstiein y col., 2012). Comparten características con bacterias gram negativas y organismos eucariotas fotosintéticos. Tienen una estructura celular filamentosa, como se puede observar en la imagen 5.



Imagen 5. Filamentos de *N. muscorum*. Foto: Roger Burks (California University en Riverside), Mark Schneegurt (Wichita State University) y Cyanosite (Purdue University)

El hábitat ideal para esta cianobacteria presenta un pH de entre 7,0 y 8,5 y una intensidad luminosa algo inferior que la de la luz natural (Muñoz y col., 2015; Sharma y col., 2014). Todos estos factores son críticos en su productividad y rendimientos.

Esta cianobacteria ha demostrado acumular PHB bajo condiciones de estrés por déficit nutricional de nitrógeno y fósforo en el medio (Sharma y col., 2005; Shrivastav y col., 2010), así como en presencia de ciertos sustratos de carbono como ácidos grasos volátiles (ácido acético y ácido valérico) y otros compuestos orgánicos de cadena corta (glucosa o glicerina, entre otros) que almacenan como reserva energética (Haase y col., 2012b; Sharma y col., 2005).



2 OBJETIVOS

El objetivo final de este trabajo es la implementación de un proceso biotecnológico de *upgrading* de biogás en un fotobiorreactor tubular cerrado inoculado con un consorcio de cianobacterias y bacterias con el fin de obtener un biometano apto para la inserción en las redes de distribución españolas y el aprovechamiento de la biomasa producida para la producción de un compuesto de alto valor añadido: PHBs. Con este último objetivo, se estudiará la capacidad de acumulación de estos bioplásticos por parte de la cianobacteria *Nostoc muscorum* con CO_2 como sustrato. Para ello se someterá a esta cianobacteria a diferentes niveles de estrés a través de limitaciones de nitrógeno y fósforo y a distintas concentraciones y fuentes de carbono.



3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Acumulación de PHBs

3.1.1 Inóculo y medio de cultivo

El inóculo de la cianobacteria *Nostoc muscorum* (1453-12b) se obtuvo de la colección de algas (SAG) de la Universidad de Göttingen.

Posteriormente, la cianobacteria fue cultivada en condiciones estériles en medio mineral Esddekok+Salze modificado (Medio ES) previamente esterilizado (SAG 2018) que se detalla en la tabla 4. Todos los reactivos se obtuvieron de Panreac ® con una pureza de, al menos, 99%.

	Composición (g/L)
KNO ₃	1,2
K ₂ HPO ₄	0,02
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,02
Disolución de micronutrientes*	5 (mL/L)*

Tabla 4. ES medio basal modificado

Por su parte, la solución de micronutrientes tiene una composición de:

*Disolución de micronutrientes	Composición (g/L)
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,002
H ₃ BO ₃	0,01
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,001
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,001
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,0005
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,7
EDTA	1,01

Tabla 5. Disolución de micronutrientes

3.1.2 Ensayos batch

Se realizaron 3 experimentos con el fin de optimizar la acumulación de PHBs en la cianobacteria *N. muscorum*, aplicando diferentes condiciones de estrés debidas a la limitación de nitratos y fosfatos en el medio y la adición de diversas fuentes de carbono.

Estos experimentos se llevaron a cabo en biorreactores cerrados agitados magnéticamente (Imagen 6). Todos ellos disponían de un volumen nominal de 2,2 L. Estos biorreactores contenían 660 mL de medio inoculado y el resto del volumen, el espacio de cabezas, se llenó de un gas sintético que contenía un 30% en volumen de CO₂ y el resto de N₂ (Abelló Linde, España). Esta mezcla de gases de N₂ y CO₂ conocida como biogón NC30 (UN 1956) se compone de N₂ E941 y CO₂ E290.

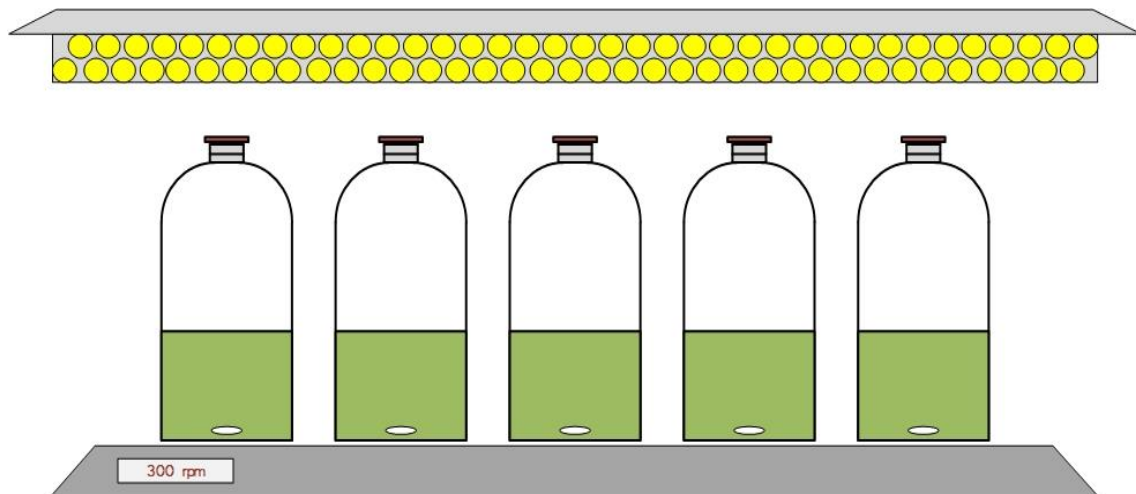


Imagen 6. Esquema del sistema de biorreactores

El inóculo se creció en biorreactores iguales a los utilizados para el experimento, empleando medio basal ES modificado, ciclos de luz:oscuridad 12h:12h y agitación magnética con una velocidad de 300rpm.

La inoculación de los biorreactores se realizó cuando el inóculo habría alcanzado la fase de crecimiento exponencial, momento en que se inició el experimento. Para ello, se centrifugó el caldo de cultivo del inóculo a 10.000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se introdujo la biomasa en cantidades idénticas en los biorreactores del experimento. Cada uno de los biorreactores ya contenía los 660mL del medio correspondiente, previamente esterilizado en un autoclave.

Finalmente, se cerraron los biorreactores y se sustituyó el aire presente en el espacio de cabezas por el biogón mediante un lavado con este gas.

Para propiciar la actividad fotosintética de las cianobacterias, todos los biorreactores se sometieron a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno mediante unos paneles LED situados sobre los mismos. Este sistema de paneles LED aportó una intensidad luminosa de $330 \text{ mmol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sobre la superficie del líquido de los biorreactores.

La agitación magnética se realizó mediante imanes situados en el interior de los biorreactores, que giraban a razón de 300 rpm.

En cada experimento se trabajó con varios biorreactores, cada uno con un nivel distinto de estrés de manera escalada, con el fin de comparar la respuesta de cada uno de ellos. Todos los ensayos se realizaron en duplicado. Además, en todos ellos se añadió un biorreactor que actuó como control.

A continuación, se detallan los distintos test realizados durante la experimentación de este proyecto:

- Test 1. Estudio de la influencia de la limitación de nutrientes (N y P) en la acumulación de PHB con control sobre el pH

Este primer test se dividió en cuatro experimentos diferenciados por la composición del medio basal en nitrógeno y fósforo.

El primer biorreactor, el control (A), incluía el medio basal ES original, con 166,24 mgN/L y un ratio N:P de 50:1. El resto de biorreactores (B, C y D) tuvieron la misma composición en nitrógeno (10 mg/L) y se diferenciaron en su contenido en fósforo, con ratios N:P de 50:1, 10:1 y 3:2.

Una vez consumido todo el CO_2 en la fase gas, se adicionan 1,5 mL de HCl 3M para el control del pH.

La tabla 6 muestra la composición en nitrógeno y fósforo inicial.

Test	N:P	N- NO_3^- (mg/L)	P- PO_4^{3-} (mg/L)
Reactor A	50:1	166,24	3,56
Reactor B	50:1	10,00	3,38
Reactor C	10:1	10,00	1,07
Reactor D	3:2	10,00	0,18

Tabla 6. Concentración inicial de nitrógeno y fósforo en el medio basal ES para los experimentos realizados en el Test 1

- Test 2. Estudio de la influencia de la limitación de nutrientes (N y P) y la adición de ácidos grasos volátiles (AGVs) en la acumulación de PHB con control sobre el pH

En el test 2 se estudió la influencia de la suplementación de AGVs, en adición a la influencia que pudiera tener la limitación de nutrientes fósforo y nitrógeno, sobre la acumulación de PHBs por parte de la cianobacteria utilizada para el estudio *N. muscorum*. Además, el pH del medio de cultivo fue controlado mediante adición HCl hasta alcanzar un pH apto para el crecimiento de los microorganismos (7,5-8).

Para ello, el test se dividió en seis experimentos, incluyendo muestras con alto y bajo contenido en nitrógeno y fósforo y adición o no adición de AGVs (ácido acético y ácido valérico), tal y como se detalla en la tabla 7.

El biorreactor A actuó como control, por lo que no tuvo limitación nutricional ni adición de AGVs. Los biorreactores B y C, por su parte, no tuvieron limitación nutricional pero sí adición de ácido acético y ácido valérico, respectivamente. Por último, los bioreactores D, E y F contenían medio basal con limitación de N (10 mg/L), a dos de los cuales (biorreactores E y F) se les adicionó ácido acético y valérico, respectivamente.

La adición de AGVs a los ensayos correspondientes se realizó en el momento en que el consumo de CO₂ disminuyó. De este modo, los AGVs pasaron a ser la nueva fuente de carbono de los microorganismos presentes.

	N- NO ₃ ⁻ (mg/L)	P- PO ₄ ³⁻ (mg/L)	AGVs	AGVs (mg/L)
Reactor A	166,24	3,56	N/A	N/A
Reactor B	166,24	3,56	Á. acético	0,08
Reactor C	166,24	3,56	Á. valérico	0,06
Reactor D	10,00	3,40	N/A	N/A
Reactor E	10,00	3,40	Á. acético	0,08
Reactor F	10,00	3,40	Á. valérico	0,06

Tabla 7. Concentración de nitrógeno y fósforo en el medio basal ES y condiciones de adición de AGVs para los experimentos realizados en el Test 2

- Test 3. Estudio de la acumulación de PHB con deficiencia de nutrientes (N y P) y adición de AGVs desde tiempo cero.

A lo largo de este test se estudió el aumento en la capacidad de estas cianobacterias de acumular PHB ante la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el medio ES modificado y la adición de AGVs como fuente adicional de carbono desde el inicio del experimento.

El biorreactor A o control disponía de medio basal ES modificado con un contenido en nitrógeno de 166,24 mg N/L y un ratio nitrógeno: fósforo de 50:1 sin adición de AGVs. El resto de biorreactores (B, C y D), se inocularon sobre medio con deficiencia de nitrógeno y fósforo. A uno de ellos no se le añadió ningún suplemento (biorreactor B), a otro se le añadió ácido acético (biorreactor C) y al último, ácido valérico (biorreactor D), con la diferencia de que en este caso los AGVs se añadieron al comienzo del experimento. Las composiciones en nitrógeno, fósforo y AGVs del medio de cada biorreactor se pueden ver resumidas en la tabla 8.

	N- NO ₃ ⁻ (mg/L)	P- PO ₄ ³⁻ (mg/L)	AGVs	AGVs (mg/L)
Reactor A	166,24	3,56		
Reactor B	0,00	0,00		
Reactor C	0,00	0,00	Á. acético	0,05
Reactor D	0,00	0,00	Á. valérico	0,04

Tabla 8. Concentración de nitrógeno y fósforo en el medio basal ES y condiciones de adición de AGVs para los experimentos realizados en el Test 3

3.1.3 Procedimiento experimental

En todos los test realizados se duplicaron los experimentos de tal forma que, se disponía de 2 biorreactores con cada una de las condiciones descritas con el objetivo de minimizar los errores causados por medición y muestreo.

Se realizó un monitoreo diario de temperatura y composición del espacio de cabezas de los biorreactores con el fin de observar la cantidad de CO₂ asimilado por las cianobacterias.

En todos los test realizados, se analizó diariamente la concentración de los componentes presentes en el espacio de cabezas mediante cromatografía de gases: CO₂, O₂, N₂. Además, se tomaron muestras de 20 mL de la fase líquida tres veces por experimento para el análisis de carbono inorgánico, carbono orgánico total y nitrógeno total (CI, COT, NT), pH, aniones, sólidos suspendidos totales (SST) y concentración de PHB; y dos veces en el caso de los ácidos grasos volátiles. Estas muestras se extraían en una campana de extracción de flujo laminar para evitar la entrada de posibles contaminantes.

Para la realización del análisis de PHB, se extrajeron 1,5 mL de cada muestra líquida y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos en tubos Eppendorf. Tras eliminar el sobrenadante, se almacenaron a -20°C hasta su análisis mediante cromatografía de gases-masas (GC-MS).

En los experimentos en los que se estudió la adición de AGVs, su concentración se determinó dos veces durante la duración del experimento utilizando un cromatógrafo de gases de Agilent Technologies modelo 7820A.

A continuación, una vez analizado el pH, se filtra la muestra líquida restante con el fin de obtener la concentración en SST. Del sobrenadante obtenido durante la filtración se extrajeron unos pocos mililitros que se vuelven a filtrar con filtros de 0,22 µm y almacenan en viales de 1mL para el análisis de la concentración de aniones por HPLC.

El resto del sobrenadante se utilizó para la determinación de TOC, IC y TN presentes en la muestra con el fin de controlar las concentraciones del medio de cultivo y la muerte celular.

3.2 Operación en continuo de un fotobiorreactor cerrado para upgrading de biogás

3.2.1 Inóculo y medio de cultivo

El inóculo utilizado para el fotobiorreactor fue obtenido de un reactor de microalgas (*HRAP* por sus siglas en inglés) en Chiclana de la Frontera, España.

Las principales poblaciones de microalgas presentes en el inóculo (con una concentración superior al 10% en lo que se refiere a individuos (Ind.) por unidad de volumen en el inóculo) se muestran en la tabla 9.

	Individuos
<i>Aphanothece</i> sp.	21%
<i>Chlorella</i> sp.	24%
<i>Mayamaea</i> sp.	12%
<i>Pseudoanabaena</i> sp.	27%

Tabla 9. Principales poblaciones de microalgas en el inóculo del fotobiorreactor tubular

El medio mineral empleado durante el desarrollo del experimento recibe el nombre de Medio Brunner Modificado (MBM) cuya composición se detalla en la Tabla 10. Todos los reactivos fueron obtenidos en Panreac ® con una pureza de, al menos, un 99%.

Reactivo	Unidades	Concentración
Na ₂ HPO ₄	g/L	2,44
KH ₂ PO ₄	g/L	1,52
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	g/L	0,2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	g/L	0,05
SL-4	mL/L	10

Tabla 10. Composición del Medio Brunner Modificado

La solución de elementos traza SL-4 estaba compuesta por:

Reactivo	Unidades	Concentración
EDTA	g/L	0,5
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	g/L	0,2
SL-6	mL/L	100

Tabla 11. Solución de elementos traza SL-4 del medio Brunner modificado

La solución de elementos traza SL-6 estaba compuesta por:

Reactivo	Unidades	Concentración
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	g/L	0,1
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	g/L	0,03
H ₃ BO ₃	g/L	0,3
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	g/L	0,2
CuCl ₂ . 2 H ₂ O	g/L	0,01
NiCl ₂ . 6 H ₂ O	g/L	0,02
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	g/L	0,03

Tabla 12. Solución de elementos traza SL-6 del medio Brunner modificado

3.2.2 Sistema experimental

El sistema experimental utilizado consta de un fotobiorreactor tubular compuesto por 12 tubos de 0,06 m de diámetro interno y 0,94 m de longitud cada uno (Imagen 7), con un volumen total de 45,5L. El fotobiorreactor está conectado a una cámara de mezcla con un volumen útil de 85,8 L, que a su vez está interconectada a columna de absorción de 2 m de altura total (1,65 m altura útil del líquido) y 0,05 m de diámetro interno, siendo el volumen de operación de 2,5 L.

