

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Microalgas como fuente de biomasa para la producción
de biogás**

Tesis que presenta

Mariana Candía Lomelí

Para obtener el grado de

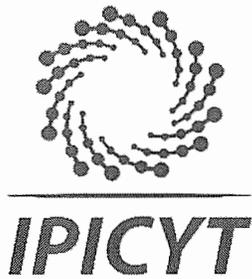
Maestría en Ciencias Ambientales

Co-Directoras de la Tesis

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre 2018



Constancia de aprobación de la tesis

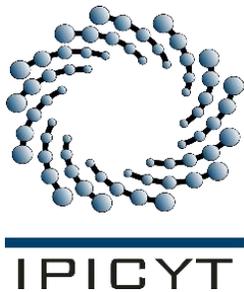
La tesis **“Microalgas como fuente de biomasa para la producción de biogás”** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Mariana Candia Lomelí** y aprobada el veintisiete de noviembre del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Codirectora de la tesis

Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría
Codirectora de la tesis

Dr. Felipe Alatríste Mondragón
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Elías Razo Flores
Miembro del Comité Tutorial

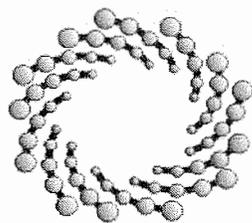


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la co-dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García y de la Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Fondo Sectorial SENER- CONACYT Sustentabilidad Energética, CEMIE-Bio, Clúster Biocombustibles Gaseosos 247006.

Durante la realización de este trabajo de investigación la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 611422.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 061 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 27 días del mes de noviembre del año 2018, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Elías Razo Flores	Presidente	IPICYT
Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Secretario	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Mariana Candia Lomelí

sobre la Tesis intitulada:

Microalgas como fuente de biomasa para la producción de biogás

que se desarrolló bajo la dirección de

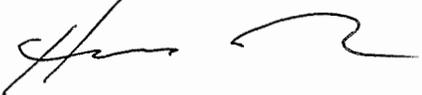
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarra (UAM)

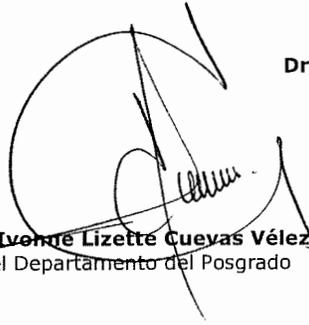
El Jurado, después de deliberar, determinó

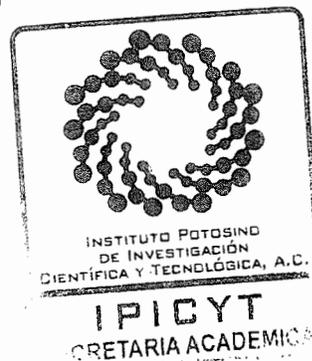
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 27 días del mes de noviembre de 2018.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mis padres Gerardo y Graciela por todo su apoyo y amor,

A mis hermanas Sarai, Andrea y Sofía y a mi hermano Gerardo por acompañarme con alegría y cariño en este trayecto.

Agradecimientos

Me complace extender mi más profundo agradecimiento a la Dra. María de Lourdes Berenice García por permitirme trabajar bajo su dirección, por compartir su conocimiento y experiencia y también por su paciencia y dedicación, así como a la Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría por los aportes a este trabajo. Al Dr. Elías Razo Flores y al Dr. Felipe Alatriste Mondragón por sus valiosos aportes, sus críticas constructivas y su tiempo.

Agradezco al IPICYT por la infraestructura y facilidades para realizar mi maestría.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada.

A los técnicos académicos de la División de Ciencias Ambientales, la M. en C. Dulce Isela de Fátima Partida Gutiérrez, el M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, el M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz y la Q.F.B. Elizabeth Cortez Cedillo por su apoyo técnico.

Gracias a mis amigas Anaí, Karime, Marisol por todos los buenos momentos que compartimos en el transcurso de estos años.

Finalmente, agradezco a toda mi familia, por su acompañamiento, su apoyo incondicional, por creer en mí y por todo su amor.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Índice de Tablas.....	ix
Índice de figuras	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Biogás como energía renovable.....	5
2.2. Digestión anaerobia (DA)	5
2.3. Etapas de la digestión anaerobia.....	5
2.4. Sustratos para la digestión anaerobia	7
2.5. Metanogénesis en condiciones alcalinas	8
2.6. Microalgas.....	8
2.7. Clasificación.....	9
2.8. Cultivo.....	9
2.9. Acoplamiento del cultivo de microalgas con la digestión anaerobia.....	10
2.10. Especies de microalgas que se han usado para producción de biogás.....	11
2.11. Rendimiento teórico de metano a partir de microalgas	12
2.12. Pared celular de las microalgas	13
2.13. Pretratamientos.....	15
2.13.1 Pretratamientos térmicos.....	15
2.13.2 Pretratamientos mecánicos.....	16
2.13.3 Pretratamientos químicos.....	16
2.13.4 Pretratamientos biológicos.....	18
2.13.5 Inhibidores	18
2.14. Producción de biogás con microalgas	19
3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Microalga <i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	23
4.2. Lodo granular anaerobio	23
4.3. Medio de cultivo para las pruebas de biodegradabilidad anaerobia y para la determinación de la actividad metanogénica	23

4.4.	Caracterización de la biomasa microalgal	24
4.4.1	Cuantificación de carbohidratos totales	24
4.4.2	Cuantificación de proteínas.....	24
4.4.3	Cuantificación de lípidos neutros.....	24
4.5.	Estrategia Experimental	24
4.6.	Pretratamiento alcalino con NaOH.....	25
4.7.	Pretratamiento alcalino con CaO.....	26
4.8.	Pretratamiento alcalino con Peróxido de Hidrógeno Alcalino	26
4.9.	Aclimatación de lodo granular a pH alcalino	27
4.10.	Cuantificación de la actividad metanogénica acetoclástica del lodo a pH alcalino	27
4.11.	Potencial bioquímico de metano	28
4.12.	Análisis estadístico	29
4.13.	Métodos analíticos.....	29
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1.	Caracterización de la biomasa microalgal	31
5.2.	Aclimatación de lodo granular a pH alcalino	32
5.3.1	Solubilización de materia orgánica	35
5.3.2	Solubilización de carbohidratos y proteínas.....	38
5.3.	Potencial Bioquímico de Metano	42
6.	CONCLUSIONES	50
7.	REFERENCIAS	52

Índice de Tablas

Tabla 2.1 Rutas y reacciones para la generación de metano y su energía libre de Gibbs. (Abassi et al., 2012).....	7
Tabla 2.2. Microorganismos involucrados en la digestión anaerobia. Tomado de Abbasi et al., (2012).....	7
Tabla 2.3 Principales grupos de microalgas y sus productos de almacenamiento. Tomado de Murphy et al. (2015):.....	9
Tabla 2.4. Fórmula química para la biomasa microalgal y <i>Scenedesmus</i> sp.....	12
Tabla 2.5. Grado de solubilización y producción de metano obtenidos con distintos pretratamientos.	20
Tabla 4.1. Diseño experimental propuesto para determinar las mejores condiciones con las que se logra solubilizar materia orgánica de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	25
Tabla 4.2. Aclimatación de lodo granular anaerobio.....	27
Tabla 5.1. Composición bioquímica de la biomasa microalgal <i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	31
Tabla 5.2. Diferencias significativas entre cantidad de carbohidratos solubles obtenidos después de los diferentes pretratamientos por gramo de peso seco de microalga para Lote 1 y Lote 2. Prueba de Tukey realizada con R3.3.2. Las letras iguales indican aquellos pretratamientos entre los que no existen diferencias significativas, mientras que letras diferentes indica que existen diferencias significativas.....	40
Tabla 5.3. Diferencias significativas entre cantidad de proteínas solubles obtenidos después de los diferentes pretratamientos por gramo de peso seco de microalga para Lote 1 y Lote 2. Prueba de Tukey realizada con R 3.3.2. Las letras iguales indican aquellos pretratamientos entre los que no existen diferencias significativas, mientras que letras diferentes indica que existen diferencias significativas.....	41
Tabla 5.4. Parámetros de Gompertz modificado para la producción de metano para el Lote 1 de biomasa microalgal.	47
Tabla 5.5. Parámetros de Gompertz modificado para la producción de metano para el Lote 2 de biomasa microalgal.	47

Índice de Figuras

Figura 2.1 A) Representación esquemática de la pared celular de <i>Scenedesmus</i> sp. Tomado de (Gonzalez-Fernandez & Muñoz, 2017); B) Estructura química de algaenan y C) Estructura química de la esporopolenina Tomado de (Al Sandouk-Lincke et al., 2014).....	14
Figura 2.2. Clasificación de los pretratamientos para mejorar la producción de biogás a partir de microalgas. Tomado de Passos et al. (2014).....	15
Figura 5.1 Desempeño del reactor UASB. A) Velocidad volumétrica de producción de metano. B) Carga orgánica volumétrica.....	34
Figura 5.2 Eficiencia de solubilización de DQO de cada uno de los lotes de biomasa microalgal y con cada uno de los pretratamientos aplicados.....	36
Figura 5.3 Diferencias significativas entre cantidad de DQO soluble obtenida después de los diferentes pretratamientos por gramo de peso seco de microalga alimentada para Lote 1 A) y Lote 2 B). Prueba de Tukey. Realizado con R 3.3.2. Las letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$)	37
Figura 5.4 Eficiencias de solubilización después de aplicar diferentes pretratamientos termoalcalinos a dos distintos lotes de biomasa microalgal. A) Solubilización de carbohidratos; B) Solubilización de proteínas.....	39
Figura 5.5. Concentración de DQO (mg/L) al inicio de la prueba de potencial de metano para dos lotes de biomasa microalgal. A) Lote 1; B) Lote 2.....	43
Figura 5.6 Concentración de carbohidratos y proteínas solubles al inicio de la prueba de potencial de metano. A) Lote1; B) Lote 2.....	44
Figura 5.7 Producción acumulada de metano para dos lotes de biomasa microalgal. A) Lote 1 y B) Lote 2, Muestras por triplicado.	45
Figura 5.8 Volumen de metano obtenido en cada pretratamiento y la contribución de DQO particulada y soluble. A) Lote 1. B) Lote 2.....	48

Resumen

Microalgas como fuente de biomasa para la producción de biogás

La biomasa microalgal es un sustrato idóneo para la producción de biocombustibles carbono neutrales, que representan una alternativa al uso de combustibles fósiles, entre ellos se encuentra el biogás. El biogás es una mezcla de 55-75% (CH₄) y 45-25% (CO₂) y se obtiene por medio de un proceso denominado digestión anaerobia. En el caso de la biomasa microalgal, es necesaria la aplicación de un pretratamiento a dicha biomasa para liberar los compuestos orgánicos susceptibles de convertirse en biocombustible, y así favorecer el proceso de digestión anaerobia. Cuando la digestión anaerobia se realiza en condiciones alcalinas el porcentaje de CH₄ en el biogás será mayor que el obtenido a pH neutro, debido al equilibrio de fases a pH alcalino entre el CO₂ producido por la DA y su disolución como bicarbonato en el líquido. Por tanto, resultaría conveniente aplicar un pretratamiento alcalino a la biomasa microalgal y posteriormente realizar la producción de metano en condiciones alcalinas, y evitar el uso de reactivos para neutralizar el pH de la biomasa pretratada. Además el acoplamiento de la digestión anaerobia con el cultivo de biomasa microalgal presenta la capacidad de secuestrar CO₂ ya sea atmosférico, del propio biogás o del generado durante su combustión, así como de reciclar nutrientes (N y P). El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la factibilidad de utilizar biomasa microalgal pretratada en condiciones alcalinas como sustrato para la producción de biogás. Se evaluaron diferentes pretratamientos termoalcalinos con distintos álcalis y condiciones de temperatura (NaOH y CaO); además se usó peróxido de hidrógeno alcalino (PHA). Los pretratamientos se realizaron sobre 2 lotes diferentes de biomasa microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus*. Después de aplicar los diferentes pretratamientos termoalcalinos, se observó un aumento en la solubilización de materia orgánica de 10.8 a 19.5% con los diferentes pretratamientos. La digestión anaerobia en condiciones alcalinas requirió la aclimatación gradual de un lodo a pH 9, la cual se llevó a cabo en un reactor UASB de 1.25 L con un TRH 27.2 h. Las pruebas de potencial de metano se realizaron con un pH inicial de 9 en donde el rendimiento de producción más alto se obtuvo con PHA 1.5% a 50°C por 1.5 h para el Lote 1 y con NaOH 4 M a 120°C por 20 min tanto para el Lote 2 de biomasa microalgal (320.6 mL CH₄/g SV y 227.1 mL CH₄/g SV respectivamente). En cuanto a la velocidad de producción de metano no se encontraron diferencias significativas (p>0.5) entre la biomasa pretratada y sin pretratar en el Lote 1, para el Lote 2 la velocidad de producción más alta se obtuvo con NaOH 4M (28.8 mL/g SV·d). El porcentaje de metano presente en los ensayos de potencial de metano estuvo entre 78 a 100% a pH 9 y no fue necesaria la neutralización del hidrolizado ya que se contaba con lodo aclimatado a condiciones alcalinas.

Palabras clave: digestión anaerobia alcalina, *Scenedesmus obtusiusculus*, pretratamiento alcalino, peróxido de hidrógeno alcalino, biomasa microalgal, metano

Abstract

Microalgae as a source of biomass for the production of biogas

Microalgal biomass is an ideal substrate for the production of neutral carbon biofuels, such as biogas, which represents an alternative to the use of fossil fuels. Biogas is a mixture of 55-75% (CH₄) and 45-25% (CO₂) and is obtained by anaerobic digestion. In order to digest the microalgal biomass it is necessary to apply a pre-treatment to release the organic compounds susceptible to be transformed into biofuel, and thus favor the anaerobic digestion process. If the anaerobic digestion is carried out under alkaline conditions, the CH₄ content in the biogas will be higher than that obtained at neutral pH, due to the phase equilibrium reached between the CO₂ produce by the anaerobic digestion and its dissolution as bicarbonate in the liquid phase. Therefore, it would be convenient to apply an alkaline pretreatment to the microalgal biomass and subsequently to produce methane under alkaline conditions, and avoid the use of reagents to neutralize the pH of the pre-treated biomass. Besides the coupling of anaerobic digestion with microalgal biomass culture has the ability to sequester atmospheric CO₂ and CO₂ from the combustion process, as well as recycling nutrients (N and P). The aim of this work was to determine the feasibility of using pre-treated microalgal biomass as a substrate for the production of biogas under alkaline conditions. Therefore, different thermoalkaline pretreatments were evaluated with different conditions of temperature and alkalis NaOH and CaO; alkaline hydrogen peroxide (PHA) was also used for alkaline pretreatment. After applying the different thermoalkaline pretreatments to two lots of the microalgae *Scenedesmus obtusiusculus* (1 and 2), an increase in the solubilization of organic matter was observed from 10.8 to 19.5% with the different pretreatments. Anaerobic digestion under alkaline conditions required the gradual acclimatization of the anaerobic sludge at pH 9, which was carried out in a UASB reactor of 1.25 L with a HRT of 27.2 h. The methane potential tests were performed with an initial pH of 9 where the highest production yield was obtained with PHA 1.5% at 50 °C for 1.5 h for Lot 1 and with the pretreatment 4 M NaOH at 120 ° C for 20 min for Lot 2 (320.6 mL CH₄ / g SV and 227.1 mL CH₄ / g SV respectively). Regarding the rate of methane production, no significant differences were found ($p > 0.5$) between pretreated and untreated biomass in Lot 1, for Lot 2 the highest production rate was obtained with 4M NaOH (28.8 mL/g SV·d). The percentage of methane present in the methane potential tests varied from 78 to 100% at pH 9 and the neutralization of the hydrolysate was not necessary because an acclimated inoculum to alkaline pH was used.

Keywords: alkaline anaerobic digestion, *Scenedesmus obtusiusculus*, alkaline pretreatment, alkaline hydrogen peroxide, microalgal biomass, methane.

1. INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles son la principal fuente de energía en el mundo, el aumento en la demanda de energía debido al incremento de la población mundial ha acelerado la disminución de las reservas de energía no renovable; además su combustión libera grandes cantidades de dióxido de carbono (CO_2) a la atmósfera, un gas de efecto invernadero que contribuye al calentamiento global. Bajo esta óptica, el uso continuo de combustibles fósiles se considera como no sostenible. Algunos acuerdos internacionales como el protocolo de Kioto de 1997, que finalizará en el 2020 y el Acuerdo de París que entrará en vigor en ese mismo año, han establecido reducir las emisiones de CO_2 , por lo que se requiere la búsqueda de fuentes sostenibles de energía.