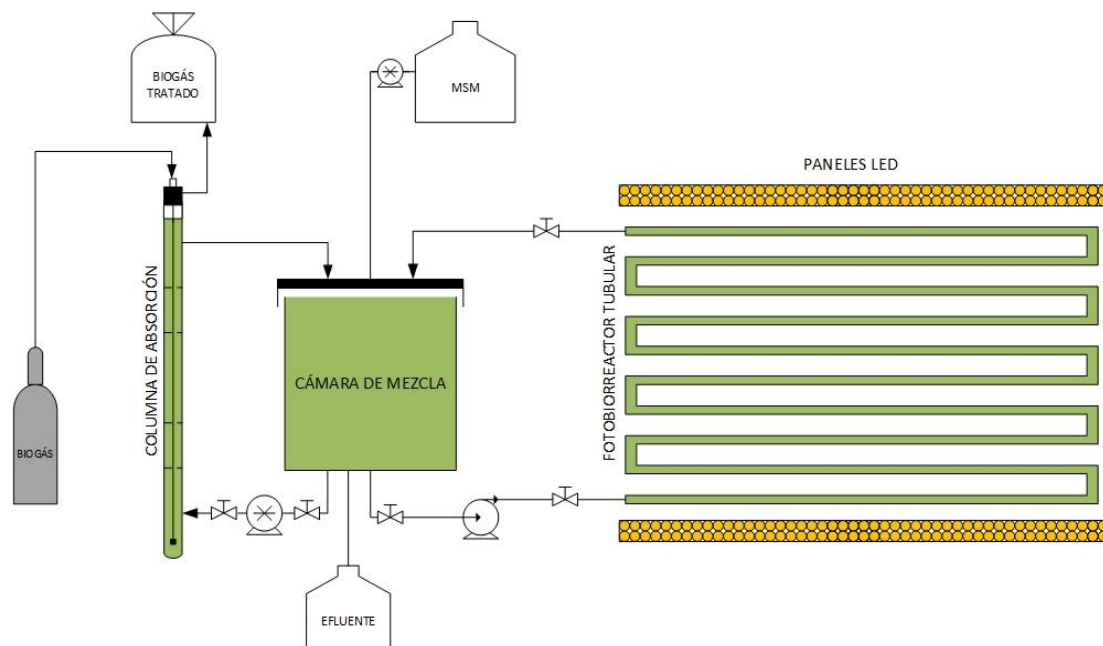


Imagen 7. Diagrama de flujo del fotobiorreactor tubular

En primer lugar, en la columna de absorción ocurre la transferencia de las impurezas de la fase gas hacia la fase líquida, es decir, del CO_2 y el H_2S .

De la columna de absorción sale, por lo tanto, una corriente líquida enriquecida en impurezas y una corriente de biometano con un nivel mínimo de las mismas.

En el fotobiorreactor ocurre la eliminación de las impurezas absorbidas por la fase líquida en la columna. Los microorganismos presentes en el caldo de cultivo consumen estas impurezas como parte de su actividad fotosintética en el caso de las microalgas, que eliminan el CO_2 y del consumo del H_2S por parte de las bacterias que lo oxidarán produciendo sulfatos.

En la parte izquierda de la imagen 8, aparece la cámara de mezcla, conectada al fotobiorreactor tubular (imagen 9) y a la columna de absorción presente en el centro de la imagen 8.



Imagen 8. Cámara de mezcla y columna de absorción del sistema experimental



Imagen 9. Fotobiorreactor tubular

La cámara de mezcla estaba cerrada herméticamente con una junta de goma y una tapa anclada por medio de tornillos. Entre esta tapa hermética y el fluido existe una tapa flotante, que sirve para evitar el contacto entre el medio y el aire existente entre ambas. De este modo, se previene la entrada de aire en el sistema que pudiera falsear los resultados y desestabilizar el proceso.

Ambas entradas a la cámara, desde la columna de absorción y desde el fotobiorreactor tubular, se encuentran en la parte superior de la misma. En la tapa superior de la cámara también se dispone de una válvula unida a un racor que sirve como tomamuestras y permite la adición del medio mineral fresco. Finalmente, las salidas hacia el fotobiorreactor y el rebose de medio mineral se localizan en la parte inferior de ambos laterales de la cámara.

La columna de absorción es alimentada por la parte inferior desde la cámara de mezcla, mediante una bomba de desplazamiento positivo de la marca Watson Marlow, modelo 520S, que transporta el medio a un caudal de entrada a la columna de $10,1 \pm 0,5$ mL/min.

En la columna también es introducido el biogás a valorizar. Este biogás se almacena en botellas a alta presión suministradas por Abelló Linde S.A. (Barcelona, España), y es transportado por diferencia de presión hasta la columna donde es introducido, de

igual manera que el medio, por la parte inferior de la columna mediante un difusor de 2 μm .

La alimentación del biogás a la columna se realiza únicamente durante las 12 horas de luz a las que se somete el fotobiorreactor tubular. El caudal alimentado se regula mediante un controlador de flujo másico de gases situado entre la botella y la cámara de mezcla de la marca Aalborg, con un rango de operación de 0 a 50 mL/min (izquierda de la imagen 8).

Durante el experimento, el caudal de biogás con el que se alimentaba la columna de absorción fue de $18,6 \pm 2,1$ mL/min de forma que la columna operó en régimen de co-corriente con una relación entre el caudal del líquido (L) y el caudal de gas (G) de $L/G = 0,5 \pm 0,0$.

La salida del biogás reacondicionado se realiza, del mismo modo que la entrada, por diferencia de presión. La columna está tapada mediante un tapón de goma de forma que no deja entrar aire al sistema. La salida del biometano se recoge en una bolsa Tedlar donde se almacena con el fin de ser posteriormente analizado. Además, se dispone de dos tomamuestras a la entrada y salida de la columna para medir la presión y la composición del gas.

En cuanto a la alimentación del fotobiorreactor tubular, el medio es transportado de la cámara de mezcla al fotobiorreactor en circuito cerrado gracias a una bomba centrífuga de la marca EBARA (número de serie DW O/E300) situada entre ambos, proporcionando una velocidad de fluido de 0,5 m/s.

La siguiente imagen muestra la situación del fotobiorreactor tubular. A los lados, se observan los paneles LED que proporcionan la intensidad luminosa media de $\sim 900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, operando en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad .

3.2.3 Procedimiento experimental

A lo largo del experimento, se sometió al sistema a diferentes etapas para la optimización de la operación. El parámetro utilizado para realizar los cambios fue la concentración de carbono inorgánico en el medio, variando la cantidad de carbonatos añadidos durante la preparación del medio utilizado (Tabla 13). Con ello se buscó mejorar la transferencia de materia de los gases que suponían una impureza a la hora del aprovechamiento del biogás para fines energéticos. Con la adición de los carbonatos, por su carácter alcalino, se produce un aumento en el pH del medio, lo que mejora la solubilidad de estos gases en la fase líquida y, por tanto, la transferencia de materia.

La primera etapa (Etapa I) llevada a cabo en el reactor fue de 33 días con un medio basal con una concentración de carbono inorgánico de 220 mg/L. A continuación, hasta el día 57 se le añadió medio con una concentración de carbono inorgánico de 500 mg/L (Etapa II). Finalmente, la última etapa (Etapa III) concurrió con la adición de medio basal con una concentración de carbono inorgánico de 1600mg/L durante los últimos 61 días.

Etapa (días)	IC (mg/L)
Etapa I (0-33)	220
Etapa II (33-57)	500
Etapa III (57-120)	1600

Tabla 13. Descripción de las etapas del experimento en función de la concentración de carbono inorgánico en el medio basal

3.2.4 Análisis experimentales y métodos analíticos

La temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto y las concentraciones en el flujo de gas de entrada y salida se midieron diariamente. Por otro lado, los SST/SSV, TOC, TN, IC, flujos de entrada y salida a la columna y el nivel de luminosidad son analizados dos veces por semana.

La composición del flujo de gas a la entrada y salida del sistema se obtienen desde unos toma-muestras situados en cada una de las tuberías. Son analizados mediante cromatografía de gases utilizando un método de análisis de biogás de alta sensibilidad.

Para la medición de los parámetros relativos al medio de cultivo, la muestra es obtenida de la cámara de mezcla, siendo ésta previamente agitada. Se extrae muestra diaria para el análisis de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Dos veces por semana para cuantificar SST y SSV, previamente filtrada. También para realizar análisis TOC, TN e IC y aniones.

Finalmente, también se midieron los flujos entre la columna de absorción y la cámara de mezcla y entre el reactor tubular y la cámara de mezcla con el fin de comprobar la estabilidad del sistema y de mantener el ratio L/G de la columna de absorción constante.

Por último, cada 15 días, se utilizó un medidor de intensidad luminosa con el fin de comprobar la cantidad y distribución de la luz a lo largo de todos los tubos del reactor tubular.

3.3 Métodos analíticos.

3.3.1 Cromatografía de gases.

Este método ha sido utilizado para ambos experimentos. En el caso del test batch en botellas, se utilizó para la medición de la composición del espacio de cabezas de las botellas. En el caso del reactor tubular, para la medición de la composición de los gases de entrada y salida del reactor.

En ambos casos, se tomaron muestras gaseosas con una jeringa tipo gas-tight (Hamilton) de 10 mL, y se utilizó un cromatógrafo de gases de la marca Bruker, modelo 430-GC (Bruker, Palo Alto, USA) equipado con columnas CP-Molsieve 5A (15m×0.53mm×15 mm) y una CP-PoraBOND Q (25m×0.53mm×10 mm. Las temperaturas del horno, inyector y detector, fueron de 45°C, 150°C, and 200°C, respectivamente. Se utilizó helio como gas de arrastre con un flujo de 13.7 mL·min⁻¹. El método analítico utilizado fue el método de análisis de sistemas de biogás de alta sensibilidad.

3.3.2 pH

El pH se monitorizó, como en el caso anterior, en los dos experimentos. El aparato utilizado consiste en dos electrodos, uno es un sensor de vidrio y el otro es un electrodo de referencia, comprendidos en una sonda de marca Crisolyt con número de serie 5021 capaz de analizar muestras de partículas coloidales, muy viscosas y de baja conductividad. Esta sonda transmite señales eléctricas y un medidor traduce la cantidad de energía eléctrica transmitida en unidades de pH, el aparato de medida utilizado fue de la marca Crison modelo Basic 20.

3.3.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total

El equipo utilizado para el análisis es de la serie TOC-VCSH de la marca Shimadzu (Japón) acoplado a un módulo de quimioluminiscencia TNM-1.

En el caso del COT, el carbono orgánico es convertido a CO₂ tras su sometimiento a altas temperaturas y puede ser directamente medido obteniendo el valor del COT.

Por su parte, el CI, carbono inorgánico, se compone principalmente de carbonatos que, mediante un proceso de acidificación, se convierten también en CO_2 .

El método del NT, nitrógeno total, estudia el nitrógeno presente en la materia orgánica que se convierte fácilmente en NO al exponerlo a altas temperaturas, posteriormente el monóxido es medido para calcular la concentración de nitrógeno de la muestra.

Para la medición se añadieron los patrones correspondientes para cada método analítico seleccionado.

3.3.4 PHBs

El análisis de PHB se realizó para los ensayos en batch mediante un cromatógrafo de gases-masas. Se utilizó un equipo de la marca Agilent Technologies, 7820A.

Para la realización del análisis es necesaria la preparación de varias disoluciones y patrones. En primer lugar, se deberá preparar una disolución de propanol ácido, compuesta de 1-propanol y ácido clorhídrico 80:20 utilizando ácido clorhídrico al 37% w/w. También es necesaria una disolución de ácido benzoico en 1-propanol con una concentración de 40 g/L.

Finalmente, se prepararon patrones de co-polímero PHB-PHV del 88%PHB-12%PHV. Las concentraciones de los patrones dependen de las concentraciones de PHB-PHV presentes en las muestras, intentando en la medida de lo posible, que las muestras queden en el medio de la curva de calibración.

Tras la preparación de las disoluciones, se procedió a la preparación de los pellets para la digestión de las muestras. En primer lugar, se añadió 1 mL de disolución ácida (propanol ácido) a cada eppendorf, que portaba el pellet centrifugado y se agitó hasta su completa disolución. A continuación, se trasladaron estas disoluciones a tubos hatch mediante una pipeta. A este tubo se le añaden 10 μL de la disolución de benzoico y 2 mL de cloroformo. Finalmente, todos los tubos se colocan en el termo-reactor.

Para la etapa de digestión es necesaria la preparación de los patrones correspondientes. Estos patrones están compuestos de 1 mL de disolución ácida y 10 μL de la disolución de benzoico, añadiéndose además 2 mL de cada patrón al tubo correspondiente. Estos tubos se mantienen en el termo-reactor durante 4 horas a 100°C.

Pasada la etapa de digestión, se añade 1 mL de agua MilliQ a cada tubo y se agita. Tras dejar en reposo los tubos durante 5-10 minutos, se observa la aparición de dos fases. La fase a analizar es la orgánica, que se queda en la posición inferior del tubo.

Para extraerla se utiliza una pipeta y se filtra utilizando filtros de fibra de vidrio. Finalmente se añade a los viales del cromatógrafo para su análisis.

Además de los viales correspondientes a las muestras, es necesaria la colocación de tres viales más de cloroformo, acetona y rechazo. Las condiciones cromatográficas de detección y cuantificación de PHB por cromatografía de gases-masas son las siguientes:

Temperatura inyector	250 °C
Split ratio	5:1
Cantidad muestra	1 µL
Flujo	2 mL/min
Tiempo de retardo del solvente	5 min
Temperatura horno	160 °C

Tabla 14. Condiciones cromatográficas para el análisis de PHB

Además, las condiciones de la temperatura del detector se recogen en la tabla 15.

	° C/min	° C Netos	Tiempo de espera
Inicial	-	40	5 min
Rampa I	10	200	-
Rampa II	5	240	2 min

Tabla 15. Condiciones cromatográficas para el análisis de PHB: temperatura detector

El tiempo de retención del poli-β-hidroxi-butarato y ácido benzoico es de 3,5 min y 4,5 min respectivamente. Tras la realización del análisis, se seleccionan los patrones para realizar la curva y se integran los cromatogramas de las muestras

3.3.5 Ácidos grasos volátiles

El análisis de los AGVs se realizó en aquellos experimentos del apartado del estudio del sistema de botellas en los que se añadieron ácido acético y ácido valérico al medio mineral.

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases, GC-FID, Agilent 7820^a equipado con un muestreador automático G4513A y una columna de relleno Chromosorb WAW.

3.3.6 Oxígeno disuelto

La medición del oxígeno disuelto se llevó a cabo en el sistema continuo con el fin de controlar la cantidad de oxígeno disponible en el medio de cultivo. Para ello se utilizó un equipo Oxi3310 de la marca WTW, equipado con una sonda Cellox® 325 de la marca WTW. Para la medición del oxígeno disuelto se introdujo la sonda del oxímetro en un bote lleno del medio a analizar y completamente tapado a excepción de un agujero para la entrada de la sonda. Se esperó a que la medida se estabilizara antes de anotar el resultado. Además, con esta sonda también se tomaron los datos de la temperatura interna del reactor.

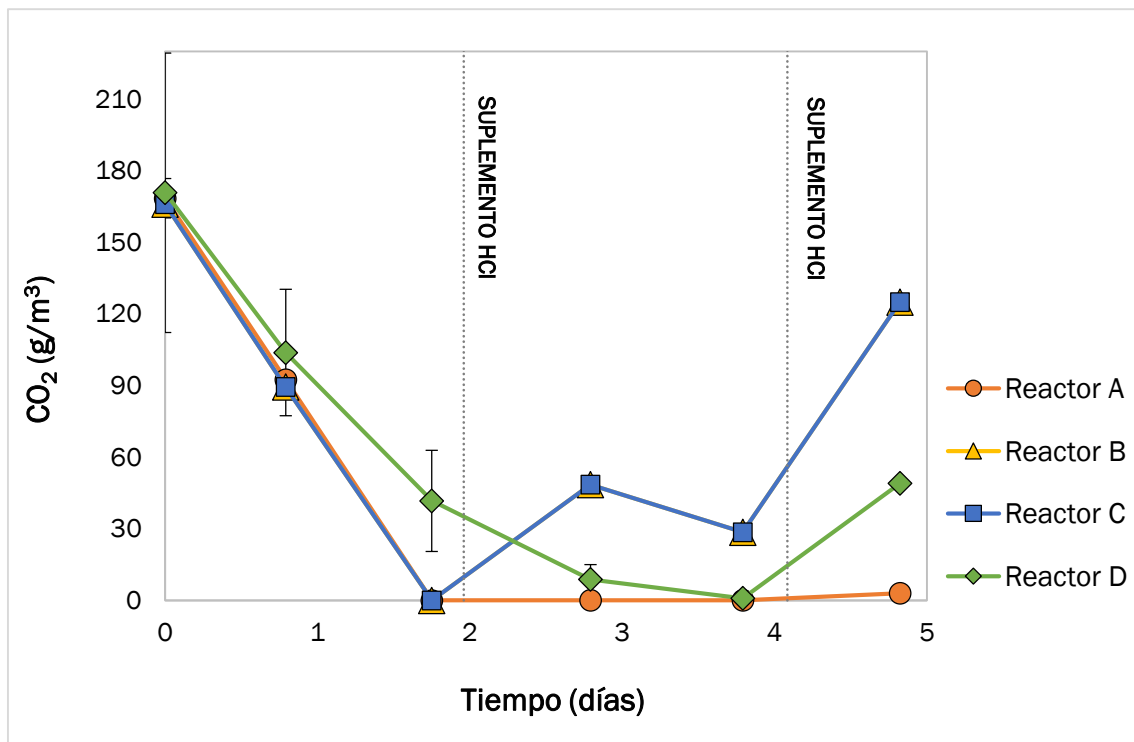
4 Resultados y discusión

4.1 Ensayos batch

4.1.1 Test 1: Estudio de la influencia de la limitación de nutrientes (N y P) en la acumulación de PHB con control sobre el pH

4.1.1.1 Concentración de CO₂

En la gráfica 1 se muestra la concentración del CO₂ en cada uno de los reactores durante el test 1. En el día 1 los reactores A, B, C y D tuvieron valores de eliminación de CO₂ de $45 \pm 0 \%$, $79 \pm 0 \%$, $83 \pm 0 \%$ y $83 \pm 0 \%$, respectivamente. Transcurridos dos días del inicio del experimento, antes de la adición de HCl 3M, tres de los cuatro reactores (reactores A, B y C) alcanzaron una eliminación completa de CO₂, mientras que el reactor D registró una eliminación del $89 \pm 0 \%$. Esto demostró la tolerancia de la cianobacteria *Nostoc Muscorum* a las concentraciones de CO₂ empleadas.



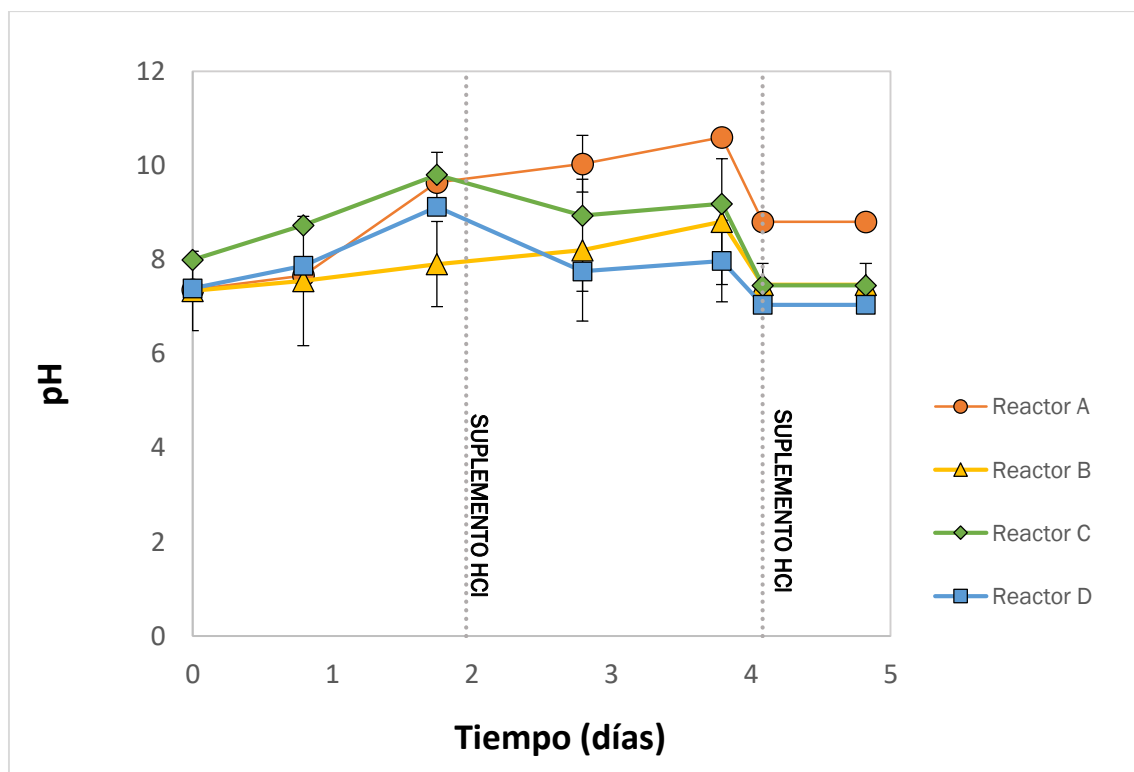
Gráfica 1. Concentración de CO₂ en los reactores A (○; control), B (△; limitación de N, ratio N:P 50:1), C (■; limitación de N, ratio N:P 10:1) y D (◇; limitación de N, ratio N:P 3:2) durante el test 1

Tras la adición de HCl, el reactor A (con condiciones óptimas de N y P) continuó con un valor de 100 ± 0 % de eliminación de CO_2 . Por su parte, en los reactores B y C se observa la desorción de parte del Cl tras la adición del ácido, alcanzando concentraciones promedio de 46 ± 0 mg/m^3 . Finalmente, en el reactor D no se observó una desorción de CO_2 , eliminándolo por completo en el día 4 de operación.

Tras el cuarto día, se realizó la última adición de 1,2 mL de HCl 3M con el fin de desorber, de nuevo, parte del CO_2 disuelto en la fase líquida. Como se puede observar en la gráfica 1, la concentración de CO_2 en el espacio de cabezas volvió a aumentar en todos los reactores.

4.1.1.2 pH

En la gráfica 2 se muestra los resultados de pH durante el test 1.



Gráfica 2. pH en los reactores A (●; control), B (▲; limitación de N, ratio N:P 50:1), C (■; limitación de N, ratio N:P 10:1) y D (◆; limitación de N, ratio N:P 3:2) durante el test 1

En el día 0 los reactores comenzaron el experimento con valores de pH similares, siendo de $7,5 \pm 0,2$ su promedio. El rango de pH (entre 7 y 8,5) es óptimo para el crecimiento de las microalgas (Muñoz y col., 2015; Rimsha y col., 2014). Por ello, se

produjo un crecimiento acelerado de las microalgas y un consumo rápido de los nutrientes, como puede observarse en los valores de SST (Tabla 19) y de NT (Tabla 18).

Desde el primer día, el pH sufrió un ascenso continuado debido al consumo de CO₂ por parte de las cianobacterias como parte de su actividad fotosintética (Arbib y col., 2013; Perez-Garcia y col., 2011) y a su transferencia a la fase líquida que se vio motivada por la alcalinización del caldo de cultivo y el carácter ácido del CO₂ (Franco-Morgado y col., 2017). Todo ello llevó a una eliminación de CO₂ en el segundo día de valores superiores al 90% en todos los reactores.

En el día 1, los valores de pH del caldo de cultivo aumentaron en todo lo reactores alcanzando un valor promedio de $8,1 \pm 0,5$. Entre los días 2 y 3 se añadió 1,2 mL de HCl 3M con el fin de acidificar el caldo de cultivo con el objetivo de desorber parte del CO₂ disuelto en el líquido para que sirva como fuente de C inorgánico a los microorganismos presentes y dar continuidad al experimento. El pH en el día 2, antes de añadir el HCl, fue de $9,6 \pm 0,6$ en el caso del reactor A, $7,9 \pm 0,0$ en el del reactor B, $9,8 \pm 0,9$ en el caso del reactor C y de $9,1 \pm 0,0$ para el reactor D. Sin embargo, tras la adición de HCl (día 3), en los reactores A y B, el pH no disminuyó entre ambos días, pero sí se amortiguó su ascenso llegando a valores de $10,0 \pm 0,6$ en el caso del reactor A y de $8,2 \pm 0,4$ para el reactor B. En los reactores C y D sí se pudo frenar el aumento de pH llegando a valores de $8,9 \pm 1,5$ en el caso del reactor C y de $7,7 \pm 0,0$ en el del reactor D.

Entre los días 4 y 5 se añadió otro 1,2 mL de HCl 3M con el fin de acidificar más el caldo de cultivo provocando la desorción de parte del CO₂ (Franco-Morgado y col. 2017). Una vez se hubo añadido el HCl el pH disminuyó en todos los casos, pero en baja medida.

El pH, por lo tanto, es un parámetro crítico en el proceso, no solo debido a la influencia que tiene sobre la transferencia del CO₂ desde la fase gas a la líquida (explicada en el párrafo anterior), sino también sobre la adecuación del caldo de cultivo a las necesidades ambiente para los microorganismos, es este caso la cianobacteria *N. muscorum*. (Acién y col., 2012).

4.1.1.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total

Durante el test 1 se realizaron análisis a la fase líquida al inicio del experimento (día 0), antes de la adición de HCl (día 2) y al finalizar el experimento (día 4). Los resultados de COT se pueden observar en la tabla 16.

COT (mg/L)	Día 0	Día 2	Día 4
Reactor A	11,8 ± 4,12	26,6 ± 12,8	105,0 ± 2,7
Reactor B	8,8 ± 2,2	20,5 ± 4,8	53,3 ± 6,9
Reactor C	7,4	7,3	56,5
Reactor D	4,9 ± 0,1	19,2 ± 1,3	38,3 ± 10

Tabla 16. Concentración de carbono orgánico total (COT) en los reactores batch durante el test 1

La concentración de COT monitorizada durante el test 1 fue aumentando en todos los reactores. En el caso del reactor A, que no tuvo limitación nutricional en el medio, se produjo el mayor aumento de este parámetro pasando de $11,8 \pm 4,2$ g/L en el día 0 hasta $105,0 \pm 2,7$ en el día 4. El resto de reactores (B, C y D) sufrieron un aumento más pausado, sobre todo, en la primera fase del experimento (días 0 a 2).

Del mismo modo, los análisis del CI del test 1 fueron realizados los días 0, 2, y 4. Los resultados del análisis del CI se muestran en la tabla 17. Como se puede observar, la concentración de CI entre los días 0 y 2 apenas varía. Sin embargo, en los resultados obtenidos en el día 4 se puede ver la desorción de CI causada por la adición de HCl en el medio, que causó el aumento de concentración de CO_2 en el espacio de cabezas.

CI (mg/L)	Día 0	Día 2	Día 4
Reactor A	178,3 ± 2,6	171,7 ± 7,1	85,9 ± 1,8
Reactor B	178,0 ± 5,3	128,2 ± 53,8	113,7 ± 19,9
Reactor C	187,2	170,2	129,4
Reactor D	179,6 ± 10,7	169,5 ± 14,6	181,4 ± 17,9

Tabla 17. Concentración de carbono inorgánico (CI) en los reactores batch durante el test 1

En la tabla 18 se muestran los valores del NT disuelto en el caldo de cultivo al o largo del test 1 tomados los días 0, 2 y 4. La concentración de NT medida en el día 0 sirve para cerciorarse de que el reactor A tuvo concentraciones óptimas de NT en el medio ($151,6 \pm 4,7$) mientras que el resto de reactores (B, C y D) tuvieron limitación en NT

con concentraciones iniciales de $10,6 \pm 0,0$ mg/L, $10,0 \pm 0,0$ mg/L y $11,3 \pm 1,3$, respectivamente. A partir de ahí, el NT disminuyó en todos los reactores durante la primera fase del experimento (previo a la primera adición de HCl) debido a su consumo por parte de los microorganismos. Sin embargo, el consumo de nitrógeno se detiene a partir del día 3. Estos resultados concuerdan con los valores de concentración de CO_2 , donde las concentraciones se mantienen constantes a partir de ese día de experimentación. Cabe destacar que el ligero aumento observado entre los días 2 y 4 puede deberse tanto a la sensibilidad del equipo de medición, ya que en los reactores con limitación de N (B, C y D), las concentraciones están por debajo del límite mínimo recomendado.

NT (mg/L)	Día 0	Día 2	Día 4
Reactor A	$151,6 \pm 4,7$	$104,7 \pm 33,1$	$111,5 \pm 6,7$
Reactor B	$10,6 \pm 0,0$	$2,6 \pm 1,0$	$5,0 \pm 1,3$
Reactor C	$10,0 \pm 0,0$	$2,6 \pm 0,0$	$3,9 \pm 0,0$
Reactor D	$11,3 \pm 1,3$	$3,2 \pm 1,9$	$2,9 \pm 0,0$

Tabla 18. Concentración de nitrógeno total (NT) en los reactores batch durante el test 1

4.1.1.4 Sólidos suspendidos totales y PHBs

Los SST y su contenido en PHBs se midieron tres veces a lo largo del test 1. Los resultados se muestran en la tabla 19. La producción de biomasa tuvo un rápido ascenso en la primera fase del experimento (días 0 a 2), como ya se ha dicho anteriormente, en la primera parte del experimento, especialmente en el reactor A, con concentraciones óptimas de nutrientes. Durante la segunda fase del experimento (días 2 a 4), antes de la segunda adición de HCl todos los reactores (A, B, C y D) sufrieron una disminución en la concentración de SST. Esta disminución fue provocada por la muerte celular causada por la carencia de nutrientes y fuentes de carbono disponibles en el caldo de cultivo. Se observa como la limitación en nitrógeno y fósforo en el medio mineral conlleva un crecimiento poblacional inferior cuando mayor es la limitación comparando el reactor A, que no tuvo limitación alguna, con el resto de reactores (B, C y D). En primer lugar, la diferencia entre la concentración final de SST del reactor A con respecto al reactor B muestra la influencia en la productividad ocasionada por la limitación en nitrógeno (Wu y col., 2001). La comparación entre los reactores B, C y D nos demuestra el efecto de la

limitación en fósforo del medio mineral en la productividad final demostrado por Collier y col. (1992).