Los biocombustibles (renovables) como el biogás pueden ser una alternativa para ayudar a suplir la demanda energética, así como para disminuir las emisiones de CO_2 , ya que tienen un gran potencial para proveer de rutas carbono-neutrales durante su producción (Dorado, 2017; Bahadar & Bilal Khan, 2013; Razzak et al., 2013). El biogás es una mezcla de 55-75% CH_4 y 45-25% CO_2 con trazas de otros gases como sulfuro de hidrógeno y se obtiene de un proceso biológico llamado digestión anaerobia que transforma la materia orgánica en ausencia de oxígeno. Cuando se digieren sustratos sólidos de este proceso también se obtiene un subproducto llamado digestato, que es el sustrato descompuesto resultado de la producción de biogás (Williams et al., 2017). La digestión anaerobia ocurre en cuatro etapas secuenciales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Durante la hidrólisis las macromoléculas (carbohidratos, proteínas, lípidos) son degradadas en compuestos de menor peso molecular (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga), estos productos son fermentados durante la acidogénesis para formar ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato), en la acetogénesis las bacterias consumen estos productos de fermentación y generan acetato, dióxido de carbono e hidrógeno, posteriormente los microorganismos metanogénicos consumen el acetato, hidrógeno y parte del dióxido de carbono para producir metano (Brennan & Owende, 2010; Abbasi et al., 2012)

La eficiencia del proceso de digestión anaerobia está influenciada por distintos parámetros, tales como la exclusión de oxígeno, temperatura, pH, suministro de nutrientes, así como presencia y cantidad de inhibidores. La formación de metano toma lugar dentro

de un intervalo de pH estrecho entre 5.5- 8.5, con un intervalo óptimo entre 7.0-8.0 para la mayoría de los metanógenos (Seadi et al., 2008). El pH ha sido reportado como uno de los factores más importantes que impactan en el contenido de CH₄ en el biogás, ya que controla el sistema de especiación del sistema carbonato y la liberación de CO₂ a la fase gaseosa. A un pH alto el contenido de metano en el biogás es mayor que a pH neutro, debido al equilibrio de fases entre el CO₂ producto de la digestión anaerobia que reacciona con los OH⁻ presentes en el medio para formar bicarbonato, quedando disuelto en el líquido (Singh & Dhar, 2011).

Dentro de los sustratos empleados para la producción de biogás, se encuentran los que son extraídos de cultivos alimentarios y oleaginosos (caña de azúcar, remolacha azucarera, maíz, aceites vegetales y grasas animales), los cuales se denominan de primera generación y su principal limitación es la competencia con la agricultura por tierra cultivable para la producción de alimentos debido al aumento en las capacidades de producción. Además pueden causar problemas ambientales significativos, debido al uso intensivo de la tierra y la necesidad de una extensa aplicación de fertilizantes y pesticidas. La segunda generación de biocombustibles pretende producirlos a partir de biomasa lignocelulósica proveniente de desechos agrícolas o residuos de cosecha forestales. Sin embargo la tecnología para su conversión no ha alcanzado las escalas para la explotación comercial (Brennan & Owende, 2010; Dragone et al., 2010).

Las características que debe tener un biocombustible para que sea técnica y económicamente viable son: ser competitivo, requerir poco o ningún uso adicional de la tierra, permitir la mejora de la calidad del aire (secuestro de CO₂) y requerir un uso mínimo de agua (Brennan & Owende, 2010). La explotación de las microalgas podría cumplir con estas características y contribuir significativamente a satisfacer la demanda de energía y a su vez proporcionar beneficios ambientales (Brennan & Owende, 2010). Un punto a favor es que las microalgas tienen el potencial de proporcionar alimentos y combustible a niveles de productividad por unidad de área que igualan o superan a los de los cultivos terrestres; su rápido crecimiento, altos rendimientos de biomasa, diversidad de productos y ~~fácil~~ pueden cosecharse en estanques o sistemas cerrados (fotobiorreactores) les otorgan un excelente potencial como fuente de combustible renovable (Bahadar & Bilal Khan, 2013).

En particular, la biomasa microalgal consiste en una mezcla de materia orgánica e inorgánica. La materia orgánica está compuesta de macromoléculas, como proteínas, polisacáridos, lípidos, y ácidos nucleicos; todos éstos se encuentran en forma particulada o coloidal. Mientras la inorgánica la componen el fosfato inorgánico presente en las células microalgales como polifosfatos, además de S, K, Na, Fe, Mg, Ca y elementos traza como B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, V y Se, los elementos traza son importantes en reacciones enzimáticas y el biosíntesis de varios compuestos (Richmond, 2004). Un factor importante en la degradación anaerobia de la microalga es la presencia de una pared celular recalcitrante, en el caso de *Scenedesmus* sp. se ha reportado que la pared se encuentra formada por celulosa y hemicelulosa, además de la presencia de un compuesto llamado esporopolenina. Con el objetivo de disminuir la fracción recalcitrante orgánica y aumentar la digestibilidad de la biomasa es necesario aplicar un pretratamiento para incrementar el rendimiento y la tasa de producción de metano. En orden de evaluar la biodegradabilidad del sustrato y su potencial de producir CH₄ vía digestión anaerobia se realiza la prueba de potencial de metano (BMP), el cuál es definido como el máximo volumen de metano producido por gramo de sólidos volátiles (SV) del sustrato. Tales pruebas han sido ampliamente utilizados para determinar el rendimiento de CH₄ de los sustratos orgánicos en la digestión anaerobia (Jingura & Kamusoko, 2017)

Bajo esta óptica, el acoplamiento del cultivo de microalgas con la digestión anaerobia permitiría satisfacer las altas demandas de CO₂ y nutrientes del cultivo de microalgas, ya que el CO₂ removido del biogás puede ser utilizado como fuente de carbono y el digestato producto del proceso de fermentación puede proveer la fuente de nutrientes (N, P). El CO₂ puede ser transformado en biomasa microalgal y dicha biomasa puede entonces utilizarse como sustrato para la producción de biogás adicional (Persson, et al., 2007; Meier et al., 2015; Murphy et al., 2015; Ward et al., 2014). El metano producido a través de la digestión anaerobia puede ser utilizado de cuatro formas básicas: combustible para vehículos, producción de reactivos químicos, producción de calor y vapor y producción/cogeneración de electricidad. La aplicación más común para el biogás es para el calentamiento y la generación de energía. Puede usarse directamente en el sitio donde es generado o distribuido, o ser alimentado a la red de distribución de gas natural después de ser purificado; el uso específico del biogás lo determinará el grado de purificación. El

biogás empleado para combustible de vehículos o para ser inyectado a la red de gas natural en países como Suiza y Alemania debe contener un porcentaje de CO₂ menor a 6%, mientras que en Francia este debe ser menor a 2%. El CO₂ debe ser eliminado para aumentar el poder calorífico del gas. (Dorado, 2017; Persson, et al., 2007). Sin embargo el acoplamiento del cultivo de microalgas con la digestión anaerobia implicaría la inversión en infraestructura para almacenamiento de biogás así como del efluente de tal forma que estas dos corrientes pudieran ser usadas para el cultivo de microalgas. Así como los procesos e infraestructura necesarios para la cosecha y pretratamiento de la microalga; se ha señalado que estos dos procesos representan un reto para el escalamiento dada su alta demanda de energía (Wang et al., 2013).

El presente trabajo tuvo como propósito determinar la factibilidad de utilizar biomasa microalgal pretratada como sustrato para la producción de biogás en condiciones alcalinas y se encuentra dentro del marco de la Acción Estratégica número 9: “Acondicionamiento de corrientes gaseosas”, que forma parte del macroproyecto Clúster Biocombustibles Gaseosos, como parte de la iniciativa de la Secretaría de Energía (SENER) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para la conformación de Centros Mexicanos de Innovación en Bioenergía (CEMIE-Bio), que tienen como finalidad desarrollar proyectos que generen valor agregado para la industria bioenergética mexicana.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biogás como energía renovable

El biogás se genera cuando la materia orgánica se descompone en ausencia de oxígeno, y consiste entre 40-75% de metano y el resto es mayormente CO₂ con trazas de otros gases. Tiene un valor calorífico alrededor de 5000 kcal/m³ (Abbasi et al., 2012) y es permanentemente renovable a partir de residuos (Seadi et al., 2008).

La utilización de combustibles fósiles transforma el carbono almacenado durante millones de años en la corteza terrestre y lo libera a la atmósfera como CO₂. El aumento de la concentración actual de CO₂ en la atmósfera provoca el calentamiento global ya que el CO₂ es un gas de efecto invernadero (GEI). Los combustibles renovables son llamados carbono neutrales, esto significa que su combustión representa un aumento de cero a la cantidad de carbono en la atmósfera. La biomasa contribuye a tener procesos carbono neutrales porque la cantidad de CO₂ generado en la combustión se utiliza para el crecimiento de nueva biomasa, lo que produce una emisión neta cero. El carbono inorgánico en forma de CO₂ sirve como fuente de carbono para que la biomasa realice la fotosíntesis y sintetice biomasa (Agarwal et al, 2017).

La producción de biogás ofrece un soporte versátil de energía renovable, ya que el metano puede utilizarse para reemplazar a los combustibles fósiles (Dorado et al., 2017).

2.2. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso bioquímico durante el cual la materia orgánica compleja se descompone en ausencia de oxígeno, por varios tipos de microorganismos anaerobios. Es un proceso de etapas enlazadas, en el cual el material inicial es continuamente degradado en unidades más pequeñas. Este proceso es común en ambientes naturales como sedimentos marinos, el estómago de rumiantes o en turberas. En cada etapa están involucrados grupos específicos de microorganismos. Estos microorganismos descomponen sucesivamente los productos de las etapas anteriores (Seadi et al., 2008).

2.3. Etapas de la digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un tipo de fermentación que conduce al rompimiento de compuestos orgánicos biodegradables complejos en un proceso de 4 etapas y en el que se encuentran involucrados 4 grupos fisiológicos de bacterias:

1.- Hidrólisis. Macromoléculas como proteínas, grasas y polímeros de carbohidratos (como celulosa y almidón) son degradados a través de la hidrólisis a aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga y azúcares (Abbasi et al., 2012). Esta etapa se lleva a cabo por el primer grupo de bacterias las hidrolíticas, que producen exoenzimas y éstas descomponen el material particulado no disuelto (Seadi et al., 2008).

2.- Acidogénesis. Azúcares simples, aminoácidos y ácidos grasos son degradados en acetato, CO₂ e hidrógeno (70%) así como en otros ácidos grasos volátiles de cadena corta (30%) principalmente ácido láctico, propiónico, butírico y valérico. Aquí participan bacterias fermentadoras. (Abbasi et al., 2012; Seadi et al., 2008).

3.- Acetogénesis. En esta etapa las bacterias consumen estos productos de fermentación y generan principalmente ácido acético, CO₂ e hidrógeno y la realizan un grupo de bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno (Abbasi et al., 2012; Seadi et al., 2008).

4.- Metanogénesis. Finalmente, los organismos metanogénicos consumen el acetato, hidrógeno y una parte del CO₂ para producir metano. Tres rutas bioquímicas son usadas por los metanógenos para lograr esto: a) ruta acetotrófica b) ruta hidrogenotrófica y c) ruta metilotrófica. De acuerdo con las reacciones presentadas en la Tabla 2.1. En esta etapa se encuentran involucrados 2 grupos fisiológicamente diferentes de microorganismos metanogénicos una convierte el hidrógeno y CO₂ en metano y el otro grupo forma metano de la descarboxilación de acetato, en la Tabla 2.2 se señala el género de los microorganismos que participan en cada etapa.(Abbasi et al., 2012; Seadi et al., 2008, Thauer et al. 1977).

La velocidad a la que ocurre el proceso es determinada por la reacción más lenta del proceso de digestión anaerobia. En el caso de producir biogás a partir de sustratos complejos, como aquellos que contienen celulosa, hemicelulosa, por ejemplo en el caso de las microalgas, la hidrólisis es la etapa que determina la velocidad de reacción del proceso. (Seadi et al., 2008).

Tabla 2.1 Rutas y reacciones para la generación de metano y su energía libre de Gibbs. (Abassi et al., 2012).

Ruta	Reacción	ΔG (kJ/mol)
Acetotrófica	$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-31
Hidrogenotrófica	$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130.7
Metilotrófica	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-112.5

Tabla 2.2. Microorganismos involucrados en la digestión anaerobia. Tomado de Abbasi et al., (2012)

Etapa	Principales microorganismos involucrados
Hidrólisis $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)$	Varios géneros de microorganismos fermentativos
Acidogénesis $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{H}_2 + \text{CO}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2$	<i>Bacteriodes, Clostridium</i> <i>Butyrvibrie, Eubacterium</i>
Acetogénesis $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$	<i>Desulfovibrio,</i> <i>Syntrophobacter,</i> <i>Syntrophomonas</i>
Metanogénesis $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ $2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_4$ $2\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_4$ $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter,</i> <i>Methanobrevibacter</i> <i>Metanospirillum</i> <i>Methanosarcina</i>

2.4. Sustratos para la digestión anaerobia

Biomasa es el término general usado para describir toda la materia biológica y por tanto incluye todos los tipos de materiales y sustancias derivadas de organismos vivos (Biosantech et al., 2013). Las fuentes de biomasa adecuadas como sustratos para la digestión anaerobia, tienen un alto contenido de azúcar, almidón, proteínas o grasas y una característica común es su capacidad de ser fácilmente degradados. Las fuentes de biomasa sujetas a producción de biogás pueden agruparse en 4 categorías según el sector que las

genera: agrícolas (estiércol, desechos y subproductos de los cultivos, cultivos energéticos), industriales (subproductos y desechos de industrias de alimentos y bebidas, farmacéutica, papelera, bioquímica y cosmética), municipales (fracción orgánica de residuos sólidos urbanos, lodos residuales, desechos sólidos municipales) y biomasa acuática que incluye macro y micro-algas. Las macroalgas, conocidas como algas marinas, son ricas en azúcares y otros carbohidratos y presentan un alto rendimiento de biomasa. El segundo grupo son las microalgas, un grupo heterogéneo de organismos microscópicos fotosintéticos, mayormente unicelulares, procedentes de aguas marinas o dulces (Biosantech et al., 2013).

2.5. Metanogénesis en condiciones alcalinas

La mayoría de los procesos para generar biogás se llevan a cabo bajo condiciones neutrófilas; típicamente en estas condiciones la proporción de metano en el biogás se encuentra entre 40-75%. Se ha observado que el factor que más impacta en el contenido de metano en el biogás es el pH, el cual controla la especiación del sistema de carbonato y el equilibrio de fases del CO₂ entre la fase líquida y el gas. Si el pH es básico, entonces el contenido de CO₂ en la fase líquida aumentará por lo que el porcentaje de CH₄ en el gas será un poco mayor que a pH neutro. Esto debido al hecho de que la solubilidad del CO₂ está determinada principalmente por el pH de la solución que impacta la capacidad buffer del sistema de carbonatos. En condiciones alcalinas, el intervalo de pH de 6.3 a 10 favorece la disolución de CO₂ en el líquido y por efecto de la especiación la concentración de bicarbonato (HCO₃⁻) en el medio aumentará, lo que a su vez promueve la disolución de dióxido de carbono. Dado que todo el CO₂ disuelto reacciona inmediatamente con OH⁻ para formar bicarbonato, la cinética de absorción de CO₂ es más rápida a pH alcalino que a pH neutro y por lo tanto el CO₂ permanece en solución como carbonatos (alcalinidad) resultando en un bajo porcentaje de CO₂ en el biogás (Nolla-Ardevol et al., 2015).

2.6. Microalgas

Las microalgas son talofitas (plantas sin raíz, hojas y tallo) que tienen clorofila “a” como su pigmento fotosintético primario, éstas se encuentran principalmente en agua ya sea agua dulce o salobre (Lee, 2008). Son sintetizadores primarios de materia orgánica en hábitats acuáticos y tienen un rango de tamaño de 2 a 20 µm. La mayoría de las microalgas son

ricas fuentes de ácidos grasos esenciales, pigmentos, aminoácidos y vitaminas (Perumal et al., 2015).

2.7. Clasificación

Dependiendo del nivel de organización celular y la abundancia de pigmentos protectores, las microalgas pueden dividirse en varios grupos tal como se presenta en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Principales grupos de microalgas y sus productos de almacenamiento. Tomado de Murphy et al. (2015):

Tipo de célula	Grupo	Pigmentos fotosintéticos y protectores	Productos de almacenamiento
Procariota	Cianobacteria	Clorofila a, ficobilinas, β -caroteno, xantofilas	Gránulos de cianoficina, almidón de cianofitano (glicano)
Eucariota	Glaucofitas	Clorofila a, ficobilinas, β -caroteno, xantofilas	Almidón
	Clorarachnoides	Clorofila a y b, β -caroteno, otros carotenos xantofilas	Carbohidratos
	Euglenoides	Clorofila a y b, β -caroteno, otros carotenos xantofilas	Paramilon
	Criptomonas	Clorofila a y c, α y β -caroteno, xantofilas	Almidón
	Haptofitas	Clorofila a y c, β -caroteno, xantofilas	Crisolaminarina
	Dinoflagelados	Clorofila a y c, β -caroteno, xantofilas	Almidón
	Estramenofilos fotosintéticos	Clorofila a y c (clorofilas a solo en algunas, β -caroteno, xantofilas)	Crisolaminarina, lípidos
	Algas rojas	Clorofila a, ficobilinas α y β -caroteno, xantofilas	Almidón florídeo.
	Algas verdes	Clorofila a y b, β -caroteno, luteínas, otros carotenos, xantofilas	Almidón vegetal

2.8. Cultivo

La biomasa de microalgas se puede cosechar de cuerpos de agua naturales así como de cultivos en estanques artificiales o fotobiorreactores (FBR) (Murphy et al., 2015). El cultivo puede definirse como un medio ambiente artificial en el que crecen las microalgas y

se logra bajo condiciones controladas en el laboratorio o bajo condiciones de campo/al aire libre (Perumal et al., 2015). Los sistemas de cultivo se pueden clasificar como sistemas de cultivo abiertos y cerrados. (Murphy et al., 2015).

Los sistemas de cultivo abierto son los sistemas más comúnmente utilizados para la producción de microalgas a gran escala. El sistema artificial más utilizado es el raceway, que consiste en un estanque de forma ovalada que se asemeja a un circuito de carreras, como el de un hipódromo, por ejemplo. Estos sistemas no compiten con los cultivos agrícolas por la tierra, ya que pueden establecerse en áreas de producción de cultivos mínima, sin embargo se encuentran limitados por factores de crecimiento abióticos como la temperatura, el pH, la intensidad de la luz, la concentración de oxígeno disuelto, además son fácilmente sometidos a contaminación, puesto que no están cubiertos. Dado que la contaminación es un serio factor limitante para el cultivo de algas en sistemas de estanques abiertos, las especies cultivadas se cultivan bajo ambientes muy selectivos como alta alcalinidad y alta salinidad (Medipally et al., 2015).