La concentración de PHBs en % (g PHB/g SST) no presentó variaciones significativas en ningún caso. Se vio como la concentración de PHBs aumentó ligeramente durante la primera fase del experimento llegando a valores > 1% en el día 2 en todos los reactores. No se vio una tendencia de acumulación de PHBs potenciada por la limitación en fósforo ya que el reactor D, el más limitado en este nutriente, fue el que menos ascenso presentó. Durante la segunda fase del experimento, entre los días 2 y 4, la acumulación de PHBs se redujo, posiblemente al ser utilizados por las cianobacterias como almacén de energía, debido al estrés causado por la falta de nutrientes (Anderson y col., 1990; Handrick y col., 2000). Los resultados muestran una mayor concentración en masa de PHBs en aquellos reactores con limitación nutricional de nitrógeno y fósforo (reactores B, C y D) que en el reactor con condiciones de crecimiento óptimas (reactor A) de acuerdo con Doi y col. (2002). No se vio una tendencia en la acumulación de PHBs con el aumento la limitación de fósforo contrario a lo reportado por otros autores como (Sharma y col., 2005), cuyos resultados mostraron la limitación en fósforo como un estimulante en la acumulación de PHBs en cianobacterias.

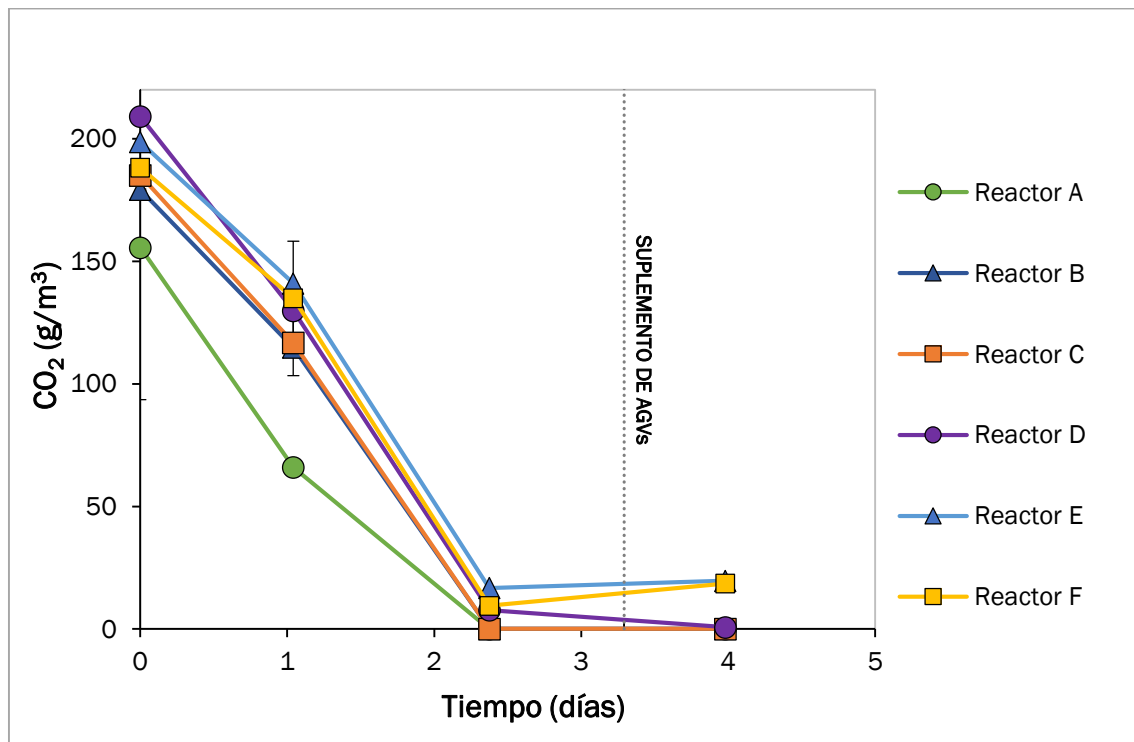
	Día 0		Día 2		Día 4	
	SST (g/L)	PHBs (%m)	SST (g/L)	PHBs (%m)	SST (g/L)	PHBs (%m)
Reactor A	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	1,1 ± 0,2	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,0
Reactor B	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	1,1 ± 0,3	0,3 ± 0,0	1,2 ± 0,2
Reactor C	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,1 ± 0,3
Reactor D	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1

Tabla 19. Concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y PHBs en los reactores batch durante el test 1

4.1.2 Test 2. Estudio de la influencia de la limitación de nutrientes (N y P) y la adición de ácidos grasos volátiles (AGVs) en la acumulación de PHB con control sobre el pH

4.1.2.1 Concentración de CO₂

La gráfica 3 muestra los resultados de concentración de CO₂ del test 2. El día 1 el reactor A, que no tenía limitación de N ni P en el medio mineral, presentó la mayor tasa de eliminación de CO₂, con un valor de 64 ± 0 %. En los reactores B y C, que tampoco tenían limitación en ningún nutriente en el medio mineral, presentaron valores de 39 ± 0%, 38 ± 0%, respectivamente. En el caso de los reactores D, E y F, las eliminaciones en el día 1 alcanzaron valores de 39 ± 0%, 30 ± 0 % y 45 ± 0 %, respectivamente.



Gráfica 3. Concentración de CO₂ en los reactores A (● ; control), B (▲ ; suplemento de ácido acético), C (■ ; suplemento de ácido valérico), D (● ; limitación de N), E (▲ ; limitación de N y suplemento de ácido acético) y F (■ ; limitación de N y suplemento de ácido valérico) durante el test 2

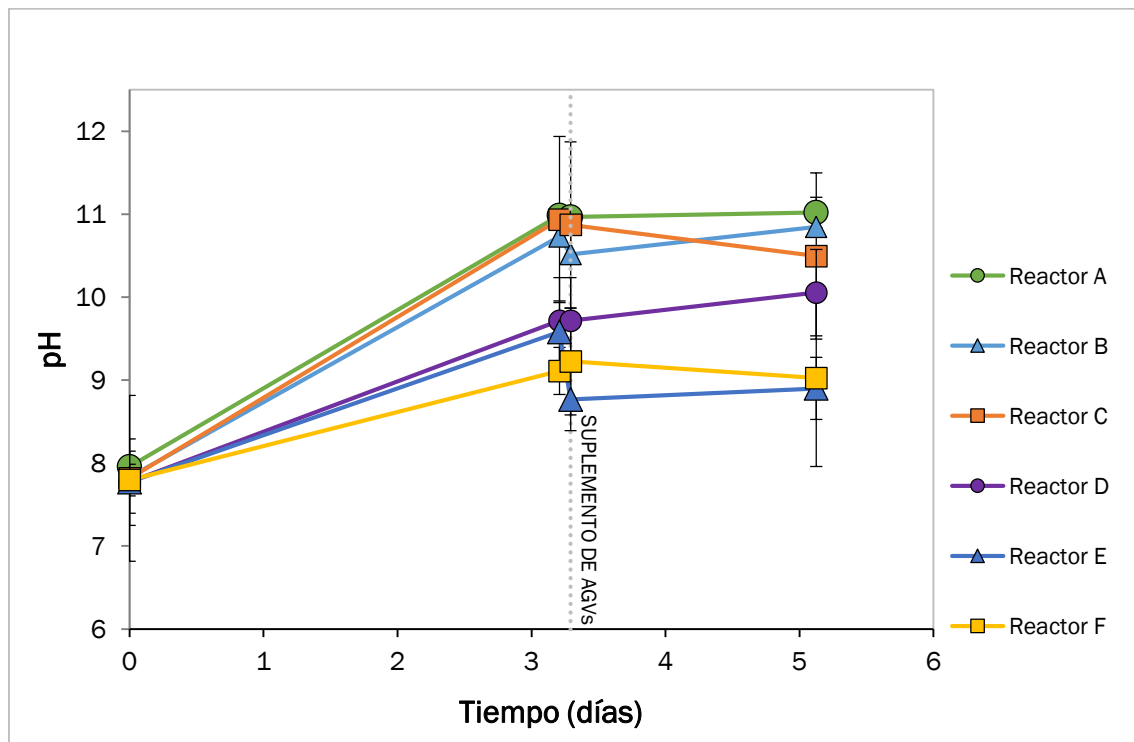
Transcurridos dos días desde el inicio del test, la concentración de CO₂ en el espacio de cabezas se redujo a valores < 20 g/m³, lo que equivale a eliminaciones superiores al 90% en todos los ensayos.

Sin embargo, la adición de AGVs derivó en la desorción de parte del carbono inorgánico disuelto en el caldo de cultivo (tabla 21). Por ello, los reactores en los que no se añadió esta fuente alternativa de carbono, el reactor A y el reactor D, presentaron concentración en el día 4 de 0 g/m³. En aquellos reactores donde se añadió bien ácido acético (reactores B y E) o ácido valérico (reactores C y F), la concentración de CO₂ en el espacio de cabezas aumentó debido a la acidificación del caldo de cultivo y consecuente desorción del CO₂.

La eliminación de CO₂ del espacio de cabezas se debe, al igual que en el test 1, a la transferencia del mismo a la fase líquida y a su posterior consumo por parte de los microorganismos presentes en el caldo de cultivo (Arbib y col., 2013; Franco-Morgado y col., 2017; Perez-Garcia y col., 2011) mostrando un crecimiento acelerado en la primera etapa del experimento entre los días 0 y 2 (Tabla 23).

4.1.2.2 pH

A continuación, se resumen los resultados de pH obtenidos durante los días de monitoreo de la fase líquida realizados a lo largo del experimento (Gráfica 4).



Gráfica 4. pH en los reactores A (● ; control), B (▲ ; suplemento de ác. acético), C (■ ; suplemento de ác. valérico), D (● ; limitación de N), E (▲ ; limitación de N y suplemento de ác. acético) y F (■ ; limitación de N y suplemento de ác. valérico) durante el test 2

El valor inicial del pH fue similar en todos los casos con un valor promedio de $7,3 \pm 0,2$.

Los reactores A, B y C alcanzaron un valor promedio durante el día 3 de $10,4 \pm 0,1$. Por su parte, los reactores D, E y F alcanzaron un valor promedio de $9,0 \pm 0,3$, respectivamente. Estos valores de pH están acordes a las eliminaciones observadas en la concentración de CO_2 . La adición de AGVs resultó en un ligero descenso del pH en estos reactores. Los valores alcanzados para cada uno de ellos fueron $10,5 \pm 0,1$ para el reactor A, el reactor B tuvo un valor de $10,3 \pm 0,1$, el reactor C de $10,0 \pm 0,3$, el reactor D, por su parte, tuvo un pH de $9,6 \pm 0,1$. Por último, el pH de los reactores E y F se mantuvo en $8,4 \pm 0,6$ y $8,5 \pm 1,1$, respectivamente, el día 5 de operación.

Se observa que, desde el inicio del experimento, existe una tendencia de aumento del pH debida al consumo del Cl y absorción del CO_2 . No pasa desapercibido, por tanto, el mayor aumento de pH en los reactores A, B y C, que contenían una concentración óptima de N para el crecimiento de las cianobacterias en el caldo de cultivo mineral por lo que su consumo fue más rápido que en para los reactores D, E y F con limitación.

4.1.2.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total

Los análisis de la fase líquida del test 2 fueron realizados al inicio del experimento (día 0), justo antes de la adición de AGVs (día 3) y al finalizar el experimento (día 5).

La concentración de COT medida durante el test 2 (tabla 20) muestra un aumento durante la primera fase del experimento (día 0 a día 3). En la segunda fase del experimento (día 3 a día 5) se produjo un aumento en la concentración de COT debida a la adición de AGVs en el caso de los reactores B, C, E y F.

COT (mg/L)	Día 0	Día 3	Día 5
Reactor A	$91,9 \pm 0,0$	$104,4 \pm 12,3$	$147,3 \pm 64,9$
Reactor B	$85,6 \pm 0,0$	$148,5 \pm 7,5$	$211,6 \pm 38,1$
Reactor C	$121,4 \pm 91,9$	$88,2 \pm 5,2$	$225,6 \pm 35,4$
Reactor D	$138,8 \pm 27,1$	$117,7 \pm 1,7$	$147,9 \pm 2,3$
Reactor E	$85,7 \pm 51,3$	$76,7 \pm 29,7$	$153,3 \pm 75,6$
Reactor F	$55,9 \pm 15,5$	$67,0 \pm 9,3$	$184,1 \pm 32,6$

Tabla 20. Concentración de carbono orgánico total (COT) en los reactores batch durante el test 2

Los resultados de los análisis del CI se muestran en la tabla 21. Desde el comienzo del experimento se observa como la concentración de CI disminuye en todos los experimentos como causa de su desorción a la fase gas.

CI (mg/L)	Día 0	Día 3	Día 5
Reactor A	206,1 ± 4,4	147,6 ± 7,0	140,0 ± 3,6
Reactor B	199,0 ± 8,7	154,3 ± 10,3	129,0 ± 12,1
Reactor C	200,3 ± 7,8	161,5 ± 0,2	163,8 ± 17,7
Reactor D	186,3 ± 0,5	175,7 ± 3,5	128,4 ± 48,1
Reactor E	195,8 ± 9,4	185,0 ± 5,3	189,5 ± 3,8
Reactor F	193,7 ± 10,6	186,5 ± 17,1	182,2 ± 18,8

Tabla 21. Concentración de carbono inorgánico (CI) en los reactores batch durante el test 2

Los resultados del NT del test 2 se pueden observar en la tabla 22. Los reactores A, B y C que no tenían limitación de NT en el medio, como se puede observar en sus valores de NT del día 0, presentaron un valor medio de concentración de NT de $172,5 \pm 4,5$ mg/L mientras que, los reactores D, E y F presentaron una concentración inicial de NT de $12,5 \pm 2,2$ mg/L. A partir de ahí, se produjo una disminución en el NT en todos los reactores, sobre todo en aquellos sin limitación de NT (reactores A, B y C) durante la primera fase del experimento. A partir del día 2, este descenso se ve frenado junto con el consumo de CO₂. En este momento también disminuye el crecimiento poblacional del inóculo. Los reactores D, E y F, por su parte, presentaron cierta disminución, aunque no muy marcada ya que su crecimiento poblacional y por tanto su consumo de nutrientes, fue más lento.