Los sistemas cerrados están generalmente disponibles en forma de tubos, bolsas o placas, que están hechas de vidrio, plástico u otros materiales transparentes. Las algas se cultivan en estos sistemas con un suministro adecuado de luz, nutrientes y dióxido de carbono. Algunos diseños incluyen reactores anulares, tubulares y de panel plano, con grandes superficies (Medipally et al., 2015). El sistema de cultivo cerrado es de tipo más regulado y exitoso en el mantenimiento del monocultivo de microalgas (Mallick et al., 2016)

2.9. Acoplamiento del cultivo de microalgas con la digestión anaerobia

Las ventajas que presenta la digestión anaerobia de la biomasa microalgal son: alta productividad, ya que las microalgas tienen una eficiencia de conversión de luz a biomasa más grande que la de las plantas, de 5 -10% vs 0.5-3%, se pueden usar aguas residuales o agua salada para su cultivo, no compiten con la producción de alimentos, el secuestro de carbono, ya que las microalgas convierten CO₂ en biomasa y la digestión anaerobia puede convertir todas las fracciones de material orgánica, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos a biocombustibles (Lee, 2013).

2.10. Especies de microalgas que se han usado para producción de biogás

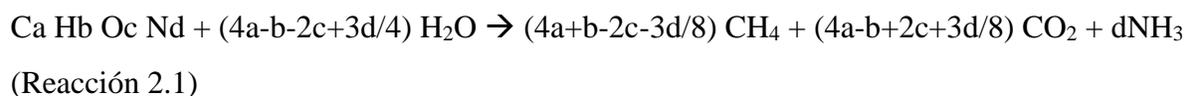
Entre los géneros y especies empleados como sustrato en la digestión anaerobia se encuentran *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Dunaliella*, *Spirulina*, *Arthrospira*, *Chlamydomonas*, *Euglena*, *Acutodesmus obliquus*, *Oocystus* sp, *Microspora*, *Thalassiosira*, *Pavlova* sp, entre otras. También se han estudiado mezclas de microalgas provenientes del tratamiento de aguas residuales, entre las más empleadas para la producción de biogás están *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., las cuales pertenecen al grupo de algas verdes (clorofitas).

Ya que el proceso de digestión anaerobia permite la utilización de todas las biomoléculas (carbohidratos, proteínas y lípidos) para la producción de energía (González-Fernández et al., 2012a), se debe tomar en cuenta la composición bioquímica de la microalga, la cual puede variar ampliamente, ya que las proporciones de diferentes constituyentes están influenciadas por diferentes factores como la temperatura, iluminación, pH, nutrientes minerales y suministro de CO₂ (Murphy et al., 2015). Aunque la composición es específica para cada especie, la biomasa microalgal está compuesta principalmente por proteínas y carbohidratos. Las proteínas y los carbohidratos tienen un rendimiento de metano de 0.851 y 0.415 L CH₄/g SV, respectivamente. Mientras que los lípidos tienen el contenido energético más grande 1.014 L CH₄/g SV aunque en algunos casos pueden representar una pequeña fracción de la biomasa microalgal (Mendez et al., 2013); la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos se encuentran entre 6-71, 4-64 y 1.9-40%, respectivamente del contenido de sólidos totales (ST) de la microalga (Murphy et al., 2015).

No sólo la composición química de la microalga influye en el proceso de digestión anaerobia, la pared celular ha sido señalada como uno de los mayores obstáculos para un proceso eficiente. La pared celular es una estructura semirrígida que protege a la microalga e impide la hidrólisis de la materia orgánica. Para poder liberar los compuestos orgánicos intracelulares e incrementar la eficiencia del proceso de digestión, se deberá romper la pared celular antes de proceder con la digestión anaerobia (Mendez et al., 2013).

2.11. Rendimiento teórico de metano a partir de microalgas

Al conocer la composición de C, H, O, y N del sustrato se puede usar la relación estequiométrica reportada por Buswell & Boruff, 1932 para estimar la composición teórica de biogás sobre base molar (Reacción 2.1)



Donde a,b,c y d equivalen al contenido de carbono, hidrógeno, oxígeno, y nitrógeno respectivamente. Esta ecuación es una aproximación teórica que permite la estimación del potencial máximo de rendimiento de metano.

Para calcular el volumen de gas metano dependiendo de la cantidad de SV disponibles en el sustrato, se utiliza la siguiente Ecuación:

$$\text{Rendimiento de metano (L/g SV)} = (4a +b -2c -3d/ 12a +b+16c +14 d) *V_m$$

(Ecuación 2.1)

Donde V_m es el volumen molar de metano ó 22.14 L a 0°C y 1 atm (condiciones estándar de presión y temperatura). Sin embargo esta ecuación sobreestima la producción de gas ya que asume 100% de conversión de SV a biogás y no considera las necesidades de los microorganismos para mantenimiento celular y anabolismo (Ward et al., 2014).

En la Tabla 2.4 se presenta el potencial de metano teórico para el género de microalgas *Scenedesmus*, que es el género de microalga que se usará en este estudio.

Tabla 2.4. Fórmula química para la biomasa microalgal y *Scenedesmus* sp

Especie	Fórmula química/ Composición química	Potencial de metano teórico (mL/g SV)	Referencia
Biomasa microalgal	$\text{CO}_{0.48} \text{H}_{1.83} \text{N}_{0.11} \text{P}_{0.01}$	645*	(Chisti, 2007)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	C 53.4 ± 0.6 H 7.8 ± 0.2 N 7.9 ± 0.1 O 31	260	(Ward et al., 2014),
<i>Scenedesmus</i> sp.	$\text{C}_{192} \text{H}_{348} \text{O}_{62} \text{N}_{26} \text{P}_{1.7} \text{S}$	640	(Lee, 2013).

*Calculado con la ecuación 2.1

2.12. Pared celular de las microalgas

En general, las paredes celulares de las algas están conformadas por 2 componentes: 1) el componente fibrilar, el cual forma el esqueleto de la pared y 2) los componentes amorfos, los cuales forman una matriz dentro de la cual el componente fibrilar está embebido (Lee, 2008).

El mayor componente fibrilar es la celulosa, un polímero de β -1,4-glucosa que se encuentra en forma de hilos cristalinos no ramificados e insolubles llamados microfibrillas que son productos de enlaces de hidrógeno inter e intrapolímeros de grupos hidroxilo entre las cadenas β -1,4-glucano adyacentes (Lee, 2008). Los polímeros que forman la matriz de la pared celular en plantas y muchas algas verdes son las hemicelulosas (por ejemplo, xilanos, xiloglucanos, mananos) y las pectinas. Las hemicelulosas representan un grupo químicamente diverso de polisacáridos que se asocian con microfibrillas de celulosa creando una red cohesiva en el marco estructural de la pared celular. Las hemicelulosas de plantas incluyen xiloglucanos, xilanos, mananos y glucanos de enlace mixto (MLG; β 1-3,1-4 glucanos). Las pectinas constituyen una clase de ácido galacturónico (GalA) que contiene polisacáridos que forman un dominio mayor de la matriz de la pared celular de las plantas y las algas. El tipo más común de pectina es homogalacturonano (HGA) el cual está hecho de α -1,4,- ácido galacturónico (GalA) (Borowitzka et al., 2016).

La pared celular de algas verdes como *Chlorella*, *Monoraphidium*, *Ankistrodesmus* y *Scenedesmus* contiene 24-74% de azúcares, 1- 24% ácido úrico, 2-16% proteínas y 0-15% glucosamina. Los principales azúcares son ramnosa y galactosa ó manosa y glucosa (Abo-Shady et al., 1993). Algunas microalgas (e.g., familias *Chlorellaceae*, *Scenedesmaceae*, *Hydrodictyaceae*) tienen una estructura trilaminar resistente que contiene un biopolímero no hidrolizable, llamado algaenan, la cual presenta estructuras alifática entrelazadas por medio de enlaces éter y éster (Fig 2.1) (Al Sandouk-Lincke et al., 2014; Lee, 2013).

La pared celular de *Scenedesmus* (Fig. 2.1) ha sido descrita como una pared rígida constituida por glucosa, manosa y galactosa. Sin embargo estos azúcares se encuentran unidos formando celulosa y hemicelulosa, junto con la presencia de algunos otros componentes celulares como por ejemplo el biopolímero tipo esporopolenina, esto le

confiere a la pared celular una alta resistencia al ataque bacteriano haciendo difícil la degradación anaerobia. La estructura de la esporopolenina está caracterizada por bloques de compuestos aromáticos oxigenados (ej. ácido p-cumárico y ácido ferúlico) o por materiales alifáticos de estructura desconocida, por lo que se ha sugerido que la esporopolenina tiene como estructura principal largas cadenas alifáticas que están entrelazadas con monómeros de ácido cinámico por medio de enlaces éster o éter (Fig 2.1) (Al Sandouk-Lincke et al., 2014). Así, a pesar de la alta biodegradabilidad anaerobia de los azúcares, su disponibilidad para la hidrólisis y posterior digestión anaerobia está limitada por la estructura de la pared celular (González-Fernández, et al., 2012b).

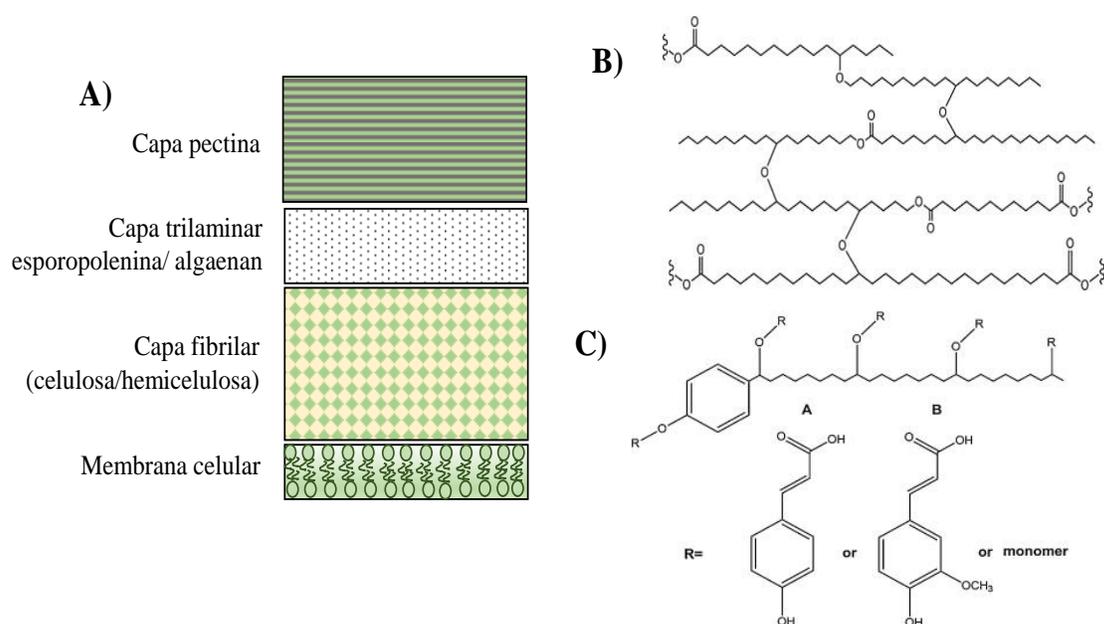


Figura 2.1 A) Representación esquemática de la pared celular de *Scenedesmus* sp. Modificado de (Gonzalez-Fernandez & Muñoz, 2017); B) Estructura química de algaenan y C) Estructura química de la esporopolenina Tomado de (Al Sandouk-Lincke et al., 2014)

Cabe mencionar que las microalgas verdes producen exopolisacáridos (EPS) sobre la superficie externa de la célula para adherirse a un sustrato y así incrementar su resistencia contra la erosión en su hábitat natural. La composición de los EPS incluye proteínas, glicoproteínas o lípidos en adición a los carbohidratos. En especies de algas verdes, los componentes monosacáridos de los EPS son hexosa, pentosa, ácido urónico, metil pentosa, metil hexosa y/p sulfato. Los monómeros más comunes son glucosa, galactosa, arabinosa, fucosa, xilosa, manosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico, siendo manosa el monosacárido más importante encontrado en los EPS de la clase Chlorophyceae incluyendo

Scenedesmus acuminatus, *Ankistrodesmus densus* y *Kirchneriella aperta* (Angelaalincy et al., 2017; Xiao & Zheng, 2016)

2.13. Pretratamientos

Como se ha visto, la biomasa microalgal resulta no fácilmente degradable por lo que es necesario pretratar la biomasa. El pretratamiento se aplica con los objetivos de disminuir la fracción recalcitrante orgánica, aumentar la digestibilidad de la biomasa, ayudar en el reciclaje de los nutrientes durante la digestión anaerobia y a su vez incrementar los rendimientos de metano (Paul et al., 2016; Sialve et al., 2011). La eficacia de los métodos de pretratamiento en la producción de biogás depende de la estructura de la pared celular y la composición macromolecular de las microalgas (Passos et al., 2014). Según Passos et al., 2014 los métodos de pretratamiento se pueden dividir en cuatro categorías: mecánicos, químicos, térmicos y biológicos (Figura 2.1).

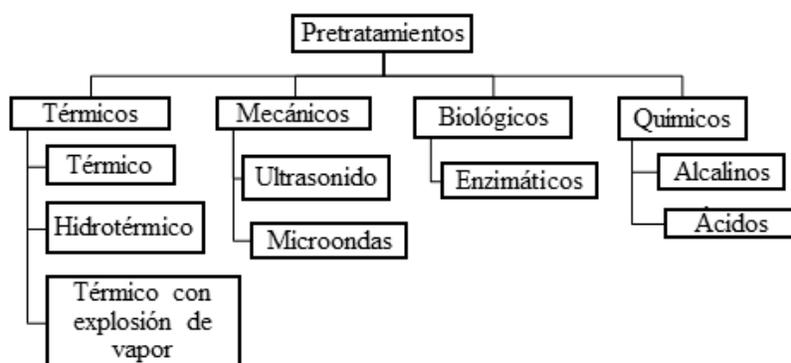


Figura 2.2. Clasificación de los pretratamientos para mejorar la producción de biogás a partir de microalgas. Tomado de Passos et al. (2014)

2.13.1 Pretratamientos térmicos

El principio de estos pretratamientos tiene su fundamento en que la aplicación de calor a la biomasa microalgal puede aumentar la solubilización de las fracciones orgánicas particuladas e hidroliza parcialmente moléculas poliméricas orgánicas. A una temperatura de 150 °C se lleva a cabo la solubilización de la celulosa y hemicelulosa, así como de los carbohidratos que forman parte de la pared celular de las microalgas, a temperaturas menores se rompen los enlaces de hidrógeno que unen a la celulosa y hemicelulosa (González-Fernández et al., 2012). Estos pretratamientos pueden subdividirse en 3 categorías: térmico, hidrotérmico y térmico con explosión de vapor (Passos et al. 2014). El pretratamiento térmico consiste en calentar la biomasa a temperaturas debajo de 100 °C a

presión atmosférica, el hidrotérmico consiste en aplicar calor a temperaturas superiores a 100 ° C, con el consiguiente aumento de la presión. La combinación de calor, presión y descompresión rápida, llamada explosión de vapor destruye las paredes celulares y libera el contenido celular intracelular haciéndolo accesible para la degradación biológica (Rodríguez et al., 2015).

2.13.2 Pretratamientos mecánicos

La destrucción de la pared celular por el método mecánico se logra por medio de fuerzas mecánicas tales como fuerzas de cizallamiento sólido (por ejemplo, molino de bolas, homogenización a alta velocidad), fuerzas de cizallamiento de líquido (por ejemplo, homogenización a alta presión), transferencia de energía a través de ondas (por ejemplo, ultrasonicación, microondas) o corrientes (por ejemplo, campo eléctrico pulsado) (Günerken et al., 2015). La principal desventaja de estos pretratamientos es el alto consumo de energía (Passos et al., 2014).

2.13.3 Pretratamientos químicos

Los reactivos ácidos y alcalinos se usan comúnmente para solubilizar polímeros, favoreciendo la disponibilidad de los compuestos orgánicos para ataques enzimáticos (Passos et al., 2014). La adición de álcalis tiene los siguientes efectos sobre la biomasa: i) amplía la superficie de la celulosa mediante el hinchamiento de la biomasa; ii) reduce la cristalinidad de la celulosa por la escisión del enlace glucosídico de los carbohidratos y iii) saponificación de los lípidos de la membrana. Tales efectos favorecen el ataque bacteriano y por lo tanto se mejora la producción de metano. Usualmente el pretratamiento químico se combina con altas temperaturas, sin embargo, este tipo de pretratamiento puede implicar pérdida de materia orgánica debido a reacciones degradativas, como la reacción de Maillard, la cual ocurre entre azúcares reductores, aminoácidos libres y proteínas cuando son calentados, no es una sola reacción sino un complejo de reacciones que llevan a la formación de polímeros nitrogenados y copolímeros conocidos como melanoidinas. (Martins et al., 2001; Mahdy et al., 2014; Günerken et al., 2015).

La cantidad de álcali residual que permanece en la biomasa pretratada puede ser útil para prevenir la reducción del pH durante la etapa de acidogénesis posterior. Sin embargo, cabe mencionar que algunos de los compuestos solubilizados pueden inducir la formación de subproductos potencialmente tóxicos para los metanógenos (Passos et al., 2014), además

del inconveniente de la corrosión de materiales al emplear compuestos químicos concentrados (Mendez et al., 2013).