TN	Día 0	Día 3	Día 5
Reactor A	174,1 ± 4,9	153,1 ± 3,1	151,8 ± 4,8
Reactor B	167,5 ± 7,7	154,0 ± 2,3	143,1 ± 5,1
Reactor C	176,0 ± 2,5	145,0 ± 8,6	116,8 ± 73,0
Reactor D	15,1 ± 3,1	0,0 ± 0,0	10,1 ± 1,0
Reactor E	11,3 ± 0,3	6,5 ± 1,3	10,5 ± 1,0
Reactor F	11,1 ± 0,0	6,1 ± 0,5	9,3 ± 3,4

Tabla 22. Concentración de nitrógeno total (NT) en los reactores batch durante el test 2

4.1.2.4 Sólidos suspendidos totales y PHBs

En la tabla 23 se muestran los valores de SST obtenidos durante los 5 días que duró el test 2 y su contenido en % (masa PHBs/masa SST). En el resultado del día 0 se muestra la carga de SST inicial en cada reactor que, como se puede observar, no distan demasiado unos de otros. Todos los reactores muestran un aumento en SST en la primera fase del experimento (días 0 a 3) superando en todos los casos 0,3 g/L de SST. Los valores finales, del día 5, no varían demasiado con respecto a los valores del día 3 al detenerse la actividad fotosintética (y por tanto la eliminación de CO₂). La concentración de SST promedio fue de 0,3 ± 0,0g/L. De igual manera que en el test 1, los reactores con una productividad mayor fueron aquellos sin limitación nutricional debido a sus condiciones óptimas para el crecimiento poblacional de las cianobacterias (Collier y col., 1992; Wu y col., 2001).

Los valores de PHBs no muestran un aumento significativo durante los primeros días de experimentación, independientemente del contenido en nutrientes o la adición de AGVs. Sin embargo, tras la segunda fase del experimento, los reactores C, E y F mostraron un ligero aumento en su acumulación de PHBs llegando a valores de 0,5 ± 0,1%, 1,0 ± 0,2 y 0,6 ± 0,1% PHBs, respectivamente.

Los resultados obtenidos no muestran una tendencia de optimización en la acumulación de PHBs por parte de la cianobacteria *N. muscorum* potenciada por la adición de AGVs en el caldo de cultivo en contraposición con los resultados obtenidos por otros autores. Por ejemplo, Haase y col., (2012b) demostraron que la cianobacteria *N. muscorum* bajo limitación de fósforo y con adición de distintas concentraciones de acetato era capaz de acumular mayores cantidades de PHBs (11,6% con adición de acetato

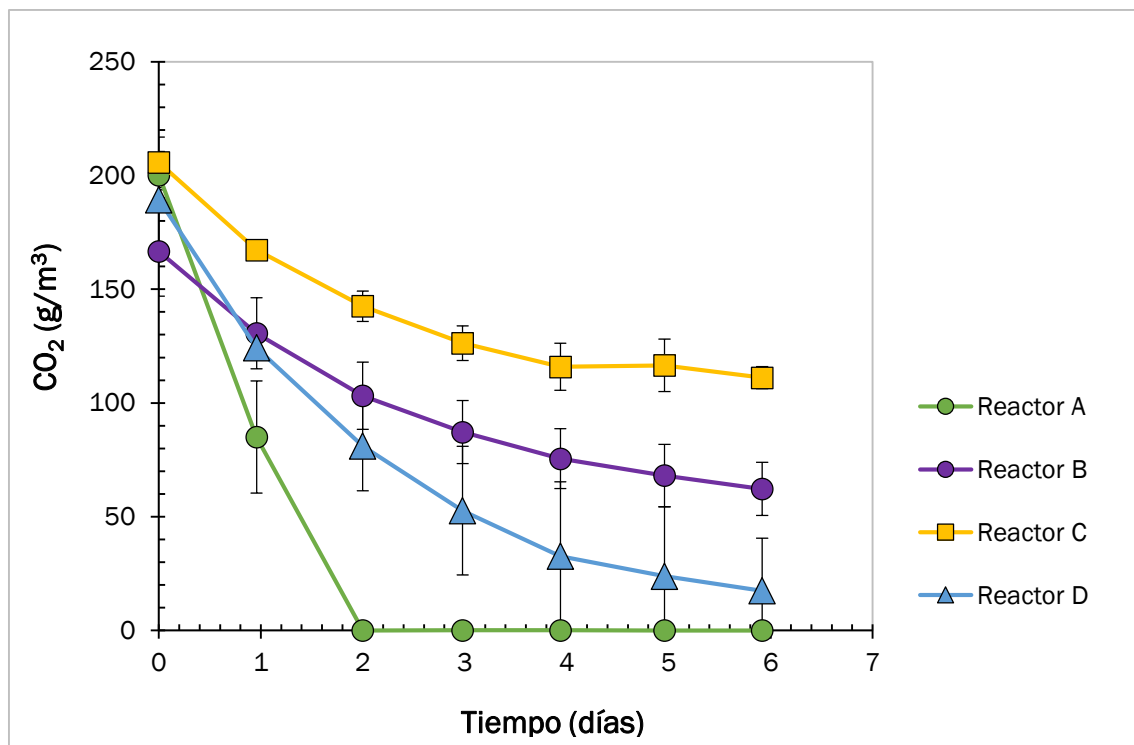
	Día 0		Día 3		Día 5	
	SST (g/L)	PHBs (%m)	SST (g/L)	PHBs (%m)	SST (g/L)	PHBs (%m)
Reactor A	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Reactor B	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Reactor C	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Reactor D	0,1 ± 0,0	1,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Reactor E	0,1 ± 0,0	2,1 ± 0,3	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,0 ± 0,2
Reactor F	0,1 ± 0,0	0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,1

Tabla 23. Concentración de sólidos suspendidos totales(SST) y PHBs en los reactores batch durante el test 2

4.1.3 Test 3. Estudio de la acumulación de PHB con deficiencia de nutrientes (N y P) y adición de AGVs desde tiempo cero

4.1.3.1 Concentración de CO₂

La concentración de CO₂ en cada uno de los reactores del test 3 se muestran en la gráfica 5. El reactor A, que no tenía deficiencia de nitrógeno ni fósforo presentó una eliminación muy acelerada. Al llegar al día 1 la tasa de eliminación de CO₂ en este reactor fue del 57 ± 0 %. El resto de reactores (B, C y D) presentaron eliminaciones más moderadas durante el primer día con unos resultados de $22 \pm 0\%$, $19 \pm 0\%$ y $34 \pm 0\%$, respectivamente.



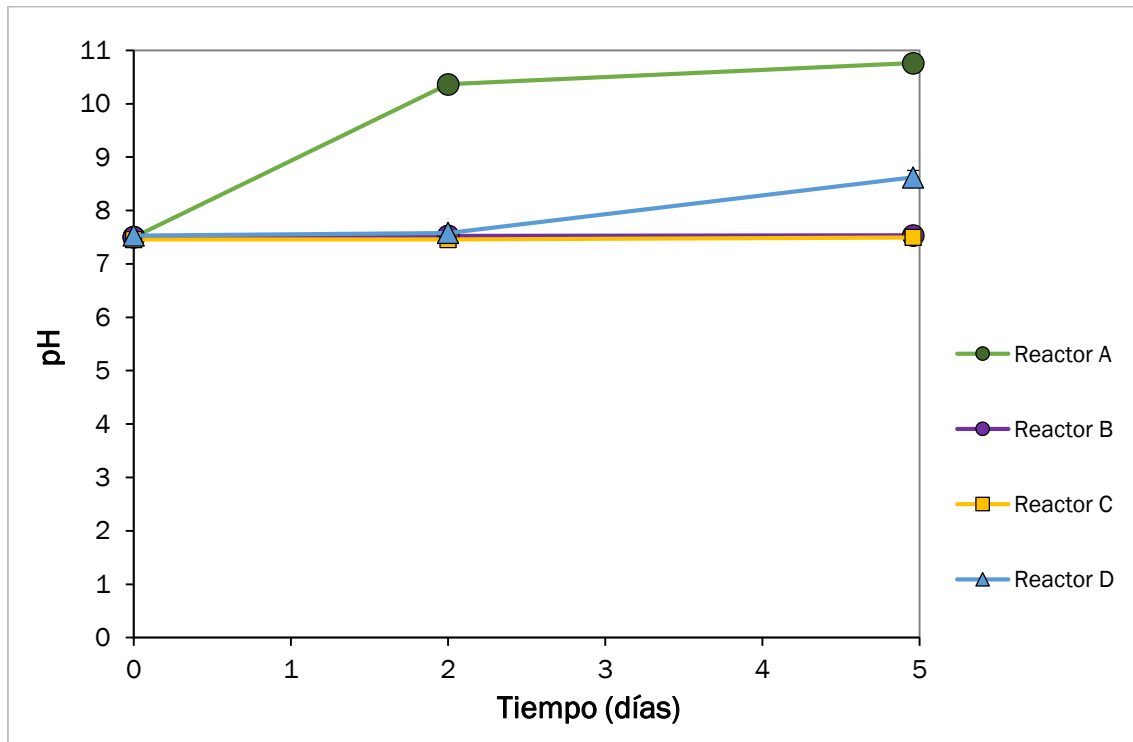
Gráfica 5. Concentración de CO₂ en los reactores A (● ; control), B (● ; deficiencia de N y P), C (■ ; deficiencia de N y P y suplemento de ác. valérico) y D (▲; deficiencia de N y P y suplemento de ác. valérico) durante el test 3

Del día 2 en adelante el reactor A alcanzó una eliminación > 99% que mantuvo durante todo el experimento. El resto de reactores (B, C y D) tuvieron una disminución en la concentración de CO₂ continua con resultados al final del experimento de 70 ± 12 mg/m³ en el reactor B, 111 ± 5 mg/m³ en el reactor C y 17 ± 23 mg/m³ en el reactor D. Estos resultados concuerdan con la limitación de nutrientes implementada

en los reactores B, C y D, impidiendo la fijación del carbono por parte de las cianobacterias.

4.1.3.2 pH

En la gráfica 6 se resumen los valores de pH obtenidos durante el test 3. Aunque los cuatro reactores comenzaron el experimento (día 0) con un pH promedio de $7,5 \pm 0,0$; el reactor A, que no estuvo limitado en ningún componente vio aumentado drásticamente este parámetro debido a la actividad fotosintética. Esto derivó en una absorción acelerada del CO_2 en el caldo de cultivo y, finalmente, a la finalización del experimento en este caso por el alcance de un pH tan elevado como $10,4 \pm 0,1$ en el día 1 y $10,8 \pm 0,1$ en el día 5



Gráfica 6. pH en los reactores A (● ; control), B (● ; deficiencia de N y P), C (■ ; deficiencia de N y P y suplemento de ác. valérico) y D (▲ ; deficiencia de N y P y suplemento de ác. valérico) durante el test 3

En cuanto al resto de reactores, todos ellos con carencia de fósforo y nitrógeno, tuvieron una evolución más lenta provocada por las condiciones menos aventajadas para su crecimiento. Estos mantuvieron durante todo el experimento un pH casi invariable ya que se vio amortiguado por el efecto de la eliminación del CO_2 disuelto en el caldo de cultivo. Los reactores B y C presentaron un pH de $\sim 7,5$ durante toda la experimentación, mientras que en el reactor D aumentó de $7,6 \pm 0,1$ en el día 2 a $8,6 \pm 0,9$ en el día 5. Este aumento concuerda con las mayores eliminaciones de CO_2

registradas en este reactor. El pH de estos reactores, por lo tanto, se mantuvo durante prácticamente todo el experimento en valores entre 7 y 8,5 óptimos para la acumulación de PHBs por estos microorganismos (Rimsha y col., 2014). El reactor que tuvo, aparentemente, mejores condiciones para el crecimiento fue el reactor D, con ácido valérico como suplemento de carbono llegando a una eliminación del 90 ± 0 % de CO_2 .

4.1.3.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total

Los análisis de la fase líquida realizados a los reactores durante el test 3 se llevaron a cabo al inicio del experimento (día 0) y los días 2 y 5, cuando se dio por finalizado el test.

Los resultados de COT se encuentran en la tabla 24. En el día 0, se observa la diferencia entre los reactores con adición de suplementos de carbono (Reactores C y D) con un elevado valor de COT en el medio y los que no lo tuvieron (Reactores A y B) con un valor de concentración de COT inferior. El día 2 del experimento, los reactores A y B mostraron un pequeño aumento en el COT mientras que, los reactores C y D se mantuvieron constantes. A partir de ahí, durante la segunda fase del experimento (día 2 a 5), los reactores A y B se mantuvieron en valores prácticamente constantes. Sin embargo, los reactores C y D con adición de AGVs mostraron un descenso en el COT debido al consumo de las fuentes orgánicas de carbono por parte de los microorganismos.

COT (mg/L)	Día 0	Día 2	Día 5
Reactor A	$7,4 \pm 1,2$	$26,6 \pm 2,0$	$26,6 \pm 1,9$
Reactor B	$5,1 \pm 1,9$	$11,4 \pm 3,1$	$8,9 \pm 1,7$
Reactor C	$33,0 \pm 2,3$	$29,8 \pm 8,6$	$10,5 \pm 2,1$
Reactor D	$45,4 \pm 7,0$	$53,5 \pm 3,0$	$34,4 \pm 8,1$

Tabla 24. Concentración de carbono orgánico total (COT) en los reactores batch durante el test 3

En la tabla 25 se pueden observar los resultados obtenidos de CI. De igual manera a los test anteriores, se observa una disminución continuada en la concentración de CI presente en el medio causada por la desorción del mismo a la fase gas en forma de CO_2 a medida que éste es consumido por los microorganismos.

Cl (mg/L)	Día 0	Día 2	Día 5
Reactor A	204,8 ± 1,2	127,5 ± 9,7	35,7 ± 0,5
Reactor B	216,2 ± 0,5	224,3 ± 19,9	105,2 ± 1,9
Reactor C	200,7 ± 6,1	178,0 ± 5,0	103,9 ± 2,5
Reactor D	205,6 ± 1,2	193,9 ± 13,2	96,7 ± 8,7

Tabla 25. Concentración de carbono inorgánico (Cl) en los reactores batch durante el test 3

La tabla 26 resume los valores obtenidos en los análisis del NT durante el test 3. El valor inicial muestra la carga de nitrógeno en el medio. El reactor A, el único sin carencia total de NT en el medio, vio disminuida su concentración durante todo el experimento pasando de $162,1 \pm 2,7$ a $32,4 \pm 0,3$ g/L durante los 5 días. Los valores del NT muestran como en el reactor A, con una composición óptima de nitrógeno en el medio, la concentración de NT sufre una gran disminución por su consumo por parte de los microorganismos. En cuanto al resto de reactores (B, C y D) con una composición en el caldo de cultivo en nitrógeno de 0 mg/L, los resultados de medición en el día 0 resultan del error del equipo de medición utilizado

NT (mg/L)	Día 0	Día 2	Día 5
Reactor A	162,1 ± 2,7	100,7 ± 16,5	32,5 ± 0,3
Reactor B	1,0 ± 0,0	2,1 ± 0,7	1,3 ± 0,2
Reactor C	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,6	1,8 ± 1,1
Reactor D	1,7 ± 0,4	1,9 ± 0,3	2,4 ± 1,0

Tabla 26. Concentración de nitrógeno total (NT) en los reactores batch durante el test 3

4.1.3.4 Sólidos suspendidos totales y acumulación de PHBs

A continuación, se presentan los datos de concentración SST y su contenido en PHBs en % en masa (g PHB/ g SST) (Tabla 27). El valor del día 0 muestra la carga inicial en SST de cada reactor. Inicialmente todos los reactores ven aumentada su concentración en SST, lo que se demuestra un crecimiento poblacional. Como era de esperar, el reactor A, que no tiene limitación de nitrógeno ni fósforo en su medio

mineral presentó el crecimiento más elevado alcanzando un valor en el día 2 de $0,6 \pm 0,1$ g/L. Mientras tanto, el resto de reactores (B, C y D) con carencia de nitrógeno y fósforo mostraron un crecimiento poblacional durante la primera fase del experimento más limitado con valores en el día 2 de $0,2 \pm 0,0$ g/L para el reactor B, en el reactor C de $0,3 \pm 0,1$ g/L y de $0,4 \pm 0,2$ g/L en el reactor D. Entre los días 2 y 4, se produjo un ligero descenso de concentración de SST en los reactores B, C y D. El reactor B finalizó el experimento con un valor de concentración de SST de $0,2 \pm 0,0$ g/L, el reactor C de $0,2 \pm 0,1$ g/L y el reactor D de $0,3 \pm 0,1$ g/L. Resulta complicado discutir los valores de SST obtenidos durante este experimento ya que se partió de valores distintos. Se observa, sin embargo, como el reactor A tuvo un ciclo de vida muy corto de acuerdo con los valores de concentración de CO_2 y de COT, Cl y TN obtenidos que, en este caso, tuvieron una evolución muy acelerada en comparación con el reactor A del resto de ensayos. Los resultados no concuerdan lo obtenido por (Bhati y col., 2010) que, bajo condiciones de deficiencia de N y P vieron altamente limitada el aumento de SST durante su experimento.

	Día 0		Día 2		Día 4	
	SST (g/L)	PHBs (%m)	SST (g/L)	PHBs (%m)	SST (g/L)	PHBs (%m)
Reactor A	$0,2 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,8$	$0,6 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,0$	$0,7 \pm 0,0$
Reactor B	$0,1 \pm 0,0$	$4,0 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,0$	$1,2 \pm 0,1$
Reactor C	$0,2 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,4$
Reactor D	$0,2 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,0$

Tabla 27. Concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y PHBs en los reactores batch durante el test 3

Finalmente, el contenido en PHBs se redujo en todos los reactores durante la primera fase del experimento, aumentando posteriormente hasta el día 4 de experimentación, y siendo los reactores con carencia de nutrientes (B, C y D) los que tuvieron un mayor ascenso. El valor obtenido en el reactor A puede atribuirse a la mayor velocidad en finalizar su ciclo, es decir, a la carencia de carbono en el medio y en el espacio de cabezas observada desde el día 2 de experimentación, lo que pudo resultar en el consumo de este compuesto. Sharma y col., (2005) concluyó que una deficiencia de P en conjunto con suplemento de carbono en forma de ácido acético estimulaba la acumulación de PHB en cianobacterias como la *N. muscorum*. En este caso, también es el caso más favorable, habiendo obtenido el reactor C la mayor concentración de PHB en este test. No obstante, los valores de acumulación obtenidos siguen siendo muy inferiores a los inicialmente esperados de acuerdo a bibliografía previa.

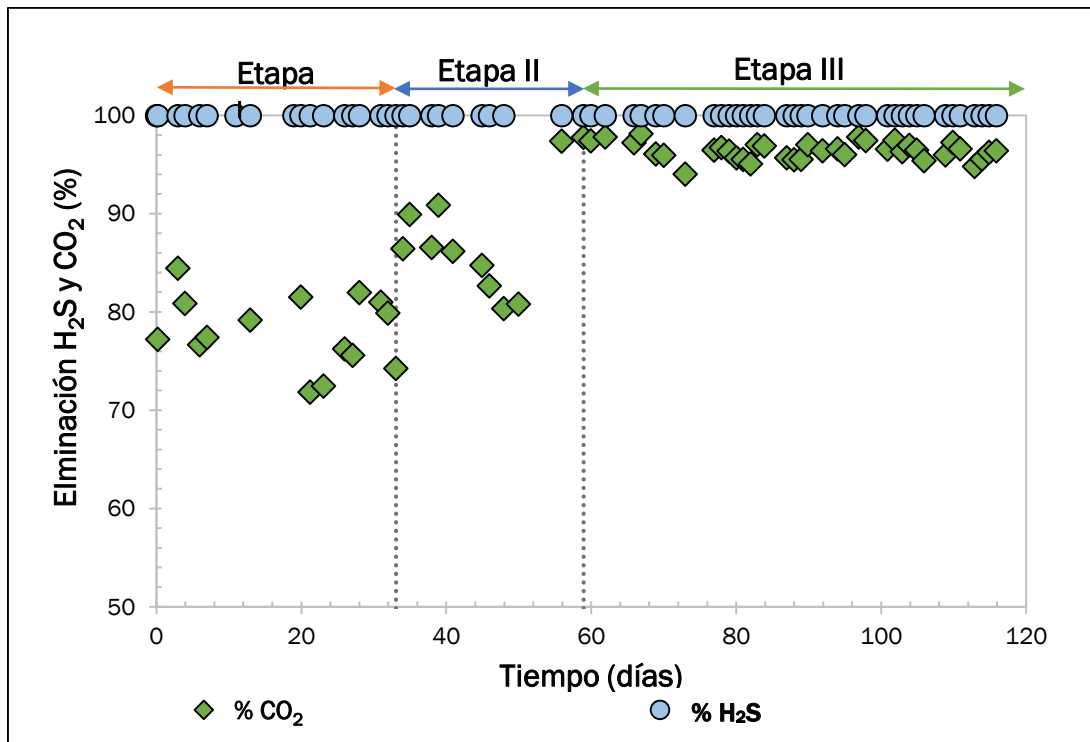
4.2 Fotobiorreactor tubular cerrado

4.2.1 Eliminación de CO₂ y H₂S

En la gráfica 7 se pueden observar las tasas de eliminación de CO₂ y H₂S durante las tres etapas del periodo experimental en % (v/v). La eliminación del H₂S fue > 99% durante las tres de etapas utilizando una L/G durante todo el proceso de 0,5. La eliminación de CO₂ durante la etapa I fue de $78,9 \pm 3,1$ % con un CI de 200 mg/L. En la etapa II, con un CI de 800 mg/L, se logró una eliminación de $79,5 \pm 20,7$ %. Sin embargo, en la etapa III, donde la concentración de CI aumentó hasta 1600 mg/L, las eliminaciones de CO₂ alcanzaron un valor promedio de $96,3 \pm 1,1$ %. Como era de esperar, la alcalinidad del medio de cultivo es una variable clave en los procesos de *upgrading* fotosintético.

Las eliminaciones de CO₂ de las etapas I y II fueron similares a las recogidas por (Posadas y col., 2015) con unos resultados entre $79 \pm 4\%$ y 72 ± 1 en un fotobiorreactor abierto y un CI promedio de 71 ± 5 y $124,2 \pm 2$ mg/L. Del mismo modo, Rodero y col. (2018) obtuvo eliminaciones de CO₂ en fotobiorreactores abiertos entre 30 y 41 % utilizando un CI de 100 mg/L, entre 48 y 50 % con un CI de 500 mg/L y, por último, de entre 97 y 99 % al aumentar el CI del medio hasta 1500 mg/L. Como se puede comprobar, los resultados de Rodero y col. (2018) responden a la variación de CI de igual manera que los obtenidos en este proyecto, aumentando la eliminación de CO₂ cuanto mayor es la carga de CI en el caldo de cultivo.

Por otro parte, en lo que se refiere al H₂S, Posadas y col. (2015) obtuvo una eliminación completa de este gas con una relación L/G de, al menos, 0,9. Sin embargo, Rodero y col. (2018) consiguió este resultado operando con una relación L/G de 0,5 en la etapa con una carga de CI de 1500 mg/L. Sin embargo, obtuvo valores inferiores de eliminación en la etapa con 500 mg/L de CI (entre 93 y 95 %) y en la etapa con una carga de 100 mg/L de CI (entre 66 y 80 %). En nuestro caso, el fotobiorreactor tubular fue capaz de mantener eficacias de eliminación de H₂S muy superiores incluso con el menor valor de alcalinidad.



Gráfica 7. Eliminación de CO₂ y H₂S (%) en el fotobiorreactor tubular

La gráfica 8 muestra la composición de biometano a la salida del fotobiorreactor en las 3 diferentes etapas en % (v/v). La concentración de O₂ y N₂ contenida en el biometano no varió considerablemente durante las distintas etapas. Durante todas las etapas (I, II y III) la concentración en porcentaje en volumen de O₂ fue de $0,9 \pm 0,3$ %, $0,4 \pm 0,2$ % y $0,4 \pm 0,2$ % v/v, respectivamente. En el caso del N₂, la concentración en % volumen fue de $1,7 \pm 0,7$ % durante la etapa I. Durante la etapa II fue de $1,5 \pm 0,7$ % y en la etapa III su concentración fue de $1,5 \pm 0,5$ % en volumen.

La composición de CO₂ disminuyó notablemente a medida que se aumentó el suministro de Cl en el medio desde un valor en la etapa I de $6,2 \pm 1,5$ % en volumen, pasando por un valor de $4,2 \pm 1,9$ % durante la etapa II, hasta un valor durante la etapa III de $1,2 \pm 0,4$ % en volumen. Esta mejora en la calidad del biometano se debe al aumento de la transferencia de materia a medida que se aumentó la alcalinidad en la mezcla. El CO₂ tuvo mayor facilidad en ser transferido a la fase líquida en la columna de absorción y, desde ahí, ser consumido por las microalgas en el fotobiorreactor durante su actividad fotosintética (Rodero et. al 2018).

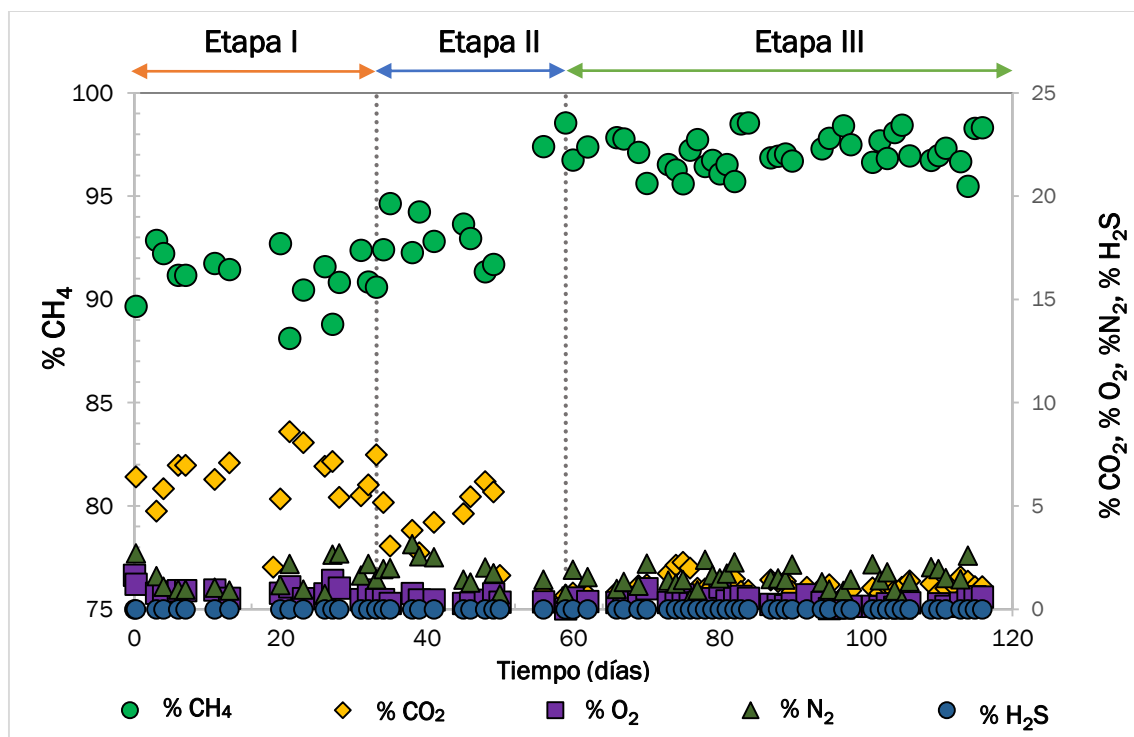
La concentración en volumen a la salida de H₂S fue inferior al 1% en todas las etapas (I, II y III) debido, como ya se ha mencionado, a la favorable transferencia de este compuesto desde la fase gaseosa a la fase líquida en la columna de absorción y su posterior oxidación por parte de las bacterias oxidadoras de azufre.

El porcentaje en volumen del CH_4 a la salida fue de $91,1 \pm 1,3\%$ en la etapa I. En la etapa II se consiguió una composición de biometano en la corriente de gas de $92,88 \pm 2,4\%$ y $97,1 \pm 0,9\%$ en la etapa III.

Los resultados de Rodero y col. (2018) siguieron la misma línea que los obtenidos durante este proyecto. Con una concentración de Cl de 100 mg/L la concentración de metano en la corriente de biometano fue de entre 76-79%. Por su parte, con una concentración de Cl de 500 mg/L, la concentración de biometano ascendió a valores entre 81-82%. Finalmente, en la etapa con una concentración de Cl en el medio de 1500 mg/L obtuvo unos resultados de concentración de metano en el biometano de ~98%.

Acorde a la legislación vigente en España detallada en los protocolos PD-01 y PD-02 para la inyección del biometano en la red general de gas natural, descritos en la introducción de este proyecto, la concentración de estos compuestos en la mezcla de biometano deben cumplir valores de $\text{O}_2 < 1\%$, $\text{CO}_2 < 2\%$ y $\text{CH}_4 > 90\%$.

Como se puede observar, los resultados obtenidos en el proceso de upgrading fotosintético en un fotobiorreactor cerrado son positivos cumpliendo, en cuanto a la concentración de estos componentes con todos los requisitos para su inyección directa en la red general de gas natural española. Es importante destacar que la composición del biometano se mantuvo estable durante los casi 60 días de operación de la etapa III, lo que demuestra la capacidad del sistema para operar en continuo.



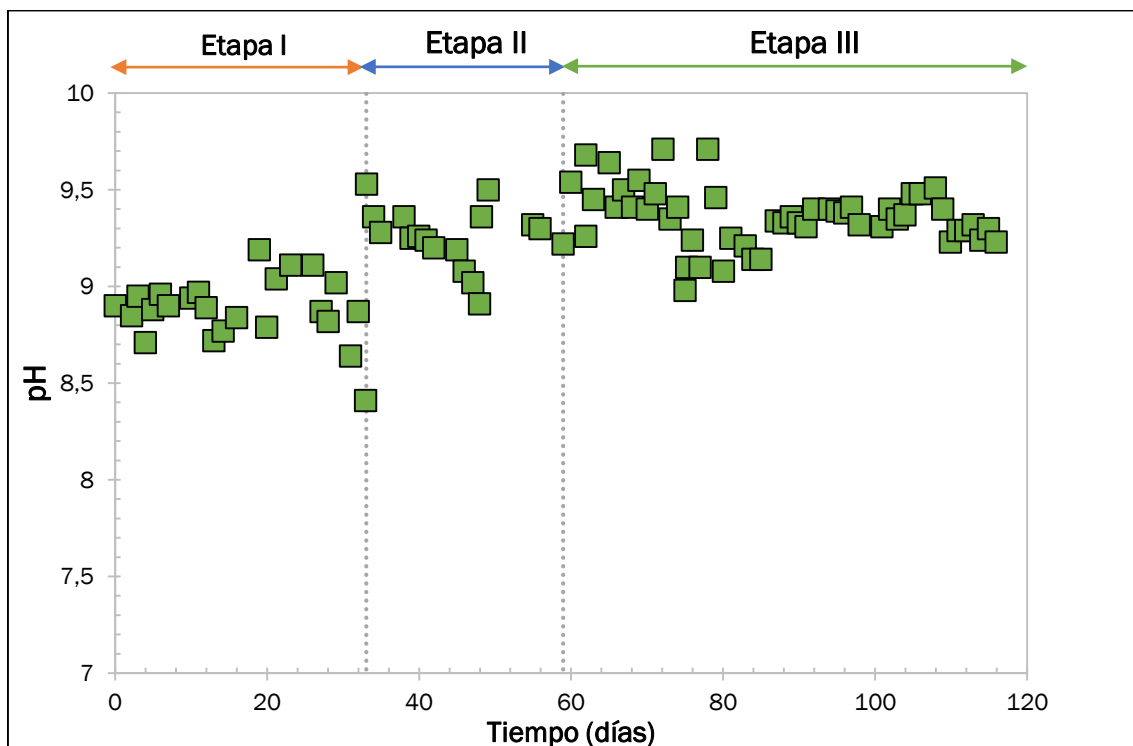
Gráfica 8. Composición del biometano en el fotobiorreactor tubular

4.2.2 pH

En la gráfica 9 se puede observar la evolución del pH a lo largo del experimento. Los valores promedio del pH durante la etapa I fueron de $8,9 \pm 0,2$ y de $9,3 \pm 0,2$ durante la etapa II, mientras que, en la etapa III, el pH tuvo un valor promedio de $9,4 \pm 0,2$. Estos valores fueron adecuados para el crecimiento de los microorganismos (Acién y col. 2012).