Dentro de los reactivos reportados para el pretratamiento químico alcalino se encuentran NaOH (Cho et al., 2013; Bohutskyi et al., 2014; Mahdy et al., 2014; Mendez et al., 2013), KOH (Passos et al, 2016b), y CaO (Solé-Bundó et al., 2017), y en algunos casos se combinan con calor. De manera general se puede decir que los pretratamientos termoquímicos aumentan en mayor grado la solubilización de carbohidratos y proteínas que los pretratamientos químicos, en donde a las temperaturas más altas y mayores concentraciones que se han aplicado (120 °C, 72 °C, NaOH 5% w/w, 10% CaO, 2% KOH) se observa el mayor efecto y en donde el tiempo de incubación poco influye en el grado de solubilización. Además, en condiciones ácidas prevalece la liberación de carbohidratos en el medio mientras que en condiciones alcalinas, las proteínas, glicoproteínas y la pectina son solubilizadas en mayor medida. Cabe mencionar que la efectividad del pretratamiento depende en gran medida de la especie de microalga, debido a la estructura específica de la pared celular. Sin embargo, la demanda química de oxígeno (DQO) soluble liberada no necesariamente se correlaciona de manera positiva con la producción de metano. El pretratamiento térmico-alcalino conduce a niveles de solubilización y rendimientos de metano más grandes comparados con el pretratamiento térmico-ácido. Sin embargo, el amonio, compuestos químicos tóxicos, y /o ácidos grasos formados durante el pretratamiento pueden ser causa de una fuerte inhibición de los metanógenos (Lee, 2013)

Otro pretratamiento químico utilizado en la biomasa microalgal sobre el cual hay pocos estudios, aunque existe una amplia revisión de este sobre biomasa lignocelulósica, es el uso de peróxido de hidrógeno alcalino (PHA).

El H₂O₂ es un ácido débil que se ioniza según la Reacción 2.2. En medio alcalino, el peróxido de hidrógeno sigue la Reacción 2.3 hasta la formación del ión perhidroxilo, OOH⁻, especie activa. Pero en condiciones de elevada alcalinidad, el H₂O₂ puede descomponerse según la Reacción 2.4.



Las ventajas que presenta con respecto a otros pretratamientos químicos, es que el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino se lleva a cabo a temperatura media (50 °C) y conduce a una menor cantidad de formación de inhibidores comparado con otros pretratamientos, por ejemplo el pretratamiento ácido lleva a la formación de furfurales. En un estudio reciente se sugiere que este pretratamiento es adecuado para la biomasa microalgal, ya que ésta es rica en hemicelulosa, se podrían aprovechar las condiciones moderadas de temperatura a las que se aplica el pretratamiento (50 °C) y su alta eficiencia en la liberación de xilosa (Martín et al., 2016).

2.13.4 Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos consisten en la hidrólisis enzimática de las paredes celulares de las microalgas y otros biopolímeros para lograr que sean sustratos más disponibles para los microorganismos anaerobios. Las ventajas de este método implican una menor demanda de energía comparada con los métodos físicos, no implica la formación de compuestos inhibidores y además el costo económico puede ser mejorado al reemplazar enzimas comerciales por bacterias y hongos celulíticos (Passos et al., 2016a). Dentro de los parámetros que influyen en los resultados del pretratamiento se encuentran la dosis de enzima, la temperatura y el tiempo de exposición (Passos et al., 2016a; Passos et al., 2014)

2.13.5 Inhibidores

Un efecto no deseado después de aplicar un pretratamiento alcalino a la biomasa microalgal es la formación de inhibidores como pueden ser los productos de la reacción de Maillard, donde azúcares, aminoácidos y proteínas reaccionan para formar una amplia variedad de productos desde gases hasta melanoidinas insolubles en agua. Las reacciones de Maillard están sujetas a variables como pH, temperatura, presión, tiempo, actividad de agua y presencia de iones metálicos. En general estas reacciones son más rápidas a altas temperaturas y alto pH (Labuza et al., 1998). Por otro lado, durante la degradación anaerobia de biomasa microalgal se debe considerar que los altos niveles de nitrógeno y proteína encontrados en las microalgas pueden conducir a una liberación significativa de nitrógeno amoniacal durante la digestión. El nitrógeno amoniacal se produce a partir de la descomposición biológica de la materia nitrogenada, principalmente en forma de proteínas y urea. El equilibrio establecido entre el amoníaco no ionizado (NH_3) y el nitrógeno amoniacal (NH_4^+) se puede afectar por un cambio en el pH o la temperatura dentro del

digestor anaerobio. Un aumento de la temperatura o del pH puede ser muy perjudicial para la comunidad bacteriana cuando el equilibrio cambia a la forma más tóxica el amoníaco no ionizado NH_3 . El gas amoníaco (NH_3) dentro del digestor resulta ser un inhibidor a una concentración mucho menor (250-2600 mg/L) que la forma ionizada acuosa de nitrógeno amoniacal. Se ha demostrado que la toxicidad del amoníaco afecta a los microorganismos metanogénicos en dos formas: (1) el ion amonio puede inhibir directamente la enzima de síntesis de metano (Metil-Coenzima M reductasa), y (2) la molécula hidrofóbica de amoníaco (NH_3) puede difundirse pasivamente en la célula, causando desequilibrio de protones y/o deficiencia de potasio. Por otro lado, el nitrógeno amoniacal es tóxico a altas concentraciones y tiene un efecto moderadamente inhibidor entre 1500 y 3000 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, especialmente a valores altos de pH. Por encima de 3000 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ puede existir un fuerte efecto inhibidor a cualquier pH, que puede conducir a una caída en la producción de gas (Rajagopal et al., 2013;Ward et al., 2014).

2.14. Producción de biogás con microalgas

Dentro de los estudios en donde se usan microalgas como fuente de biomasa para la producción de biogás y a las cuales se les ha efectuado un pretratamiento químico destaca el trabajo realizado por Cho et al. (2013) en el cual utilizaron una mezcla *Chlorella* sp (70% peso seco del total del peso de la biomasa w/w) y *Scenedesmus* sp (30% peso seco del total del peso de la biomasa w/w) sometida a pH 9 ajustado con NaOH 5N donde se obtuvieron rendimientos de metano de 0.363 L $\text{CH}_4/\text{g SV}$, siendo este rendimiento uno de los más altos reportados para pretratamientos químicos alcalinos. En el mismo estudio también aplicaron pretratamientos térmico (120 °C, en autoclave) y ultrasónico (130 W por 180 s) en el cuál obtuvieron rendimientos de metano de 0.405 y 0.385 L $\text{CH}_4/\text{g SV}$, respectivamente. Por otra parte se han reportado rendimientos de metano de 0.398 L $\text{CH}_4/\text{g SV}$ al aplicar hidrólisis térmica a 9 bar a 170 °C a una mezcla de 40% *Chlamydomonas*, 20% *Scenedesmus* y 40% microalga desconocida tentativamente caracterizada como *Nannocloropsis* y de 0.382 L $\text{CH}_4/\text{g SV}$ al hidrolizar térmicamente la misma mezcla de microalgas a 9 bar a 140 °C (Alzate et al., 2012). Además Cortés-Carmona et al., (2018) indica que después de pretratar biomasa microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus* a 98°C por 6 h obtuvo un rendimiento de metano de 192.7 mL/g VS, equivalente a un aumento de

75% del rendimiento de metano obtenido con la biomasa microalgal sin pretratar con una relación Sustrato/Inóculo = 1.

Por otro lado los pretratamientos termoquímicos en este trabajo se eligieron porque con ellos se obtuvieron los mejores rendimientos de metano en estudios anteriores, al ser aplicados a *Scenedesmus* sp. o en su defecto se aplicaron a una especie perteneciente a las algas verdes (Tabla 2.5). Las temperaturas y tiempos de exposición para cada álcali estuvo basada en varios reportes previos. En el trabajo de Solé-Bundó et al. (2017) se reporta que después de evaluar diferentes concentraciones de álcali, temperaturas y tiempos de exposición, el mayor valor de DQO soluble se observó con el pretratamiento con 10% de CaO a 55 y 72 °C. En el estudio de (Mahdy et al., 2014) se encontró que la mayor solubilización de materia orgánica se observó a la concentración más alta utilizada de NaOH (5% p/p) a una temperatura de 50 °C por 24 h. En cuanto al uso de NaOH se reportó que al combinar NaOH con calor (120 °C, 20 min) la solubilización de carbohidratos aumentó 5 veces. (Mendez et al., 2013). En cuanto al tratamiento con PHA, las condiciones fueron tomadas de Martín et al. (2016) donde primeramente emplearon concentraciones de H₂O₂ de 1 a 7.5%, sin embargo algunos de sus ensayos con altas concentraciones de H₂O₂ involucraron reacciones severas, por lo que recomendaron usar concentraciones de H₂O₂ entre 1 y 2.5%.

Tabla 2.5. Grado de solubilización y producción de metano obtenidos con distintos pretratamientos.

Especie microalga	Pretratamiento	Grado solubilización (% DQO)	Producción de metano (L CH ₄ /gVS)	Metano (%)	Referencia
<i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp	Termoquímico 72 °C + 10% CaO, 24 h	25%	0.325	77.9	(Solé-Bundó et al.,2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Termoquímico. 120 °C, 20 min + NaOH 4M, pH 10	Aumento 5 veces (azúcares)	0.237 L CH ₄ /gDQO	68.8	(Mendez et al., 2013)
<i>C. vulgaris</i> y <i>Scenedesmus</i> sp.	Termoquímico. Scenedesmus 50 °C, 24 h, 5% NaOH (w/w)	16.80%	0.162 L CH ₄ /gDQO	-	(Mahdy et al., 2014)

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los biocombustibles de tercera generación, categoría a la cual pertenecen aquellos que provienen de biomasa microalgal, son sustratos idóneos para la producción de biocombustibles carbono neutrales ya que secuestran el CO₂ atmosférico o proveniente de la combustión. La integración del cultivo de microalgas y el proceso de digestión anaerobia brinda la oportunidad de obtener y purificar biogás mediante el uso de cultivos de microalgas que fijarán el CO₂ contenido en el biogás. De esta forma se logra aumentar el contenido de metano y eliminar otras impurezas como el sulfuro de hidrógeno para que el biogás sea apto para su uso en motores y celdas de combustión para la generación de electricidad. Además también se puede aprovechar el digestato, el subproducto formado durante la digestión anaerobia, que podría ayudar a cubrir los requerimientos nutricionales en el cultivo de microalgas, dado que contiene nitrógeno y fósforo. Aunque la digestión anaeróbica es un proceso biológico bien establecido, algunos sustratos orgánicos pueden presentar cuellos de botella. De las etapas involucradas en la digestión anaeróbica, la hidrólisis es la velocidad limitante en el caso de material orgánico particulado complejo. En el caso de las microalgas la pared celular es el obstáculo para su hidrólisis, de ahí la necesidad de aplicar un pretratamiento para liberar los compuestos orgánicos intracelulares susceptibles de ser convertidos en biocombustible.

HIPÓTESIS

Si se aplica un pretratamiento químico y térmico a la biomasa microalgal, se podrá aumentar la disponibilidad de ~~polímeros~~ sustratos orgánicos susceptibles utilizarse durante la digestión anaerobia.

Dado que la biodegradabilidad después de un pretratamiento químico y térmico aumenta, se espera que el rendimiento de metano sea mayor a partir de biomasa microalgal pretratada comparado con aquella sin pretratamiento.

Si se lleva a cabo la digestión anaerobia de la biomasa microalgal pretratada, bajo condiciones alcalinas, se espera generar biogás con un mayor contenido de metano ya que la solubilidad del CO₂ aumenta en dichas condiciones.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la factibilidad de utilizar biomasa microalgal pretratada como sustrato para la producción de biogás en condiciones alcalinas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Desarrollar un pretratamiento alcalino para biomasa microalgal que permita el acceso y la solubilización de los polímeros orgánicos presentes en las microalgas.

Determinar el potencial de producción de metano de los cultivos de *Scenedesmus obtusiusculus* con y sin pretratamiento, para conocer si el pretratamiento resulta adecuado para la producción de biogás.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microalga *Scenedesmus obtusiusculus*

La microalga que se utilizó es *Scenedesmus obtusiusculus* AT- UAM que fue aislada, identificada y caracterizada por el grupo de investigación de la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. La biomasa fue cosechada por floculación con quitosano (50 mg/L) y secada a 60°C. En este estudio se usaron dos lotes distintos de biomasa microalgal, identificados como Lote 1 y Lote 2. El Lote 1 se cultivó en fotobiorreactor de columna de burbujeo a temperatura ambiente (10-32 °C) y a un pH de 8.5, bajo régimen de luz solar, en suficiencia de nutrientes y con un flujo de alimentación de aire de 3 L/min, posteriormente la biomasa producida en las columnas de burbujeo fue utilizada para inocular estanques tipo raceway, donde únicamente se burbujeó aire pero no se determinó el flujo. El Lote 2 se cultivó bajo condiciones de crecimiento en medio completo en un fotobiorreactor de columna de burbujeo.

4.2. Lodo granular anaerobio

Se utilizó lodo granular anaerobio de un reactor UASB a nivel industrial que trata vinazas tequileras (Casa Herradura, Jalisco, México), con las siguientes características: 15.06% ST, 13.59% SV, así como una actividad metanogénica acetoclástica de 0.379 g DQO-CH₄/g SSV-d.

4.3. Medio de cultivo para las pruebas de biodegradabilidad anaerobia y para la determinación de la actividad metanogénica

El medio mineral con el que se llevaron a cabo las pruebas de potencial de producción de metano y la determinación de la actividad metanogénica del inóculo estaba compuesto por (g/L): K₂HPO₄, 0.250; NH₄Cl, 0.280; MgCl₂·6H₂O, 0.83; CaCl₂·2H₂O, 0.010; extracto de levadura, 0.1, y solución de elementos traza, 1 mL. La solución de elementos traza contenía (in g/L): EDTA, 1.0; FeCl₂·4H₂O, 2.0; MnCl₂·4H₂O, 0.5; H₃BO₃, 0.05; ZnCl₂, 0.05; NaMoO₄·2H₂O, 0.036; AlCl₃·6H₂O, 0.09; NiCl₃·6H₂O, 0.93; CoCl₂·6H₂O, 2; CuCl₂·2H₂O, 0.09; NaSeO₃·10H₂O, 0.227; HCl, 1 mL. Para ajustar el pH a las condiciones alcalinas (pH = 9) se adicionó bicarbonato de sodio (Montiel Corona & Razo-Flores, 2018).

4.4. Caracterización de la biomasa microalgal

La caracterización de la biomasa microalgal se llevó a cabo utilizando muestras de biomasa seca, los análisis se describen en las siguientes secciones.

4.4.1 Cuantificación de carbohidratos totales

La determinación requirió de 10 a 20 mg de biomasa seca que después fue sometida a una hidrólisis ácida en 5 mL de H₂SO₄ 1 M a 100 °C, en baño seco, en tubo Hach por 20 min, posteriormente la muestra se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. A partir del sobrenadante se realizó la determinación de carbohidratos totales por el método fenol-sulfúrico (DuBois et al., 1956).

4.4.2 Cuantificación de proteínas

La determinación requirió de 10 a 20 mg de biomasa seca que después fue sometida a una hidrólisis alcalina en 2 mL de NaOH 0.2 N a 100 °C por 20 min, en baño seco y en tubo Hach posteriormente la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. A partir del sobrenadante se realizó la cuantificación de proteínas utilizando el método de Lowry et al., (1956).

4.4.3 Cuantificación de lípidos neutros

La determinación requirió de 10 a 20 mg de biomasa seca que después fue sometida a una hidrólisis ácida en 2 mL de H₂SO₄ concentrado (98%) a 100 °C por 15 min, en baño seco y en tubo Hach. Posteriormente se realizó la cuantificación de lípidos neutros utilizando el método de sulfo-fosfovainillina (Mishra et al., 2014).

4.4.4 Cuantificación de DQO de la biomasa seca

La determinación requirió de 1 mg de biomasa seca, la cual se depositó en un tubo Hach, se agregaron 2 mL de agua destilada y posteriormente se continuó con el procedimiento para determinar la DQO.

4.5. Estrategia Experimental

El arreglo general del diseño experimental se muestra en la Tabla 4.1. En total se evaluó el efecto de dos distintos álcalis, NaOH y CaO, y el peróxido de hidrógeno alcalino (pH 11).

Las variables de respuesta fueron la eficiencia de solubilización de DQO, azúcares totales y proteínas y el rendimiento de producción de metano de la biomasa microalgal en

condiciones en lote. Se realizaron 3 réplicas por cada pretratamiento. También se consideró un control de biomasa microalgal sin pretratamiento. Los pretratamientos se describen en los apartados 4.6, 4.7 y 4.8

Tabla 4.1. Diseño experimental propuesto para determinar las mejores condiciones con las que se logra solubilizar materia orgánica de *Scenedesmus obtusiusculus*

Álcali y concentración	Temperatura (°C)	Tiempo
-	-	-
PHA 1.5% (p/v)	50	1.5 h
PHA 2.0% (p/v)	50	1.5 h
PHA 2.5% (p/v)	50	1.5 h
NaOH 2% (p/p)	50	24 h
NaOH 5% (p/p)	50	24 h
CaO 10% (p/p)	72	24 h
CaO 15% (p/p)	72	24 h
NaOH 4 M, pH 10	120	20 min

Al terminar los tiempos de exposición de las muestras, se llevó a cabo la caracterización de la biomasa pretratada, la cual, fue neutralizada y centrifugada a 4000 rpm por 10 min, posteriormente se tomó una muestra del sobrenadante. Al sobrenadante se le determinó el contenido de DQO, carbohidratos totales, proteínas y pH. Se procedió de la misma manera para todos los pretratamientos. La eficiencia de solubilización fue determinada por la Ecuación 4.1:

$$\% \text{ Solubilización} = (\text{DQOs} - \text{DQOso}) / \text{DQOt} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Donde

DQOs: DQO soluble después del pretratamiento.