Se detectó un aumento en este parámetro junto con el aumento del Cl. Esto se puede atribuir al aumento de la concentración de carbonatos en el medio salino añadido al sistema. Debido al carácter alcalino de los carbonatos, el pH aumenta a medida que se incrementa la concentración de éstos (Rodero et. al 2018).

En el fotobiorreactor abierto, Rodero y col. (2018) obtuvo valores de pH próximos a la neutralidad (7,2-7,5) en la etapa con una carga de Cl de 100 mg/L, aumentando a ~10 con una carga de Cl de 500 mg/L y valores entre 10,5 y 11 en la etapa con una carga de Cl en el medio de 1500 mg/L.



Gráfica 9. Valores de pH en el fotobiorreactor tubular

4.2.3 Carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total

En la tabla 28 se pueden observar los valores promedio del COT, CI y NT evaluados durante las tres etapas del proyecto. En cuanto al COT, es importante por su relación con el número de metabolitos presentes en el medio, con la eliminación de CO₂ (Bahr y col., 2014; Serejo y col., 2015). Durante la etapa I se obtuvo una concentración de COT de $12,2 \pm 5,7$ mg/L, sin embargo, durante las etapas II y III esta concentración fue aumentando de $22,2 \pm 13,4$ mg/L hasta $48,8 \pm 53,3$ mg/L, respectivamente.

El valor promedio de la concentración del CI presente en el medio nos sirve para cerciorarnos de esta concentración que caracteriza y diferencia las diferentes etapas. Los valores obtenidos para cada etapa fueron de $219,8 \pm 22,3$ mg/L para la etapa I, $525,1 \pm 162,7$ mg/L para la etapa II y de $1679,4 \pm 82,6$ mg/L para la etapa III.

Por último, el valor de la concentración de nitrógeno presente en el medio fue de $98,9 \pm 6,7$ mg/L en la etapa I, $100,7 \pm 7,4$ mg/L en la etapa II y, por último, de $82,2 \pm 12,7$ mg/L para la etapa III. Estos valores nos permiten descartar una limitación de nitrógeno.

Posadas y col. (2015) obtuvo un resultado de entre 85 y 105 mg/L de COT, de entre 71 y 124 mg/L de CI y de entre 86 y 24 mg/L de NT en un fotobiorreactor abierto para el upgrading de biogás en condiciones de interior.

	COT (mg/L)	CI (mg/L)	NT (mg/L)
Etapa I	$12,1 \pm 5,7$	$219,8 \pm 22,3$	$98,9 \pm 6,7$
Etapa II	$22,2 \pm 13,4$	$525,1 \pm 162,6$	$100,7 \pm 7,4$
Etapa III	$48,8 \pm 53,3$	$1679,4 \pm 82,6$	$82,2 \pm 12,7$

Tabla 28. Valores promedio de COT, CI y NT en el fotobiorreactor tubular

4.2.4 Oxígeno disuelto

Como se observa en la tabla 29, la concentración de OD se mantuvo constante a lo largo del experimento en torno a 16-20 mg/L. La alta concentración de OD en este proceso se debió a la actividad fotosintética llevada a cabo por parte de los microorganismos presentes en el sistema.

El oxígeno disuelto fue analizado continuamente, durante el periodo iluminado, debido a que representa un parámetro crítico ya que es una respuesta casi inmediata a la actividad fotosintética de las microalgas, el proceso más importante llevado a cabo en el fotobiorreactor tubular cerrado. Esta actividad fotosintética dependerá de las condiciones ambientales en las que se encuentre el medio siendo determinantes: la temperatura, la luz y el pH (Muñoz y col., 2015). El valor obtenido por Posadas y col. (2015) durante su experimento fue de alrededor de 7 mg/L.

	OD (mg/L)	Temperatura °C
Etapa I	19,9 ± 2,9	27,0 ± 2,4
Etapa II	18,5 ± 2,6	28,7 ± 1,7
Etapa III	16,3 ± 5,2	26,7 ± 1,7

Tabla 29. Oxígeno disuelto y temperatura en el caldo de cultivo en el fotobiorreactor tubular

4.2.5 Sólidos suspendidos totales y productividad de la biomasa

Rodero y col. (2018) obtuvo valores de concentración de SST de entre 0,2 y 0,5 g/L, inferiores a los obtenidos durante este proyecto (Tabla 30). Esto es de esperar debido a que la operación en un fotobiorreactor cerrado permite alcanzar valores superiores de SST. Este parámetro también es clave para el funcionamiento del sistema, ya que concentraciones muy altas de sólidos pueden limitar la penetración de la luz en el interior de los tubos y reducir la actividad fotosintética.

La productividad se mantuvo entre los $3,3 \pm 0,8$ g/d durante la etapa I, mientras que en la etapa II aumentó a $4,3 \pm 1,1$ g/d y $3,6 \pm 0,9$ g/d durante la etapa III.

	SST (g/L)	Productividad (g/d)
Etapa I	0,6 ± 0,2	3,3 ± 0,8
Etapa II	0,9 ± 0,2	4,3 ± 1,1
Etapa III	0,7 ± 0,2	3,6 ± 0,9

Tabla 30. Concentración de SST y productividad en el fotobiorreactor tubular

4.2.6 Aniones

Las concentraciones de N-NO_2^- , N-NO_3^- , P-PO_4^{3-} , SO_4^{2-} a lo largo del experimento se muestran en la tabla 31.

En las etapas I y II no se detectó N-NO_2^- en el caldo de cultivo. Sin embargo, durante la etapa III el N-NO_2^- alcanza un valor de $9,7 \pm 17,6$ mg/L. Por otra parte, la concentración de N-NO_3^- durante las etapas I, II y III fue de $443,7 \pm 88,3$ mg/L, $504,5 \pm 131,6$ mg/L y $410,0 \pm 83,7$ mg/L, respectivamente. De estos resultados se entiende, que en las dos primeras etapas se produjo una nitrificación completa mientras que, en la tercera etapa, la nitrificación fue parcial quedando parte del nitrógeno oxidado en N-NO_2^- . La presencia de los iones nitrito y nitrato se debe a la conversión del NH_4^+ , que es introducido al sistema a través de la sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por bacterias nitrificantes. En primer lugar, el NH_4^+ es oxidado a N-NO_2^- . A continuación, el N-NO_2^- es oxidado a N-NO_3^- . Por lo tanto, debido a la capacidad oxidante de estas bacterias presentes se puede observar que en las etapas I y II la composición de N-NO_2^- es cero, debido a que el NH_4^+ ha sido oxidado, en último lugar a N-NO_3^- . En la etapa III, sin embargo, parte del NH_4^+ se ha quedado en forma de N-NO_2^- (Muñoz y col., 2015).

La concentración de SO_4^{2-} fue de $820,6 \pm 181,9$ mg/L en la etapa I, $867,2 \pm 234,5$ mg/L en la etapa II y de $894,1 \pm 54,4$ mg/L en la etapa III. Este SO_4^{2-} , por su parte, proviene tanto de la separación del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al disolverse en el medio, como de la reacción de oxidación del H_2S , consumido por parte de las bacterias sulfato oxidantes, que lo oxidan utilizando como compuestos aceptores oxígeno fotosintético molecular o $\text{N-NO}_2^- / \text{N-NO}_3^-$ (Muñoz y col., 2015)

Según el balance de masa realizado al sistema se añaden 720 mg/L de SO_4^{2-} , incluidos en el 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el medio para los cinco litros con que se alimenta el sistema diariamente. El resto de la concentración de SO_4^{2-} presente en el medio se debe a la oxidación de H_2S a SO_4^{2-} .

	N-NO_2^- (mg/L)	N-NO_3^- (mg/L)	P-PO_4^{3-} (mg/L)	SO_4^{2-} (mg/L)
Etapas I	$0,0 \pm 0,0$	$443,7 \pm 88,3$	$2258,4 \pm 461,2$	$821,0 \pm 182,0$
Etapas II	$0,0 \pm 0,0$	$504,2 \pm 131,6$	$2573,5 \pm 615,4$	$867,2 \pm 234,5$
Etapas III	$9,7 \pm 17,5$	$410,0 \pm 83,7$	$2686,5 \pm 94,1$	$894,1 \pm 54,4$

Tabla 31. Concentración de aniones (N-NO_2^- , N-NO_3^- , P-PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) en el fotobiorreactor tubular

4.2.7 Población microalgal

A lo largo de las distintas etapas del fotobiorreactor, se analizaron muestras del caldo de cultivo con el fin de contabilizar la población de microorganismos presente. Los resultados de la concentración de los diferentes microorganismos presentes se muestra en la Tabla 32.

El inóculo inicial disponía, principalmente, de cuatro microorganismos: *Aphanothece* sp., *Chlorella* sp., *Mayamaea* sp. y *Pseudoanabaena* sp. con abundancias de 21%, 24%, 12% y 27%, respectivamente. En la etapa I, *Chlorella* sp. fue dominante en el medio de cultivo con una presencia del 79% de global de individuos.

Estos microorganismos corresponden a distintas clasificaciones. *Aphanothece* sp. y *Pseudoanabaena* sp. son dos especies de cianobacterias, *Chlorella* sp. es un tipo de alga verde que se puede encontrar en una gran variedad de ambientes, mientras que *Mayamaea* sp. es una bacteria del reino chromista (Komárek y col., 2005; Shihira y col., 1965).

En la etapa II, la abundancia de *Pseudoanabaena* sp. aumentó hasta un 22% de la población total, reduciéndose la de *Chlorella* sp. hasta un 48%. *Aphanothece* sp. y *Mayamaea* sp. se mantuvieron en concentraciones < 1%.

En la etapa III, *Chlorella* sp. y *Pseudoanabaena* sp. mantuvieron prácticamente sus concentraciones con valores de 52% y 32%, respectivamente. *Mayamaea* sp. permaneció con una concentración < 1%, y *Aphanothece* sp. mostró un 3% en el último muestreo.

Durante el proceso, por lo tanto, las especies *Chlorella* sp. y *Pseudoanabaena* sp. dominaron el medio aumentando sus concentraciones desde un 24 % a un 52 % ind. en el caso de *Chlorella* sp. y de un 27 % a un 32 % ind. en el caso de *Pseudoanabaena* sp. reduciendo la concentración de las otras especies a, prácticamente, cero.

	Inóculo (Ind.)	Etapas I (Ind.)	Etapas II (Ind.)	Etapas III (Ind.)
<i>Aphanothece</i> sp.	21%	0%	0%	3%
<i>Chlorella</i> sp.	24%	79%	48%	52%
<i>Mayamaea</i> sp.	12%	0%	0%	0%
<i>Pseudoanabaena</i> sp.	27%	0%	22%	32%

Tabla 32. Evolución de las poblaciones del inóculo durante la operación en el fotobiorreactor tubular



Serejo y col., (2015) comenzó con un inóculo formado por 100% *Chlorella* sp. pasando, a lo largo del proceso, a un cultivo formado por 48% *Pseudoanabaena* sp., 26% *Chloromonas* sp. y, el resto, de *Chlorella* sp. Bose y col., (2019) realizó estudio sobre las microalgas más efectivas para la revalorización de biogás a biometano analizando cinco parámetros entre los que se encontraban su capacidad de crecimiento, la tolerancia al pH, su actividad fotosintética y la tolerancia a altas concentraciones de CO₂. Concluyó que una de las mejores microalgas para este fin era la especie de *Chlorella* junto con *Anabaena cylindrica*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina platensis* y *Synechococcus* sp. Durante este experimento, ha tenido gran presencia *Chlorella* sp.



5 Conclusiones

El proceso de *upgrading* de biogás en un fotobiorreactor tubular cerrado acoplado a una columna de absorción externa ha demostrado ser válido para la obtención de un biometano con las características necesarias para su inserción en las redes de distribución de gas natural (de acuerdo a la normativa española) que exige el cumplimiento de los siguientes requisitos: % (mol) de $O_2 < 1\%$, $CO_2 < 2\%$ y $CH_4 > 90\%$. A lo largo de este trabajo se obtuvo una composición óptima de biometano de $0,4 \pm 0,2$ % de O_2 , $1,2 \pm 0,4$ % de CO_2 y $97,1 \pm 0,9$ % de CH_4 . Esta composición óptima del biometano fue obtenida operando con un ratio flujo de líquido/flujo de gas en la columna de 0,5 y una concentración de carbono inorgánico en el medio mineral de 1600mg/L. Para estos parámetros de operación, el sistema biológico alcanzó unas eliminaciones de $96,3 \pm 1,1$ % de CO_2 y $> 99,9\%$ de H_2S .

Sin embargo, aunque la cianobacteria *N. Muscorum* demostró una buena capacidad de eliminación de CO_2 a las concentraciones típicas encontradas en el biogás (30 % vol), no se han obtenido valores significativos de acumulación de PHBs por parte de esta cianobacteria bajo ninguna de las condiciones de limitación de nutrientes estudiada (ratios de N:P de 50:1, 10:1 y 3:4). Del mismo modo, la adición de ácidos grasos volátiles (ác. acético y ác. valérico en concentraciones entre 0,04 y 0,06 mg/L) como fuente adicional de carbono para promover la producción de este compuesto tampoco resultó en una mayor acumulación de estos compuestos.