DQOso: DQO soluble antes del pretratamiento

DQOt: DQO total (1 g/L).

4.6. Pretratamiento alcalino con NaOH

Se realizaron dos pretratamientos con NaOH, ver Tabla 4.1

El pretratamiento suave con NaOH se llevó a cabo en botellas serológicas de 60 mL donde se depositó biomasa microalgal seca en una concentración de 4 g ST/L en 50 mL de agua

destilada, y se añadieron 0.5 y 1.3 mL de NaOH 0.2 N a la solución de biomasa microalgal para obtener 0.02 y 0.05 g NaOH/g microalga, equivalente a 2% y 5% (p/p), respectivamente. Posteriormente las botellas fueron cerradas con tapones de caucho y selladas con anillos de alumnio, después fueron sometidas a 50°C por 24 h en una estufa (Mahdy et al., 2014).

El otro pretratamiento con NaOH se llevó a cabo en botellas serológicas de 60 mL donde se depositó biomasa microalgal seca en una concentración de 4 g ST/L en 50 mL de agua destilada, después se ajustó el pH de la solución de biomasa microalgal con el volumen necesario de NaOH 4 M hasta alcanzar pH 10. Posteriormente las botellas fueron cerradas con tapones de caucho y sellados con anillos de alumnio, para después ser sometidas a 120°C (autoclave) por 20 min (Mendez et al., 2013).

Al concluir el pretratamiento las muestras, éstas se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se midió el pH y a continuación, las soluciones cuidadosamente mezcladas se centrifugaron a 5200 rpm durante 5 min. Finalmente, la fase líquida se neutralizó y se separó de la parte sólida, los análisis de DQO, carbohidratos totales y proteínas se realizaron únicamente para la fracción soluble (Bohutskyi et al., 2014; Cho et al., 2013; Passos et al., 2016b).

4.7. Pretratamiento alcalino con CaO

La biomasa microalgal seca se depositó en botellas serológicas de 60 mL para tener una concentración de 4 g ST/L en 50 mL de agua destilada, y se añadió 0.1 y 0.15 g CaO/g microalga, para tener porcentajes de 10% y 15% (p/p). Posteriormente las botellas fueron cerradas con tapones de caucho y sellados con anillos de alumnio, después fueron sometidas a 72°C a presión atmosférica por 24 h min en una estufa. Las muestras se mezclaron cuidadosamente y se midió el pH en la solución. A continuación, las disoluciones cuidadosamente mezcladas se transfirieron a tubos de centrifuga. Todas las muestras se centrifugaron a 5200 rpm por 5 min, y a continuación se neutralizaron (pH = 7.0) y se separó la fase líquida para el análisis de la DQO, carbohidratos totales y proteínas (Bohutskyi et al., 2014; Cho et al., 2013; Solé-Bundó, Carrère, Garfí, & Ferrer, 2017).

4.8. Pretratamiento alcalino con Peróxido de Hidrógeno Alcalino

Las diferentes soluciones de peróxido de hidrógeno de 1.5, 2, y 2.5% se prepararon en agua desionizada a partir de una solución comercial de peróxido de hidrógeno 30%.

Tomando en cuenta que se necesitan 82.5 mL de peróxido de hidrógeno 30% para preparar 1 L de peróxido de hidrógeno 2.5%. Posteriormente el pH se ajustó a 11.5 con NaOH 5 M para cada solución. Para realizar el pretratamiento con PHA en vasos de precipitados de 50 mL se depositaron 0.2 g biomasa microalgal seca y se adicionaron 10 mL de peróxido de hidrógeno alcalino a la concentración deseada (1.5, 2.0 ó 2.5%) y obtener un porcentaje de 2% (peso biomasa seca/volumen PHA). Los vasos permanecieron abiertos.

Las muestras se mezclaron cuidadosamente y se incubaron a 50°C a 120 rpm por 1.5 h. A continuación, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se transfirieron a tubos de centrífuga. Todas las muestras se centrifugaron a 5200 rpm por 5 min, y a continuación se separó la fase líquida para el análisis de DQO, carbohidratos totales y proteínas (Martín et al., 2016).

4.9. Aclimatación de lodo granular a pH alcalino

La aclimatación del lodo granular a condiciones alcalinas se realizó utilizando un reactor UASB de 1.25 L, inoculado con 20 g SV/L de lodo anaerobio (sección 4.2) a temperatura ambiente, con un TRH de 27 h, en medio mineral (sección 4.3) y como sustrato acetato (90%) y glucosa (10%) en aumentos graduales de concentración de 1 hasta 4 g DQO/L. Se aplicaron aumentos de pH graduales, iniciando con pH 7 hasta llegar a pH 9, como se muestra en la **Tabla 4.2**. Una vez aclimatado a las condiciones alcalinas, este lodo se usó como inóculo para las pruebas de potencial de metano.

Tabla 4.2. Aclimatación de lodo granular anaerobio

pH	15 d	pH	15	pH	15 d	pH	15 d	pH
7.0	→	7.5	→	8.0	→	8.5	→	9.0

4.10. Cuantificación de la actividad metanogénica acetoclástica del lodo a pH alcalino

El ensayo se llevó a cabo en botellas serológicas de 60 mL, en un volumen de trabajo de 30 mL y un espacio de cabeza de 30 mL. La relación de sustrato a inóculo (S/I) fue de 1 g DQO de acetato/2 g SV de inóculo. El medio mineral que fue utilizado se describió anteriormente (sección 4.3). Se realizó un intercambio de atmósfera mediante el burbujeo de N₂ en las botellas durante 45 segundos. La temperatura se mantuvo a 37 °C y el pH

inicial fue de 9. Se usó un control endógeno para cuantificar la cantidad de metano que produce el inóculo. La producción neta de biogás fue calculada al restar el resultado del blanco a cada ensayo.

4.11. Potencial bioquímico de metano

Los potenciales de metano de la biomasa microalgal sin y con pretratamiento fueron evaluados a través de ensayos en lote en botellas serológicas de 60 mL, con un volumen de trabajo de 30 mL y un espacio de cabeza de 30 mL. Cada botella contenía una concentración de 2 g SV/L de lodo granular (previamente aclimatado a la condición alcalina, pH 9), 30 mL de medio de cultivo anaerobio y 2 g SV/L de biomasa microalgal pretratada o sin pretratar. La relación de sustrato a inóculo (S/I) es de 1 g SV de sustrato/g SV de inóculo. Se realizó un intercambio de atmósfera mediante el burbujeo con N₂ durante 45 segundos. La temperatura se mantuvo a 37 °C y el pH inicial fue de 9, las botellas permanecieron en agitación a 120 rpm. Se usó un control endógeno para cuantificar la cantidad de metano que produjo el inóculo. La producción neta de biogás fue calculada al restar el resultado del blanco a cada ensayo.

Se evaluó el potencial de metano de los siguientes pretatamientos: NaOH 2%, PHA 1.5 % y CaO 10% y NaOH 4M. Los ensayos se efectuaron por triplicado para cada uno de los pretatamientos. Cada día se llevó a cabo la cuantificación del porcentaje de metano en el biogás por cromatografía de gases, así como el volumen total de biogás producido. A partir de estos datos se dio seguimiento a la producción acumulativa de metano con respecto al tiempo, el ensayo se detuvo una vez que la producción acumulativa de metano fue constante.

Los perfiles de producción de metano se ajustaron al modelo modificado de Gompertz presentado en la siguiente ecuación 4.2:

$$H(t) = H_{\max} * \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

donde:

H(t): Producción acumulada de CH₄ en el tiempo t (mL/g SV microalga alimentada).

H_{max}: Producción máxima acumulada de CH₄ (mL/g SV microalga alimentada).

R: Velocidad de producción de CH₄ o biomasa (mL/g SV microalga alimentada *d).

λ: Tiempo de retardo (d).

El rendimiento teórico de producción de metano de la biomasa microalgal fue calculado a partir del contenido de DQO y de SV por gramo de microalga con la Ecuación 4.3.

$$\text{mL CH}_4/\text{g SV} = (\text{g DQO}/\text{g microalga})/(\text{g SV}/\text{g microalga}) * 350 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}$$

(Ecuación 4.3)

Donde el valor de 350 es el volumen teórico de metano en mililitros que se obtienen por 1 g DQO.

4.12. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre las eficiencias de solubilización después de cada pretratamiento, así como las diferencias entre los parámetros de Gompertz obtenidos para cada pretratamiento se determinaron mediante la prueba de ANOVA y Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a valores de p menores a 0.05. También se efectuaron regresiones lineales para encontrar la correlación entre la solubilización de polímeros orgánicos y el rendimiento de metano. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software R versión 3.3.2.

4.13. Métodos analíticos

La producción de biogás se determinó mediante un dispositivo de registro de gas por desplazamiento de líquido, que consiste en un tubo en forma de U, calibrado a 5 mL con un detector de líquido que permite el conteo del gas producido (SEV, México). La concentración de metano se cuantificó utilizando un cromatógrafo de gases equipado con un detector de conductividad térmica (GC, 6890N Network GC System, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) usando nitrógeno como gas acarreador, con una temperatura del puerto de inyección, horno y detector de 250 °C, 60 °C y 250 °C, respectivamente. Todas las mediciones de gas fueron normalizadas a condiciones estándar (273.15 K y 1 atm). Se determinaron también las concentraciones de DQO soluble (DQOs), DQO total (DQOt), sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) por métodos estándar (A.P.H.A, 2005). Las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) se determinaron mediante un equipo de electroforesis capilar (Agilent 1600A, Waldbronn, Germany) con

un búfer básico de aniones (Agilent, pH 12.1) y una columna capilar de sílica (Agilent, id = 50 mm, L = 80.5 cm, longitud efectiva = 72 cm). La temperatura y el voltaje fueron 20°C and -30 kV, respectivamente. Las muestras fueron inyectadas a una presión de 300 mbar por 6 s. La concentración de azúcares totales se cuantificó por el método fenol-sulfúrico (DuBois), los lípidos por el método de la vainillina (Mishra et al., 2014) y el pH se midió con potenciómetro. El análisis elemental de C y N se llevó a cabo por combustión seca y cromatografía de gases en un analizador CHNS (ECS 4010 CHNSO ANALYZER COSTECH). Los dos reactores están empacados según las especificaciones del equipo para la determinación de C y N. Primer reactor: óxido de cromo y óxido cobaltoso/plata. Segundo reactor: Cobre reducido. Columna cromatográfica: Columna empacada para N₂, CO₂, H₂O. Se utilizó He como gas acarreador. Temperatura reactor 1: 1100°C. Temperatura reactor 2: 600°C. Temperatura columna: 60°C.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de la biomasa microalgal

La composición de la biomasa microalgal *Scenedesmus obtusiusculus* se muestra en la Tabla 5.1

Tabla 5.1. Composición bioquímica de la biomasa microalgal *Scenedesmus obtusiusculus*

Parámetro	Lote 1	Lote 2
Carbono (%)	30.41	46.13
Nitrógeno (%)	3.50	6.19
Sólidos Totales (%)	93.48	94.29
Sólidos volátiles (%)	57.63	90.88
Cenizas (%)	38.25	3.42
DQO (g/g microalga)	0.74	1.17
Carbohidratos (%)	19.87	27.64
Proteínas (%)	21.65	42.65
Lípidos (%)	12.61	20.27
C/N	8.6	7.4

El análisis de la composición bioquímica de la biomasa microalgal de dos lotes diferentes de la especie *Scenedesmus obtusiusculus* muestra que existen discrepancias en la misma especie cuando estas crecen en condiciones ambientales distintas. Además se observó que el contenido de proteína de *S. obtusiusculus* fue menor a lo que se ha reportado (Dragone et al., 2010) para *Scenedesmus obliquus* (50-56%), sin embargo se encuentra entre lo reportado para *Scenedesmus quadricauda* (47%) y *Scenedesmus dimorphus* (8-18%). En cuanto a carbohidratos los valores obtenidos se encuentran dentro de los intervalos encontrados para *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus dimorphus* (10-17% y 21-52% respectivamente). Para lípidos los valores obtenidos son similares a los reportados pues varían de 12% a 14% para *Scenedesmus obliquus* y menores para lo reportado para *Scenedesmus dimorphus* (16 a 40%) (Dragone et al., 2010). Las diferencias podrían deberse a qué se trata de otras especies y también a los factores ambientales de crecimiento, especialmente luz, temperatura, nutrientes y salinidad, que afectan la fotosíntesis y la productividad, ya que tienen la capacidad de influenciar las rutas del metabolismo celular y por lo tanto la composición bioquímica (Richmond, 2004). En cuanto al contenido de nitrógeno, lo obtenido para el Lote 1 y Lote 2 de biomasa microalgal (3.5 y 6.19%) no se

encuentra dentro los valores reportados, ya que generalmente el contenido de nitrógeno en la biomasa microalgal es de 7-10% ya que es un constituyente celular esencial de todas las estructuras y funciones de las proteínas en células microalgales (Richmond, 2004). Respecto a la relación C/N esta varía entre 4.16 a 7.82, en especies de microalgas estudiadas para digestión anaerobia, lo cual concuerda con las relaciones obtenidas en estudio para *Scenedesmus obtusiusculus* (8.6 y 7.4). La relación óptima C/N para el proceso de digestión es entre 20:1 y 25:1, ya que una relación C/N debajo de 20 implica un desequilibrio entre los requerimientos de carbono y nitrógeno para la comunidad anaerobia, que conduce a la liberación de nitrógeno en forma de amonio durante la digestión, el cual puede inhibir a los microorganismos metanogénicos (Ward et al., 2014).

5.2. Aclimatación de lodo granular a pH alcalino

Ya que los pretratamientos que se realizaron a la biomasa microalgal fueron en condiciones alcalinas, se decidió realizar los ensayos de potencial de producción de metano también a tales condiciones (pH 9). De esta forma se evitó el uso excesivo de ácido para neutralizar la biomasa microalgal pretratada hasta un pH de 7.0. Con el propósito de tener un inóculo de lodo granular aclimatado a condiciones alcalinas se operó un reactor UASB bajo las siguientes condiciones: TRH de 27.2 h, con un flujo 46.2 mL/h, y pH de 9. El aumento de pH se realizó de manera gradual cada 15 días comenzando con un pH de 7, siguiendo con pH 7.5 y 8. Cuando el pH de alimentación del reactor se ajustó a 8 se alcanzó un pH en el efluente de 9, esto debido a la solubilización del CO₂ proveniente del proceso de digestión anaerobia. Por lo que ya no se incrementó más el pH de alimentación del reactor. Durante el desempeño del reactor las velocidades de producción volumétrica de metano que se obtuvieron fueron de 218.9, 410.8, 539.6 y 464.1 mL CH₄/L·d, cuando fue alimentado con 1, 2, 3 y 4 g DQO/L, respectivamente. El sustrato con el que se alimentó el reactor estaba compuesto por una mezcla de 90% acetato y 10% glucosa. Antes de alcanzar el pH objetivo de 9, el reactor se operó por un período de 60 días en el que el pH de alimentación se fue incrementando gradualmente. Una vez que se alcanzó el pH de 9, el reactor se operó por 300 días; en el día 150 se retiró una porción de lodo para llevar a cabo los ensayos de potencial de metano. Durante la operación del reactor la remoción de DQO fue de 88 a 91% (Fig 5.1). La disminución de la eficiencia en el desempeño del reactor es comparable con lo que observaron Sandberg & Ahring (1992), al aclimatar un lodo granular anaerobio a

condiciones alcalinas en un reactor UASB, alimentado con una mezcla de ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato valerato, isohexanato), y trimetilaminas (trimetilamina, dimetilamina y monometilamina), a una carga orgánica de 16 g DQO/L*d. Los autores reportaron eficiencias de remoción de sustrato entre 92-97% a un pH de 7.3-7.9; sin embargo la eficiencia disminuyó hasta 79% al aumentar el pH arriba de 7.9. Entre pH 7.7 y 7.9 el consumo de acetato disminuyó gradualmente conforme el pH aumentaba y a pH de 8.3 el consumo de acetato era de aproximadamente 93%. En este trabajo, se observó que a un pH de 9 y al aumentar la carga volumétrica de 2.8 a 3.5 g DQO/L*d el porcentaje de remoción de DQO disminuyó de 99 a 92%. Sandberg & Ahring (1992) observaron que el acetato era el único compuesto que se acumulaba al aumentar el pH, lo que podría indicar que las bacterias fermentativas y, especialmente, las bacterias acetogénicas obligadas productoras de hidrógeno en los gránulos tienen un pH óptimo más alto o una mejor capacidad para la adaptación del pH que las metanogénicas acetoclásticas. En cuanto al porcentaje de metano este varió de 67 – 92%, dado que en el sistema el buffer que se encuentra presente es el del bicarbonato, y sabiendo que existe un aumento en el CO₂ debido a la producción de biogás, se debe considerar que una vez disuelto el CO₂, este puede existir en 3 formas de equilibrio: CO₂ acuoso/ácido carbónico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻) o carbonato (CO₃⁻²) dependiendo del pH. A pH entre 6 y 10 la forma predominante es el bicarbonato, presentando un máximo a pH 8.3, es decir al pH de operación 9, el CO₂ proveniente de la digestión anaerobia muy probablemente se encontraba disuelto y permaneció en el líquido como bicarbonato, lo que ayudó a alcanzar el pH de 9. De esta forma fue posible obtener biogás con un contenido de CH₄ de hasta 92%, mayor a lo reportado en condiciones neutrofílicas (40-75%) (Abbasi et al., 2012).

Antes de ser sometido al proceso de aclimatación a pH alcalino, el lodo granular presentó las siguientes características: 15.06% ST, 13.59% SV, así como una actividad metanogénica acetoclástica de 0.379 g DQO-CH₄/g SSV-d, después de la aclimatación sus características fueron las siguientes: 12.44% ST, 11.07% SV, así como una actividad metanogénica acetoclástica de 0.1 g DQO-CH₄/g SSV-d. En este caso no se efectuaron mediciones de la densidad del lodo, sin embargo fue evidente que ésta disminuyó puesto que una parte del lodo granular flotaba en el reactor. Estas observaciones son consistentes con reportes previos en donde también se observaron cambios en las características del lodo

granular cuando estos se aclimataban a condiciones alcalinas (Sandberg & Ahring 1992). En dicho reporte, el contenido de ST y SV disminuyó 50%, los autores también reportaron una disminución del diámetro y densidad de los gránulos, debida a la desintegración de los gránulos al aumentar el pH. Los autores recomiendan realizar el aumento de pH de forma gradual para lograr la aclimatación de los gránulos. En nuestro caso no se observó la desintegración de los gránulos ya que la aclimatación al pH alcalino se llevó a cabo gradualmente.

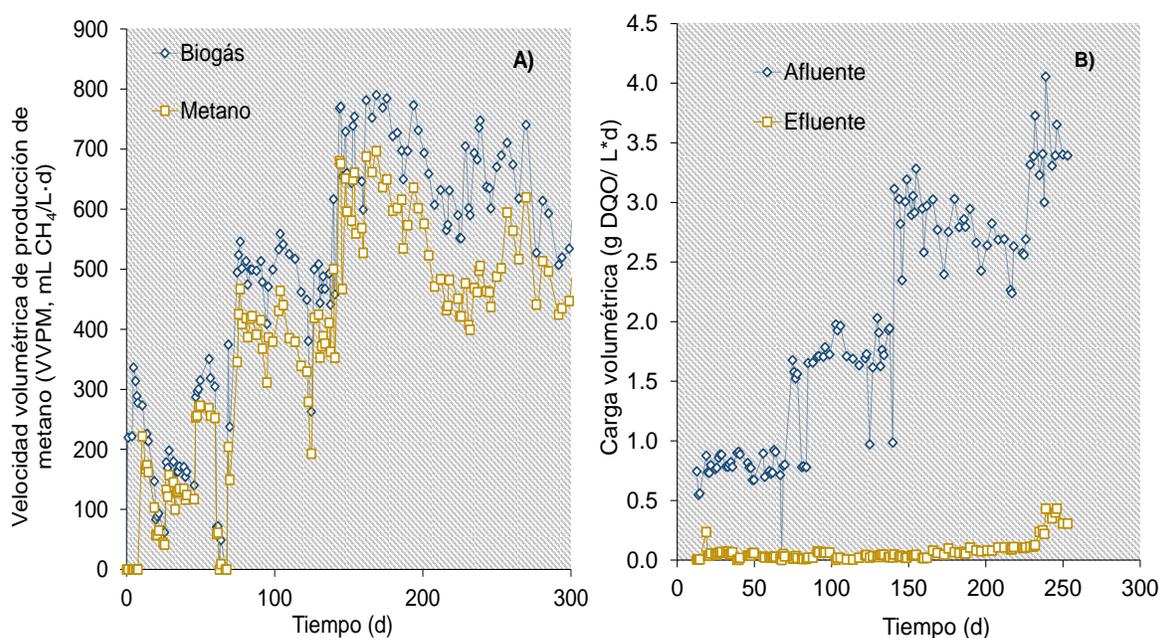


Figura 5.1 Desempeño del reactor UASB. A) Velocidad volumétrica de producción de metano. B) Carga orgánica volumétrica

En cuanto a la actividad metanogénica acetoclástica del lodo granular esta disminuyó de 0.379 a 0.1 g DQO-CH₄/ g SV *d, lo cual representa una disminución de 70%. Probablemente, la disminución se podría explicar porque las bacterias sintróficas oxidadoras de acetato son más tolerantes a altos niveles de pH que las metanogénicas acetoclásticas. A altos niveles de pH ambientales las células necesitan mantener un pH intracelular adecuado a través de la regulación activo al coste de energía, por tanto la energía de mantenimiento aumenta con el grado de desviación del pH ambiental del óptimo bioquímico (Hao et al., 2013). Un efecto secundario es que un alto pH conduce a la

desprotonación del ácido acético y el ácido carbónico, y las formas iónicas del sustrato no pueden difundir a través de la membrana, por lo que requiere mayor energía para compensar. La dificultad del consumo de sustrato también limita la metanogénesis en ambientes alcalinos (Hao et al., 2013), es importante mencionar que este efecto podría afectar de manera negativa, ya que el ácido acético es el intermediario clave en el flujo de carbono anaerobio, ya que liga diferentes etapas y es considerado como el principal precursor para la producción de metano durante la digestión anaerobia de desechos orgánicos (Hao et al., 2013). En el caso de la digestión anaerobia de biomasa microalgal no fue posible alcanzar el nivel teórico de producción de metano como se menciona en el apartado 5.4 y sabiendo que la pared celular es el principal obstáculo para su hidrólisis, se debe considerar que al realizar la digestión anaerobia en condiciones alcalinas existe una disminución en el consumo de sustratos fácilmente degradables, como la glucosa. En este trabajo se determinó también el potencial de producción de metano con glucosa a pH 9 en donde se obtuvo un 33.3% menos del volumen teórico esperado de metano, y un porcentaje de metano de 99%, es decir, aunque existe una disminución en la actividad metanogénica del lodo en condiciones alcalinas, esta podría ser compensada por el porcentaje de metano presente en el biogás.

5.3.1 Solubilización de materia orgánica

Los pretratamientos termoquímicos evaluados fueron PHA 1.5, 2 y 2.5% (p/v), incubados a 50 °C durante 1.5 h; NaOH 2 y 5% (p/p) a 50 °C durante 24 h, CaO 10 y 15% (p/p) a 72 °C durante 24 h y NaOH 4 M, 120 °C por 20 min. Para determinar la efectividad de los pretratamientos se analizó la DQO soluble a la biomasa microalgal después del pretratamiento. La comparación entre la DQO soluble y la DQO soluble antes del pretratamiento y después del pretratamiento permite estimar cual fue el efecto del pretratamiento sobre la desintegración o solubilización de la materia orgánica de la biomasa.

Como se observa en la Fig. 5.2 con ambos lotes de biomasa se logró el aumento en la solubilización de materia orgánica (DQO soluble) bajo todas las condiciones de los pretratamientos evaluados, con porcentajes de solubilización entre 3.05 y 26.44%. Los porcentajes de solubilización de DQO más altos fueron observados con el pretratamiento termoquímico con CaO 15% a 72 °C por 24 h, donde se obtuvieron porcentajes de

solubilización de 19.54 ± 2.5 y $26.44 \pm 3.28\%$, para el Lote 1 y para el Lote 2 respectivamente. Mientras Solé-Bundó et al. (2017) al utilizar CaO 10% a 55 y 72°C reporta eficiencias de solubilización de DQO de 20 y 25%, respectivamente. El menor porcentaje para el Lote 1 se obtuvo con el pretratamiento de NaOH 4 M (pH 10) a 120 °C por 20 min (7.8%) y para el Lote 2 fue con el pretratamiento de PHA 1.5% a 50°C por 1.5 h (7.8 y 3.05%, respectivamente), comparable al 5.4 y 5% obtenido por Cho et al. (2013) al pretratar una mezcla de 70% de *Chlorella* sp y 30% de *Scenedesmus* sp. con NaOH 5 N a pH de 9 y 11 sin aplicar calor. En el presente trabajo de tesis se obtuvo un aumento del 10.5

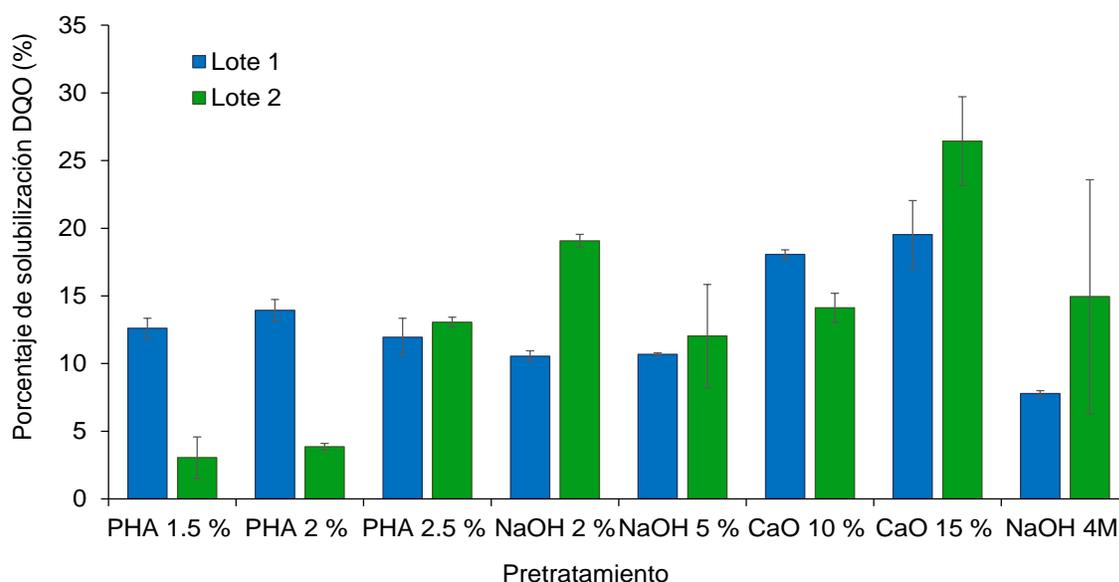


Figura 5.2 Eficiencia de solubilización de DQO de cada uno de los lotes de biomasa microalgal y con cada uno de los pretratamientos aplicados

a 19% de DQO soluble después de aplicar el pretratamiento con NaOH 2 y 5% a 50 °C por 24 horas en comparación con la DQO soluble de la microalga sin pretratar (Fig. 5.2), similares a los obtenidos por Mahdy et al. (2014) que reportan porcentajes de solubilización de DQO de 5.1 y 16.8% después de aplicar un pretratamiento de biomasa microalgal *Scenedesmus* sp. con dosis de NaOH 2 y 5% (p/p) a una temperatura de 50°C por 24 horas. En otros estudios con microalgas verdes Bohutskyi et al. (2014) lograron una solubilización de DQO de 81% al pretratar *Chlorella* sp. con NaOH 50%, aplicando calor (120°, 30 min). Por su parte Passos et al. (2016b) evaluaron la solubilización de la materia orgánica en términos de carbono orgánico total (COT), y reportan que la solubilización de COT más alta lograda fue al usar KOH 0.5, 1.25 y 2%, 80°C, 2h (aumentos de 19.4-21.8 veces) en

microalgas presentes en una laguna de estabilización en una planta de tratamiento de agua (*Chlorella sp.* y *Monoraphidium sp.*).

Al comparar estadísticamente los pretratamientos (Figura 5.3) aplicados al Lote 1, se encontró que existen diferencias significativas entre la DQO soluble después de aplicar los pretratamientos y la DQO soluble de la microalga sin pretratar. En el caso del Lote 2 se encontraron diferencias significativas entre la DQO soluble de la microalga sin pretratar y después de aplicar los pretratamientos de NaOH 2% a 50°C por 24 h y CaO 15%, a 72°C por 24 h.

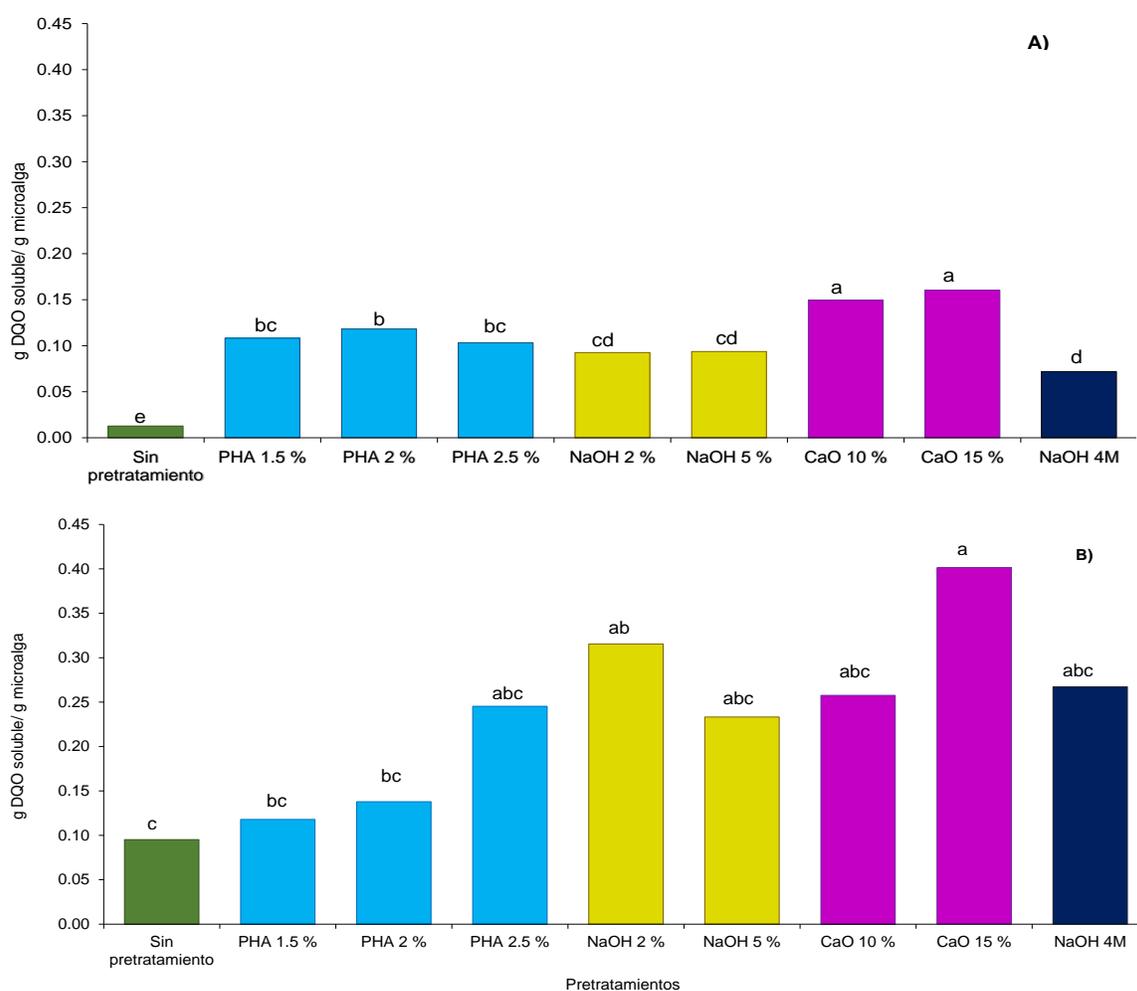


Figura 5.3 Diferencias significativas entre cantidad de DQO soluble obtenida después de los diferentes pretratamientos por gramo de peso seco de microalga alimentada para Lote 1 A) y Lote 2 B). Prueba de Tukey. Realizado con R 3.3.2. Las letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$)

El hecho de que los porcentajes de solubilización de materia orgánica sean bajos se relaciona con la alta resistencia a la degradación que presenta la pared celular de *Scenedesmus obtusiusculus*, como ya se ha reportado anteriormente (González-Fernández et al., 2012b). Además la aplicación de un pretratamiento termoalcalino puede tener los siguientes efectos en la pared celular de la microalga: induce al hinchamiento de la celulosa, aumento del área superficial interna y reducción del grado de cristalinidad y polimerización. La hidrólisis puede ocurrir a través de una variedad de reacciones incluyendo ruptura de los enlaces H y saponificación de enlaces ésteres intermoleculares en la celulosa y hemicelulosa y entrecruzamiento de la hemicelulosa con otros componentes poliméricos (Bohutskyi et al., 2014).

5.3.2 Solubilización de carbohidratos y proteínas

Otro parámetro que se usó para evaluar la eficiencia del pretratamiento fue la solubilización de carbohidratos y proteínas, por ser parte de las principales moléculas que conforman las células microalgales (Fig. 5.4)

Con respecto a la solubilización de carbohidratos en el Lote 1, se favoreció en mayor medida al aplicar el pretratamiento con CaO 10 y 15%, con porcentajes de solubilización de 60.61 y 58.69%, respectivamente. Mientras que para el Lote 2 los porcentajes de solubilización de carbohidratos más altos, alrededor de 22%, se obtuvieron al aplicar los pretratamientos de CaO 15% y el de PHA 2.5%. Lo anterior se encuentra en línea con el estudio de Solé-Bundó et al. (2017), donde obtuvieron porcentajes de solubilización de 31% con CaO al 10% a 72°C después de pretratar una mezcla de microalgas (*Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp.). En ambos lotes la menor eficiencia de solubilización de carbohidratos se obtuvo al aplicar los pretratamientos de NaOH 2 y 5%, a 50°C por 24 h, con valores de 3.6 a 7.8% (Fig. 5.4). Mientras Mahdy et al. (2014) obtuvieron un aumento en la solubilización de carbohidratos de 26.4 y 40.4% al pretratar biomasa microalgal *Scenedesmus* sp. en las mismas condiciones de incubación y concentración de NaOH. Así mismo Mendez et al. (2013) reportan el aumento en carbohidratos solubles (5 veces) después de aplicar un pretratamiento de NaOH 4M, 120°C por 20 min a biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris*, valor mayor al obtenido en este trabajo donde el aumento de carbohidratos solubles después de aplicar el mismo pretratamiento fue de 2 veces para ambos lotes de biomasa microalgal Fig. 5.7.