Bibliografía

- A., C. (2011). Biogas Upgrading by Pressure Swing Adsorption. *Biofuel's Engineering Process Technology*. <https://doi.org/10.5772/18428>
- Abatzoglou, N., & Boivin, S. (2009). A review of biogas purification processes. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. <https://doi.org/10.1002/bbb.117>
- Allegue, L. B., & Hinge, J. (2014). Biogas upgrading Evaluation of methods for H₂S removal. Danish Technological Institute, (December), 31. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.002766>
- Anbalagan, A., Toledo-Cervantes, A., Posadas, E., Rojo, E. M., Lebrero, R., González-Sánchez, A., ... Muñoz, R. (2017). Continuous photosynthetic abatement of CO₂ and volatile organic compounds from exhaust gas coupled to wastewater treatment: Evaluation of tubular algal-bacterial photobioreactor. *Journal of CO₂ Utilization*, 21, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.07.016>
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90313-D](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90313-D)
- Anderson, T. R., Hawkins, E., & Jones, P. D. (2016). CO₂, the greenhouse effect and global warming: from the pioneering work of Arrhenius and Callendar to today's Earth System Models. *Endeavour*, 40(3), 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2016.07.002>
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., & Perales, J. A. (2013). Effect of pH control by means of flue gas addition on three different photo-bioreactors treating urban wastewater in long-term operation. *Ecological Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.040>
- Arias, D. M., Uggetti, E., García-Galán, M. J., & García, J. (2018). Production of polyhydroxybutyrates and carbohydrates in a mixed cyanobacterial culture: Effect of nutrients limitation and photoperiods. *New Biotechnology*, 42(January), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.01.001>
- Awe, O. W., Zhao, Y., Nzihou, A., Minh, D. P., Awe, O. W., Zhao, Y., ... Review, A. (2018). A Review of Biogas Utilisation , Purification and Upgrading Technologies To cite this version : HAL Id : hal-01619254 A Review of Biogas Utilisation , Purification and Upgrading Technologies.
- Bahr, M., Díaz, I., Dominguez, A., González Sánchez, A., & Muñoz, R. (2014). Microalgal-biotechnology as a platform for an integral biogas upgrading and nutrient removal from anaerobic effluents. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es403596m>
- Bailón, L., & Hinge, J. (2012). Biogas and bio-syngas upgrading. DTI Report, (December), 1-97. Recuperado de http://www.teknologisk.dk/_root/media/52679_Report-Biogas and syngas upgrading.pdf
- Balaji, S., Gopi, K., & Muthuvelan, B. (2013). A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Research*, 2(3), 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.002>
- Bauer, F., Hulteberg, C., Persson, T., & Tamm, D. (2013). Biogas upgrading – Review of commercial technologies. Swedish Gas Center Report SGC

- 2013:270 Available at http://vav.griffel.net/filer/C_SGC2013-270.pdf Last access August 2017. <https://doi.org/SGC> Rapport 2013:270
- Bhati, R., & Mallick, N. (2012). Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by a N₂-fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* Agardh. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(4), 505-512. <https://doi.org/10.1002/jctb.2737>
- Bhati, R., Samantaray, S., Sharma, L., & Mallick, N. (2010). Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy. *Biotechnology Journal*, 5(11), 1181-1185. <https://doi.org/10.1002/biot.201000252>
- Bose, A., Lin, R., Rajendran, K., O'Shea, R., Xia, A., & Murphy, J. D. (2019, December 1). How to optimise photosynthetic biogas upgrading: a perspective on system design and microalgae selection. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107444>
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., & Fuller, R. C. (1988). *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly (β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), 1977-1982.
- Bucci, D. Z., Tavares, L. B. B., & Sell, I. (2007). Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. *Polymer Testing*. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2007.06.013>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Choi, J. II, & Lee, S. Y. (1999). Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990305\)62:5<546::AID-BIT6>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990305)62:5<546::AID-BIT6>3.0.CO;2-0)
- Collier, J. L., & Grossman, A. R. (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Not all bleaching is the same. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.174.14.4718-4726.1992>
- Daniela Thrän, E. B., Tobias Persson, Mattias Svensson, Jaqueline Daniel-Gromke, Jens Ponitka, M. S., & Baldwin, J. (2014a). Biomethane Status and Factors Affecting Market Development and Trade. En IEA Bioenergy.
- Daniela Thrän, E. B., Tobias Persson, Mattias Svensson, Jaqueline Daniel-Gromke, Jens Ponitka, M. S., & Baldwin, J. (2014b). Biomethane Status and Factors Affecting Market Development and Trade. En IEA Bioenergy. Recuperado de <http://www.iea-biogas.net/files/daten-redaktion/download/Technical^>
- De biogás a biometano, Biovec, ingeniería ambiental [WWW Document] URL: <Http://biovec.net/biometano/> (accessed 4.7.19).
- EBA Biomethane & Biogas Report 2015 published! | European Biogas Association. (s. f.). Recuperado 8 de diciembre de 2019, de <https://www.europeanbiogas.eu/biogasreport2015/>
- El biometano es el futuro, IES biogás, srl - Via T. Donadon, 4 - 33170 Pordenone (Italy) [WWW Document] URL: <http://www.iesbiogas.it/es/biometano-y-el-futuro/528> (accessed 4.7.19).
- España, B. (2018). Resolución de 8 de octubre de 2018, de la Dirección General de Política Energética y Minas, por la que se modifican las normas de gestión técnica del sistema NGTS-06, NGTS-07 y los protocolos de detalle PD-01 y PD-

02. Boletín oficial del estado, 102917-102948. Recuperado de http://portaljuridico.lexnova.es/public/contenidos/legislacion/IMAGENES/OEHA3316_10_4.PDF
- Franco-Morgado, M., Alcántara, C., Noyola, A., Muñoz, R., & González-Sánchez, A. (2017). A study of photosynthetic biogas upgrading based on a high rate algal pond under alkaline conditions: Influence of the illumination regime. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.077>
- Gabriel Acien Fernandez, F., González-López, C. V., Fernández Sevilla, J. M., & Molina Grima, E. (2012, November). Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal? *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4362-z>
- Gislon, P., Galli, S., & Monteleone, G. (2013). Siloxanes removal from biogas by high surface area adsorbents. *Waste Management*, 33(12), 2687–2693. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.08.023>
- Haase, S. M., Huchzermeyer, B., & Rath, T. (2012a). PHB accumulation in *Nostoc muscorum* under different carbon stress situations. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9663-6>
- Haase, S. M., Huchzermeyer, B., & Rath, T. (2012b). PHB accumulation in *Nostoc muscorum* under different carbon stress situations. *Journal of Applied Phycology*, 24(2), 157-162. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9663-6>
- Handrick, R., Reinhardt, S., & Jendrossek, D. (2000). Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.182.20.5916-5918.2000>
- Harding, K. G., Dennis, J. S., von Blottnitz, H., & Harrison, S. T. L. (2007). Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly-β-hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *Journal of Biotechnology*, 130(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.012>
- Hempel, F., Bozarth, A. S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., ... Maier, U. G. (2011). Microalgae as bioreactors for bioplastic production. *Microbial Cell Factories*, 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-81>
- Hosseini, S. E., & Wahid, M. A. (2014). Development of biogas combustion in combined heat and power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.204>
- Hoyer, K., Hulteberg, C., Svensson, M., Jernberg, J. & Nørregård, O. (2016). Biogas upgrading - Technical Review. S.l. : Energiforsk, 2016. ISBN 978-91-7673-275-5.
- Kabilan, S., Ayyasamy, M., Jayavel, S., & Paramasamy, G. (2012). *Pseudomonas* sp. as a source of medium chain length polyhydroxyalkanoates for controlled drug delivery: Perspective. *International Journal of Microbiology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/317828>
- Kao, C. Y., Chiu, S. Y., Huang, T. T., Dai, L., Hsu, L. K., & Lin, C. S. (2012). Ability of a mutant strain of the microalga *Chlorella* sp. to capture carbon dioxide for biogas upgrading. *Applied Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.12.082>
- Kapdi, S. S., Vijay, V. K., Rajesh, S. K., & Prasad, R. (2005). Biogas scrubbing,

- compression and storage: Perspective and prospectus in Indian context. *Renewable Energy*, 30(8), 1195-1202. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2004.09.012>
- Khardenavis, A. A., Suresh Kumar, M., Mudliar, S. N., & Chakrabarti, T. (2007). Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly β -hydroxybutyrate. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.024>
- Khosravi-Darani, K., & Bucci, D. Z. (2015). Application of poly(hydroxyalkanoate) in food packaging: Improvements by nanotechnology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 275-285. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2260>
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2005). *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota: 2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales*. Vol. 19 pp. 1-759. München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag
- Lasocki, J., Kołodziejczyk, K., & Matuszewska, A. (2015). Laboratory-scale investigation of biogas treatment by removal of hydrogen sulfide and Carbon Dioxide. *Polish Journal of Environmental Studies*. <https://doi.org/10.15244/pjoes/35283>
- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10061-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5)
- Li, R. Y., & Fang, H. H. P. (2008). Hydrogen production characteristics of photoheterotrophic *Rubrivivax gelatinosus* L31. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.12.001>
- López, J. C., Quijano, G., Souza, T. S. O., Estrada, J. M., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2013, marzo). Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: State of the art and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 97, pp. 2277-2303. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4734-z>
- M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2020. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 19 October 2019.
- McChalicher, C. W. J., & Srienc, F. (2007). Investigating the structure-property relationship of bacterial PHA block copolymers. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.04.014>
- Melnicki, M. R., Eroglu, E., & Melis, A. (2009). Changes in hydrogen production and polymer accumulation upon sulfur-deprivation in purple photosynthetic bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.115>
- Miyairi, S. (1995). CO₂ assimilation in a thermophilic cyanobacterium. *Energy Conversion and Management*. [https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00116-U](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00116-U)
- Muñoz, R., Meier, L., Diaz, I., & Jeison, D. (2015). A review on the state-of-the-art of physical/chemical and biological technologies for biogas upgrading. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), 727-759. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9379-1>
- Nishioka, M., Nakai, K., Miyake, M., Asada, Y., & Taya, M. (2001). Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp.



- MA19, under phosphate-limited conditions. *Biotechnology Letters*.
<https://doi.org/10.1023/A:1010551614648>
- Oeding, V., & Schlegel, H. G. (1973). β Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly β hydroxybutyrate metabolism. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj1340239>
- Patterson, T., Esteves, S., Dinsdale, R., & Guwy, A. (2011). An evaluation of the policy and techno-economic factors affecting the potential for biogas upgrading for transport fuel use in the UK. *Energy Policy*, 39(3), 1806-1816. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.01.017>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Persson, M., Jonsson, O., & Wellinger, A. (2007). Biogas Upgrading To Vehicle Fuel Standards and Grid. *IEA Bioenergy*, 1-32.
- Petersson, A., & Wellinger, A. (2009). Biogas upgrading technologies—developments and innovations. *IEA Bioenergy*, 20. Recuperado de <http://typo3.dena.de/fileadmin/biogas/Downloads/Studien/IEA-BiogasUpgradingTechnologies2009.pdf>
- Posadas, E., Serejo, M. L., Blanco, S., Pérez, R., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2015). Minimization of biomethane oxygen concentration during biogas upgrading in algal-bacterial photobioreactors. *Algal Research*, Vol. 12, pp. 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.002>
- Raesossadati, M. J., Ahmadzadeh, H., McHenry, M. P., & Moheimani, N. R. (2014). CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. *Algal Research*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.007>
- Rimsha, R., Richa, J., Sheela, K., Shrivastava, P. N., & Manju, J. (2014). Bioactive substances of cyanobacteria (*Nostoc muscorum*): a review. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 5(07), 320-322.
- Rivard, C., Moens, L., Roberts, K., Brigham, J., & Kelley, S. (1995). Starch esters as biodegradable plastics: Effects of ester group chain length and degree of substitution on anaerobic biodegradation. *Enzyme and Microbial Technology*. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00120-G](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00120-G)
- Rodero, M. del R., Posadas, E., Toledo-Cervantes, A., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2018). Influence of alkalinity and temperature on photosynthetic biogas upgrading efficiency in high rate algal ponds. *Algal Research*, 33(June), 284-290. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.001>
- Rosa, D. S., Lotto, N. T., Lopes, D. R., & Guedes, C. G. F. (2004). The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly- β -(hydroxybutyrate) and poly- β -(hydroxybutyrate-co- β -valerate). *Polymer Testing*. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(03\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(03)00042-4)
- Ryckebosch, E., Drouillon, M., & Vervaeren, H. (2011). Techniques for transformation of biogas to biomethane. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.033>
- Saperstein, Aliya & Penner, A. (2012). The University of Chicago Press <http://www.jstor.org/stable/10.1086/667722> . *American Journal of Sociology*, 118(3), 676-727.
- Serejo, M. L., Posadas, E., Boncz, M. A., Blanco, S., García-Encina, P., & Muñoz, R.

- (2015). Influence of biogas flow rate on biomass composition during the optimization of biogas upgrading in microalgal-bacterial processes. *Environmental Science and Technology*, 49(5), 3228-3236. <https://doi.org/10.1021/es5056116>
- Sharma, L., & Mallick, N. (2005). Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: Regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. *Bioresource Technology*, 96(11), 1304-1310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.009>
- Shihira, I. & Krauss, R.W. (1965). *Chlorella. Physiology and taxonomy of forty-one isolates*. pp. 1-97. Maryland: University of Maryland, College Park.
- Shilev, S., Naydenov, M., Vancheva, V., & Aladjadjiyan, A. (2007). Composting of food and agricultural wastes. En *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry* (pp. 283-301). https://doi.org/10.1007/978-0-387-35766-9_15
- Shrivastav, A., Mishra, S. K., Shethia, B., Pancha, I., Jain, D., & Mishra, S. (2010). Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.04.007>
- Singh, A. K., Sharma, L., Mallick, N., & Mala, J. (2017). Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1213-1232. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1006-1>
- Sun, Q., Li, H., Yan, J., Liu, L., Yu, Z., & Yu, X. (2015). Selection of appropriate biogas upgrading technology-a review of biogas cleaning, upgrading and utilisation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.029>
- Tock, L., Gassner, M., & Maréchal, F. (2010). Thermochemical production of liquid fuels from biomass: Thermo-economic modeling, process design and process integration analysis. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.07.018>
- Toledo-Cervantes, A., Serejo, M. L., Blanco, S., Pérez, R., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2016). Photosynthetic biogas upgrading to bio-methane: Boosting nutrient recovery via biomass productivity control. *Algal Research*, 17, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.017>
- Toledo-Cervantes, A., Morales, T., González, Á., Muñoz, R., & Lebrero, R. (2018). Long-term photosynthetic CO₂ removal from biogas and flue-gas: Exploring the potential of closed photobioreactors for high-value biomass production. *Science of the Total Environment*, 640-641, 1272-1278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.270>
- Towler, G., & Sinnott, R. K. (2013). *Chemical Engineering Design - Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design* (2nd Edition). En Elsevier. Elsevier.
- Tynell, Å., Börjesson, G., & Persson, M. (2007). Microbial growth on pall rings: A problem when upgrading biogas with the water-wash absorption technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/BF02729069>
- Wang, W., Xie, L., Luo, G., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2013). Performance and



- microbial community analysis of the anaerobic reactor with coke oven gas biomethanation and in situ biogas upgrading. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.049>
- Wilken, D., Strippel, F., Hofmann, F., Maciejczyk, M., Klinkmüller, L., Wagner, L., ... Findeisen, C. (2017). Biogas to Biomethane. Unido, 9. Recuperado de <https://www.biogas-to-biomethane.com/Download/BTB.pdf>
- Witt, U., Müller, R. J., & Deckwer, W. D. (1997). Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 5(2), 81-89. <https://doi.org/10.1007/BF02763591>
- Wu, G. F., Wu, Q. Y., & Shen, Z. Y. (2001). Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresource Technology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00099-7)
- Zhu, C., Zhang, Z., Liu, Q., Wang, Z., & Jin, J. (2003). Synthesis and Biodegradation of Aliphatic Polyesters from Dicarboxylic Acids and Diols. *Journal of Applied Polymer Science*. <https://doi.org/10.1002/app.12722>