Al comparar los carbohidratos solubles de la biomasa microalgal del Lote 1 sin pretratar se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a todos los pretratamientos excepto cuando se usó NaOH 2 y 5%. Para el mismo lote no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los pretratamientos con CaO 10 y 15%, así como entre PHA 2 y 2.5% y entre PHA 1.5% y NaOH 4 M (Tabla 5.2). Los carbohidratos solubles de la biomasa microalgal del Lote 2 presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) después de aplicar todos los pretratamientos, excepto con NaOH 2%.

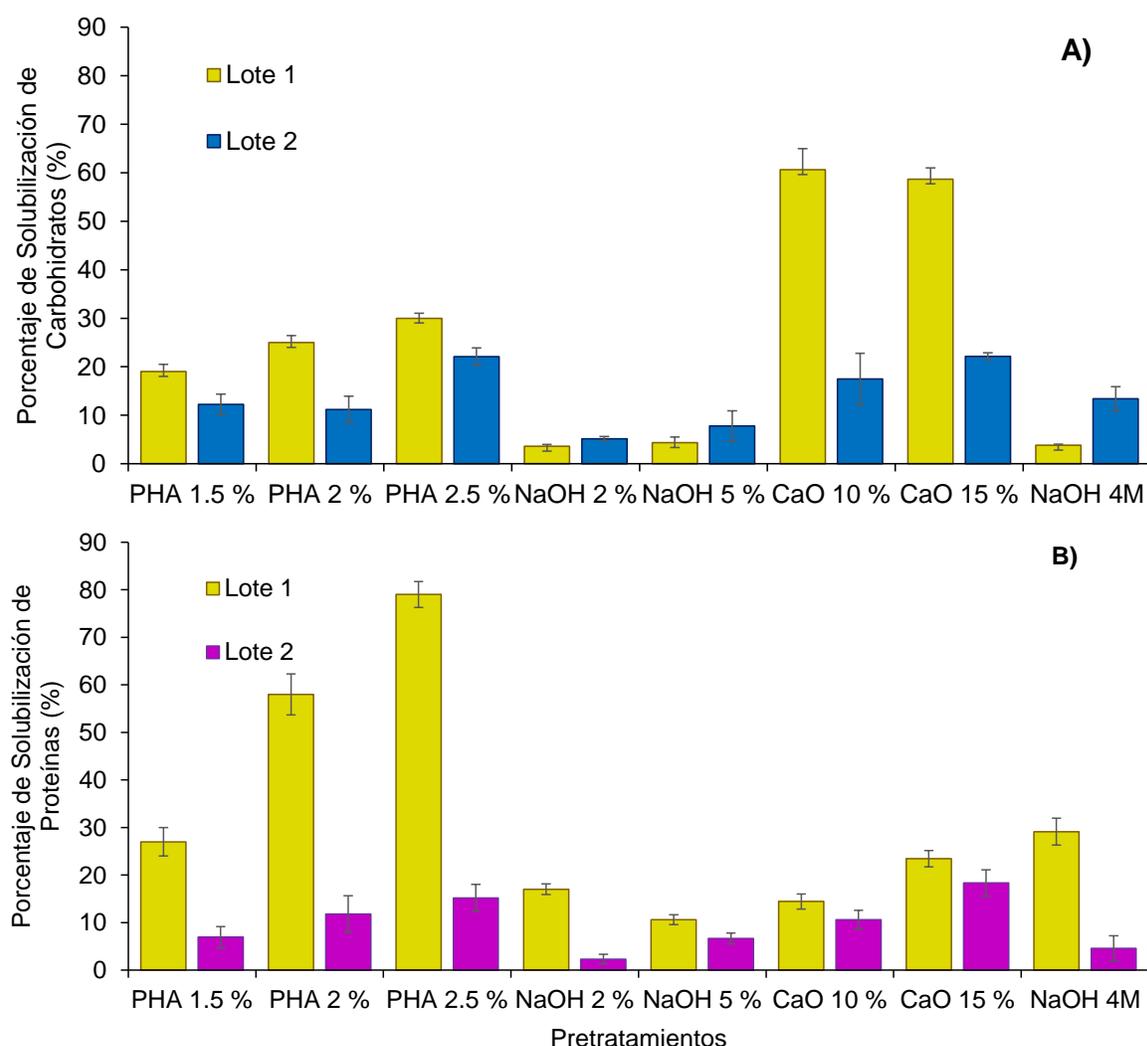


Figura 5.4 Eficiencias de solubilización después de aplicar diferentes pretratamientos termoalcalinos a dos distintos lotes de biomasa microalgal. A) Solubilización de carbohidratos; B) Solubilización de proteínas.

Entre pretratamientos para el Lote 2 no existieron diferencias significativas entre el pretratamiento con PHA 2.5% y CaO 15%, sucediendo lo mismo entre los pretratamientos

NaOH 4M y PHA 1.5 5, así como entre CaO 10%, PHA 2%, NaOH 2 y 5%, tal como se muestra en la Tabla 5.2 Algunos otros autores han reportado que los principales carbohidratos solubilizados después de pretratar microalgas presentes en una laguna de estabilización en una planta de tratamiento de agua (*Chlorella* sp. y *Monoraphidium* sp.) fueron glucosa y ácido galacturónico después de aplicar un pretratamiento termoalcalino KOH 0.5, 1.25 y 2% a 80°C por 2 h (Passos et al., 2016b), indicando que el pretratamiento es más efectivo solubilizando pectinas, mientras que un pretratamiento ácido HCL 0.5, 1.25 y 2% a 80°C, 2 h solubiliza glucosa, arabinosa y xilosa, por lo que el tratamiento ácido fue más efectivo solubilizando hemicelulosa. La comparación que estos autores realizaron entre los pretratamientos ácidos y alcalinos muestran que la hidrólisis alcalina escindió los enlaces intermoleculares entre polisacáridos complejos y fibras y otros compuestos poliméricos, pero solo la hidrólisis ácida pudo descomponer carbohidratos complejos en azúcares simples (Solé-Bundó et al., 2017).

Tabla 5.2. Diferencias significativas entre cantidad de carbohidratos solubles obtenidos después de los diferentes pretratamientos por gramo de peso seco de microalga para Lote 1 y Lote 2. Prueba de Tukey realizada con R3.3.2. Las letras iguales indican aquellos pretratamientos entre los que no existen diferencias significativas, mientras que letras diferentes indica que existen diferencias significativas.

Pretratamiento	g Carbohidratos/g microalga (peso seco)			
	Lote 1		Lote 2	
Sin pretratamiento	0.01 ± 0.01	d	0.02 ± 0.00	d
PHA 1.5%	0.02 ± 0.00	c	0.05 ± 0.00	b
PHA 2%	0.04 ± 0.00	b	0.05 ± 0.01	bc
PHA 2.5%	0.06 ± 0.00	b	0.08 ± 0.00	a
NaOH 2%	0.01 ± 0.00	d	0.04 ± 0.00	cd
NaOH 5 %	0.01 ± 0.00	d	0.04 ± 0.01	bc
CaO 10%	0.01 ± 0.00	a	0.05 ± 0.01	bc
CaO 15%	0.02 ± 0.00	a	0.08 ± 0.01	a
NaOH 4M	0.02 ± 0.00	c	0.06 ± 0.01	b

Como se muestra en la Fig 5.4 los mayores cambios en la solubilización de proteínas después de pretratar la biomasa microalgal del Lote 1 correspondieron a los pretratamientos con PHA 2 y 2.5% con eficiencias de solubilización de 58 y 79% respectivamente, mientras que para la biomasa del Lote 2 fue con PHA 2.5% y CaO 15% con porcentajes de

solubilización de 15.2 y 18.33%, respectivamente, valor que se encuentra por debajo de lo reportado por Solé-Bundó et al. (2017) donde evaluaron la solubilización de proteínas en términos de nitrógeno total Kjeldahl (TKN) y reportan un porcentaje de solubilización de TKN de 32% en las mismas condiciones de temperatura y concentración de CaO. De igual manera Passos et al. (2016b) después de aplicar un pretratamiento termoalcalino KOH 0.5, 1.25 y 2% a 80°C por 2 h a una mezcla microalgal (*Chlorella* sp. *Monoraphidium* sp.) observaron un aumento de 10 a 12 veces de nitrógeno total soluble.

Después de pretratar *Scenedesmus obtusiusculus* con NaOH 4M, 120°C por 20 min en este trabajo se obtuvo un aumento de 1.2 y 1.4 en proteína soluble para el Lote 1 y el Lote 2, respectivamente, menor a lo reportado por Mendez et al. (2013), es decir, un aumento de proteínas soluble de 1.9 veces después del mismo pretratamiento con *Chlorella vulgaris*.

Respecto a la cantidad de proteína soluble por gramo de biomasa microalgal sin pretratar del Lote 1 ésta mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) solo después de aplicar los pretratamientos de PHA 2 y 2.5%, NaOH 5%. Para el mismo Lote y entre pretratamientos las diferencias significativas ($p < 0.05$) se observaron entre PHA 2 y 2.5% con el resto de los pretratamientos (Tabla 5.3). Por otro lado la cantidad de proteínas soluble por gramo de biomasa microalgal sin pretratar del Lote 2 mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) después de aplicar los pretratamientos CaO 15%, PHA 2 y 2.5%. Para el mismo Lote y entre pretratamientos las diferencias significativas ($p < 0.05$) se observaron entre CaO 15% con el resto de los pretratamientos, excepto con PHA 2.5% (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Diferencias significativas entre cantidad de proteínas solubles obtenidos después de los diferentes pretratamientos por gramo de peso seco de microalga para Lote 1 y Lote 2. Prueba de Tukey realizada con R 3.3.2. Las letras iguales indican aquellos pretratamientos entre los que no existen diferencias significativas, mientras que letras diferentes indica que existen diferencias significativas.

Pretratamiento	g Proteínas/g microalga (peso seco)			
	Lote 1		Lote 2	
Sin pretratamiento	0.02 ± 0.00	cde	0.03 ± 0.00	d
PHA 1.5%	0.03 ± 0.00	cd	0.05 ± 0.01	cd
PHA 2%	0.05 ± 0.00	b	0.06 ± 0.01	bc
PHA 2.5%	0.05 ± 0.00	a	0.07 ± 0.01	ab
NaOH 2%	0.01 ± 0.00	def	0.04 ± 0.00	d
NaOH 5%	0.01 ± 0.00	f	0.02 ± 0.02	cd

Pretratamiento	g Proteínas/g microalga (peso seco)			
	Lote 1		Lote 2	
CaO 10%	0.11 ± 0.01	ef	0.04 ± 0.01	d
CaO 15%	0.11 ± 0.00	cde	0.08 ± 0.01	A
NaOH 4M	0.01 ± 0.00	c	0.04 ± 0.01	D

Aunque se ha indicado que los pretratamientos termoalcalinos favorecen en mayor medida la liberación de proteínas que la de carbohidratos (Mendez et al., 2013; Solé-Bundó et al., 2017; Passos et al., 2016b), en este trabajo se observó dicho comportamiento solo para el Lote 1 de biomasa microalgal al aplicar todos los pretratamientos excepto en CaO 10 y 15% a 72 °C, 24 h. Mientras que en el caso del Lote 2 de biomasa microalgal se favoreció, en mayor medida, la solubilización de carbohidratos que la de proteínas en todos los pretratamientos termoalcalinos.

Finalmente se debe considerar el efecto de los álcalis sobre las moléculas constituyentes de las células microalgales, como la desnaturalización de las proteínas (Günerken et al., 2015), así como la polimerización de las macromoléculas solubilizadas (carbohidratos y proteínas) debido a la reacción de Maillard. En este contexto, los azúcares reductores disponibles y los aminoácidos reaccionan y conducen a la formación de moléculas complejas. El curso de la reacción de Maillard está fuertemente afectado por factores tales como temperatura, tiempo de calentamiento, contenido de agua y pH. Además de la presencia de la pared celular, la baja solubilización de proteínas puede atribuirse a esta reacción que toma lugar cuando las proteínas y los carbohidratos son solubles a altas temperaturas. (Mendez et al., 2013).

5.3. Potencial Bioquímico de Metano

Con el fin de identificar la contribución de la materia orgánica particulada a la producción de metano se realizó una comparación entre el contenido de DQO soluble y el de DQO particulada en los pretratamientos antes de comenzar las pruebas de producción de metano. Donde se advierte que 98% de la biomasa microalgal del Lote 1 corresponde a biomasa microalgal particulada (Figura 5.5 A) y en el Lote 2 la DQO particulada fue de 91% cuando no se efectuó un pretratamiento. Es importante recordar que los compuestos que son fácilmente biodegradables son compuestos orgánicos simples, incluyendo azúcares y proteínas, componentes de las células microalgales. Sin embargo, dichos compuestos

orgánicos se organizan en polímeros y se encuentran en partes estructuralmente complejas de las células, como la pared celular, haciendo significativamente menos biodegradable la biomasa microalgal, ya que el acceso de las enzimas a los sustratos es limitado (Bohutskyi et al., 2014). Como resultado, la primera etapa (hidrólisis) es la que limita la velocidad de reacción en la digestión anaerobia, en el caso de material orgánico particulado complejo. Por lo que la hidrólisis de la materia particulada, como las microalgas, puede hacer que la digestión anaerobia sea un proceso largo y lento, disminuyendo la eficiencia en términos de producción de biocombustibles (González-Fernández et al., 2012).

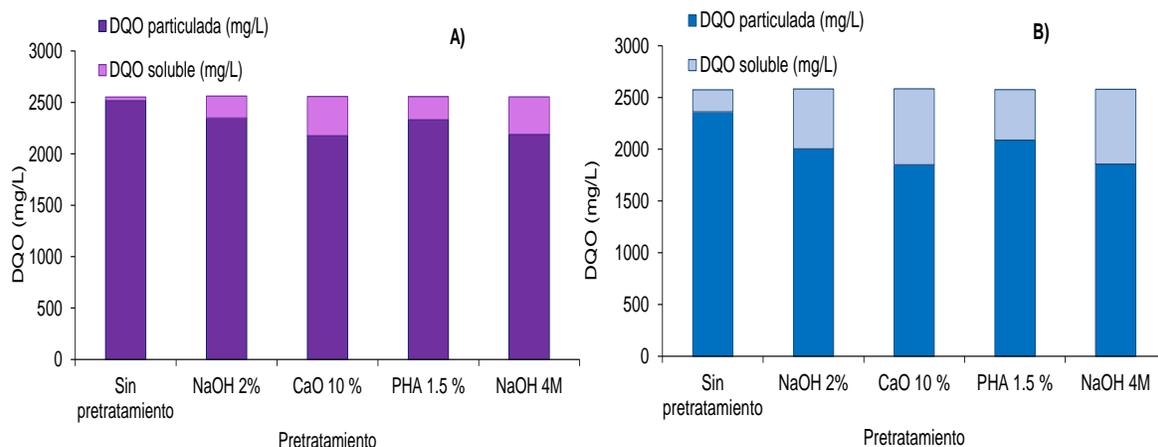


Figura 5.5. Concentración de DQO (mg/L) al inicio de la prueba de potencial de metano para dos lotes de biomasa microalgal. A) Lote 1; B) Lote 2.

En la Figura 5.5A, también se observa que en el caso del Lote 1 de microalga después de aplicar cualquiera de los pretratamientos termoalcalinos la proporción de DQO particulada disminuyó ligeramente de 98% a 91% para los pretratamientos con NaOH 2% a 50°C, 25 h y PHA 1.5% a 50°C por 1.5 h. Mientras que en el caso de los pretratamientos con CaO 10% a 72°C por 24 h y NaOH 4M a 120° por 20 min, la disminución fue de 85%. Para el Lote 2 de microalga la proporción de DQO particulada se redujo 10% con los pretratamientos de PHA 1.5% a 50°C por 1.5 h y NaOH 2% a 50°C; mientras que para los pretratamientos con CaO 10% a 72°C por 24 h y NaOH 4M a 120° por 20 min la disminución fue de 20% aproximadamente (Fig. 5.6 B). De igual manera se cuantificó, la concentración de carbohidratos y proteínas solubles antes de comenzar la prueba de potencial de metano, sin embargo no se encontró ningún tipo de correlación ($R^2 < 0.9$) entre lo carbohidratos y/o proteínas solubles y los rendimientos de producción de metano (Fig. 5.6).

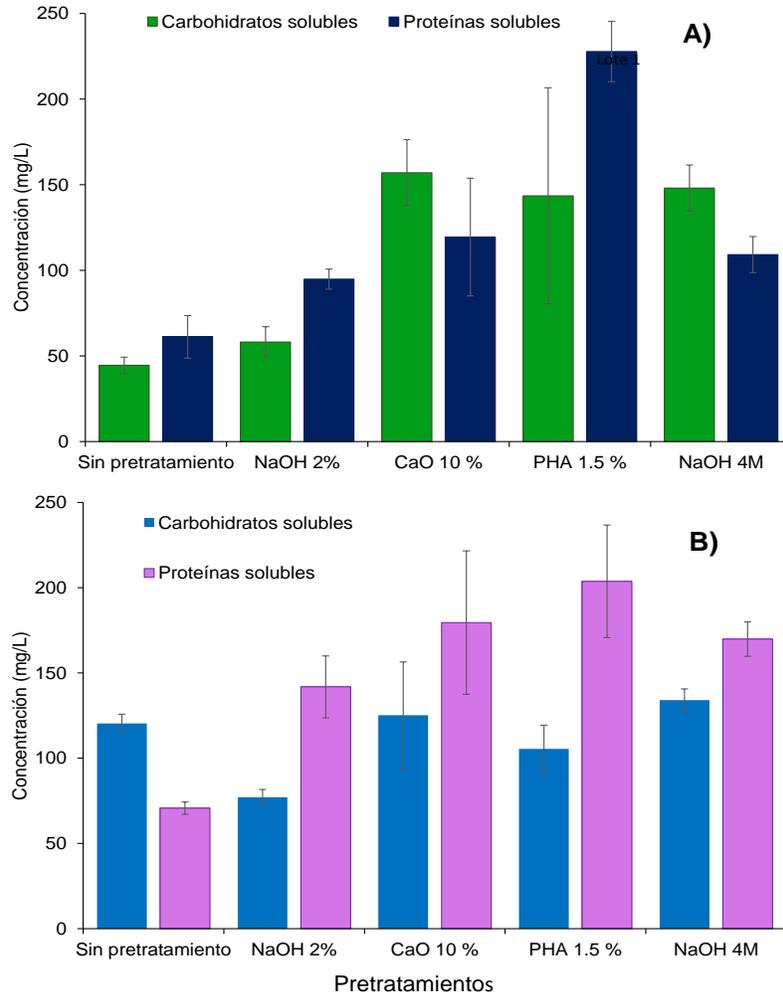


Figura 5.6 Concentración de carbohidratos y proteínas solubles al inicio de la prueba de potencial de metano. A) Lote 1; B) Lote 2

Para evaluar el efecto de los pretratamientos sobre la producción de metano, se evaluaron tanto el rendimiento como la tasa de producción de metano, mediante pruebas de potencial de producción de metano o pruebas de biodegradabilidad anaerobia.

Las pruebas de biodegradabilidad anaerobia se realizaron para los pretratamientos PHA 1.5%, NaOH 2%, CaO 10% y NaOH 4 M, dado que entre pretratamientos donde se utilizó el mismo reactivo no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la eficiencia de solubilización de DQO, por lo que se optó por utilizar aquellos que requirieran una menor cantidad de reactivo. La producción de metano acumulada por un período de 20 días para el Lote 1 y Lote 2 de biomasa microalgal pretratada se muestra en la Figura 5.7. Cabe mencionar que el rendimiento de metano está referido a la cantidad inicial de SV de

biomasa microalgal. Los resultados mostraron que la producción de metano aumentó linealmente durante las primeras 216 horas (9 días) con ambos Lotes. Posteriormente, la producción de metano alcanzó un nivel estacionario alrededor de las 240 horas; después de 380 horas (16 días) la producción de metano casi había cesado, y no se observó que esta terminará por completo, lo cual se puede explicar por la presencia de material particulado (microalga) que se va disolviendo de manera gradual por acción de enzimas secretadas por microorganismos hidrolíticos (Rittmann & McCarty, 2012).

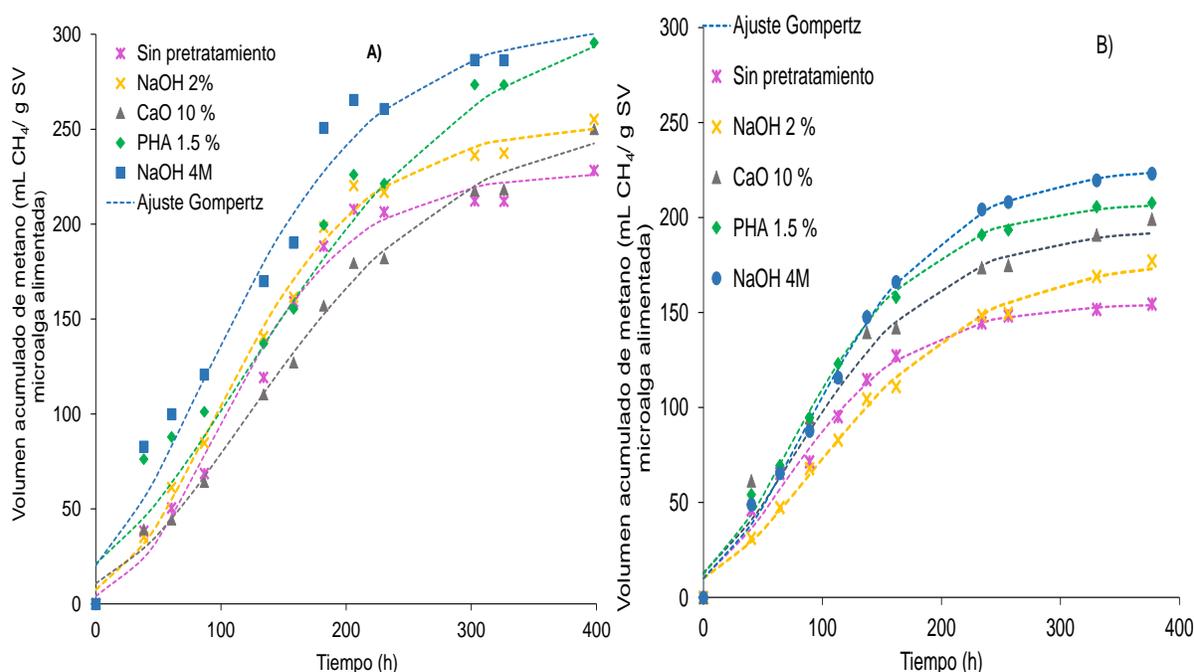


Figura 5.7 Producción acumulada de metano para dos lotes de biomasa microalgal. A) Lote 1 y B) Lote 2, Muestras por triplicado.

Los datos obtenidos de las pruebas de biodegradabilidad anaerobia, fueron ajustados al modelo de Gompertz modificado, los datos se muestran en la Tabla 5.4 para el Lote 1 y en la Tabla 5.5 para el Lote 2. Se observa que el rendimiento de producción de metano obtenido al usar biomasa microalgal sin pretratar a un pH inicial de 9, para el Lote 1 y Lote 2, fue de 226.7 y 155 mL CH₄/g SV, respectivamente y es similar a los ya reportados a pH neutro por Cortés-Carmona (2016) quien al usar *Scenedesmus obtusiusculus* sin pretratamiento obtuvo 113.7 mL CH₄/g DQOt consumida, mientras Keymer et al., (2013) obtuvo 150 mL CH₄/g SV al usar cultivo enriquecido con *Scenedesmus* sp. y (Solé-Bundó et al., 2017) para una mezcla de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. obtuvo 260 mL CH₄/g SV,

sólo se encuentra por debajo de lo obtenido por Cho et al.,(2013) al utilizar una mezcla de *Chlorella* sp (70% peso seco) y *Scenedesmus* sp (30% peso seco total) sedimentada y centrifugada (336 mL CH₄/g SV).

El rendimiento más alto de producción de metano con la biomasa microalgal del Lote 1 se obtuvo con el pretratamiento con PHA 1.5% a 50°C por 1.5 h (320.6 mL CH₄/g SV microalga alimentada) y la velocidad más alta de producción de metano se obtuvo con NaOH 4M a 120 °C por 20 min (1.4 mL CH₄/g SV·h). El segundo mejor rendimiento fue obtenido con NaOH 4M a 120 °C por 20 min con 307.1 mL CH₄/g SV microalga alimentada. Al comparar los rendimientos y las tasas de producción de metano de la biomasa microalgal sin pretratar con la biomasa microalgal pretratada no se encontraron diferencias significativas (p<0.05). En cuanto a la fase de retardo o lag (λ) se aprecia que existió una disminución de esta fase para todos los pretratamientos y en mayor medida cuando se utilizaron los pretratamiento con PHA 1.5% a 50°C por 1.5 h y NaOH 4M a 120°C por 20 min. El porcentaje de metano en el biogás producido estuvo entre 84 y 99.6%. Cabe mencionar que con ningún pretratamiento se logró el rendimiento teórico de metano de 454.39 mL CH₄/g SV.

Los resultados con el Lote 2 (Tabla 5.5), mostraron que el rendimiento y la velocidad más alta de producción de metano se obtuvieron con NaOH 4M 10% (227.1 mL CH₄/g SV). Comparado con la biomasa microalgal sin pretratar, el rendimiento de metano no mostró diferencias significativas (155 mL CH₄/g SV; p < 0.05) con respecto al rendimiento de metano después de aplicar cualquiera de los pretratamientos, igualmente se encontraron diferencias significativas en el rendimiento de metano entre los pretratamientos NaOH 4M y NaOH 2%. Mientras para la velocidad de producción de metano no se encontraron diferencias significativas (p>0.05) entre la biomasa microalgal sin pretratar y la biomasa microalgal pretratada con cualquiera de los álcalis. Por otro lado la aplicación de los pretratamientos con NaOH 2%, PHA 1.5% y NaOH 4M retardaron el comienzo de la producción de metano, como lo indica el aumento de la fase lag, el mayor retardo se observó con el pretratamiento con NaOH 4M. El porcentaje de metano en el biogás varió de 78 a 92%. De igual manera que para el Lote 1, con ninguno de los pretratamientos se alcanzó el rendimiento teórico de metano de 435.64 mL CH₄/g SV.

Tabla 5.4. Parámetros de Gompertz modificado para la producción de metano para el Lote 1 de biomasa microalgal.

Parámetro	Pretratamiento				
	Sin pretratamiento	NaOH 2%	CaO 10%	PHA 1.5%	NaOH 4M
Hmax (mL CH ₄ /g SV)	228.1 ± 9.40	253.8 ± 14.71	258.1 ± 1.95	320.6 ± 45.60	307.1 ± 54.42
Rmax (mL CH ₄ /g SV*h)	1.3 ± 0.16	1.3 ± 0.13	0.9 ± 0.10	1.0 ± 0.17	1.4 ± 0.17
Lambda (h)	25.7 ± 3.43	18.9 ± 10.26	15.7 ± 3.74	0.0 ± 0.00	0.0 ± 2.15
CH ₄ (%)	91 ± 2.25	90 ± 2.41	90 ± 9.21	100 ± 0.00	84 ± 13.22

Tabla 5.5. Parámetros de Gompertz modificado para la producción de metano para el Lote 2 de biomasa microalgal.

Parámetro	Pretratamiento				
	Sin pretratamiento	NaOH 2%	CaO 10%	PHA 1.5%	NaOH 4M
Hmax (mL CH ₄ /g SV)	155.0 ± 7.01	179.2 ± 12.74	194.7 ± 10.86	208.4 ± 14.98	227.1 ± 7.63
Rmax (mL CH ₄ /g SV*h)	0.9 ± 0.23	0.8 ± 0.27	1.0 ± 0.40	1.1 ± 0.15	1.2 ± 0.06
Lambda (h)	0.0 ± 1.57	5.2 ± 14.65	0.0 ± 0.00	3.0 ± 6.35	10.0 ± 2.24
CH ₄ (%)	92 ± 14.29	91 ± 8.63	89 ± 10.24	86 ± 6.28	78 ± 7.58

En cuanto al rendimiento en la producción de metano después de aplicar CaO 10% a 72°C por 24 h, se obtuvo un rendimiento 243.5 y 194.7 mL CH₄/g SV para el Lote 1 y Lote 2, el cuál es menor al obtenido por Solé-Bundó et al. (2017) de 325 mL CH₄/g SV con CaO 10%, sin embargo es comparable con el obtenido de 255 mL CH₄/g SV al aplicar CaO 4% 55 °C, 24 h a una mezcla de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

Para estar en posibilidad de comparar los rendimientos obtenidos con los pretratamientos con NaOH, se procedió a convertir las unidades de mL CH₄/g SV a mL CH₄/g DQO, al multiplicar por el factor de conversión de 0.77 g SV/g DQO para ambos lotes. Por tanto para el rendimiento de metano con el pretratamiento con NaOH 4M, 120 °C, 20 min es 236 y 175 mL CH₄/g DQO para el Lote 1 y Lote 2 respectivamente, lo cual es comparable con lo reportado por Mendez et al. (2013) 237 mL CH₄/g DQO al aplicar el mismo pretratamiento en *Chlorella vulgaris*. De igual manera para el pretratamiento con NaOH 2%, 50°C, 24 h el rendimiento de metano es de 195 y 138 mL CH₄/g DQO para el Lote 1 y Lote 2, respectivamente, mientras que Mahdy et al. (2014), obtuvo 162 mL CH₄/g DQO, al aplicar NaOH 5% (p/p) a 50°C a biomasa microalgal de *Scenedesmus* sp..

El pretratamiento con PHA 1.5% 50°C, 1.5 h, con el que se obtuvieron rendimientos de 320 y 208 mL CH₄/g SV para Lote 1 y Lote 2 respectivamente, es comparable con otros pretratamientos alcalinos en los que se utiliza NaOH, KOH, CaO con y sin aplicación de calor con valores de 80 a 363 mL (Solé-Bundó et al., 2017; Cho et al., 2013; Passos et al., 2016b). Entre los reportes de rendimientos de metano obtenidos a través de BMP el reportado por Cho et al. (2013) es el mayor con un valor de 363 mL CH₄/g SV después de aplicar un pretratamiento alcalino con NaOH 5 N a pH 9.

La Fig. 5.8 muestra la contribución de la DQO soluble a la producción de metano, en donde se observa que la fracción soluble de la DQO contribuyó entre 14 y 30% en la producción de metano para el Lote 1, mientras que en el Lote 2 la fracción soluble de la DQO contribuyó entre 40 y 64% a la producción de metano. Lo anterior indica que la fracción particulada de DQO fue el sustrato mayoritario a partir del cual se produjo el metano en el Lote 1, comparado con el Lote 2. Una posible explicación es que la pared celular de la biomasa microalgal del Lote 1 si fue dañada por los pretratamientos alcalinos liberando o dejando expuesto en mayor medida los componentes internos para la acción de las enzimas excretadas por los microorganismos, mientras que en el Lote 2 la solubilización de materia orgánica pudiera deberse en mayor medida a la solubilización de EPS más que la solubilización de los componentes internos de la microalga (ver sección 2.12).

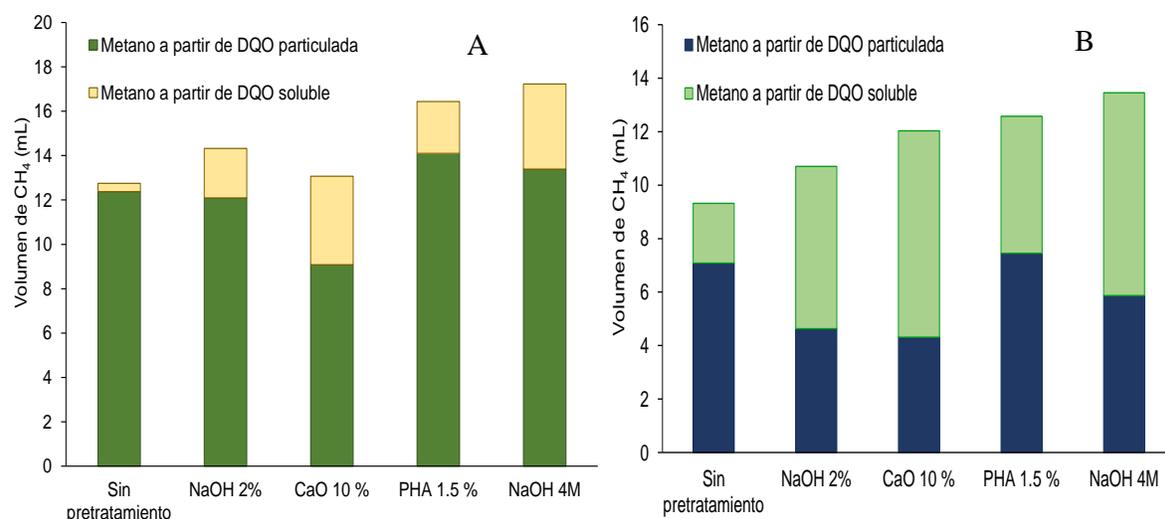


Figura 5.8 Volumen de metano obtenido en cada pretratamiento y la contribución de DQO particulada y soluble. A) Lote 1. B) Lote 2

La variación en los rendimientos de metano se puede deber al contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, así como a la estructura de la pared celular de la microalga y la composición bioquímica a su vez se encuentra afectada por condiciones de crecimiento (Lakaniemi et al., 2013). Cabe mencionar que todos los estudios mencionados anteriormente realizaron las pruebas de potencial de metano a pH neutro, a pesar de que la biomasa microalgal fue pretratada a pH alcalino. Dado que los valores de rendimiento de metano obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de los rangos reportados en experimentos anteriores y a pesar de la disminución de la actividad metanogénica acetoclástica debida al efecto de las condiciones alcalinas, destaca la ventaja de obtener un biogás con porcentajes de metano entre 72 a 100%, en lugar de entre 50-70%. Este alto contenido de metano hace al biogás adecuado para ser utilizado como biometano para vehículos y puede ser inyectado a la red de gas con una mínima purificación, por ejemplo en países como Alemania el contenido mínimo de metano requerido es de 96%, en Noruega de 95% y en Holanda de 88% (Nolla-Ardevol et al., 2015).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo evaluó el efecto de diferentes pretratamientos termoalcalinos sobre dos lotes de biomasa microalgal *Scenedemus obtusiusculus*. Los pretratamientos aumentaron la solubilización de materia orgánica, así como de carbohidratos (3-60%) y proteínas (2-79%). Aunque existe un aumento de la materia orgánica soluble después de aplicar cualquiera de los pretratamientos, no existe una correlación directamente proporcional entre la eficiencia de solubilización y el rendimiento de metano. En cuanto a las pruebas de potencial de metano, el mayor rendimiento de metano se obtuvo con el pretratamiento con PHA 1.5% a 50 °C por 1.5 h par el Lote 1 (320.6 mL CH₄/g SV), y con NaOH 4M, 120°C por 20 min par el Lote 2 (227 mL CH₄/g SV), en donde el porcentaje de metano fue de 100 y 78%. Cabe destacar el desempeño del pretratamiento con PHA 1.5% a 50 °C por 1.5 h, ya que el rendimiento de metano obtenido para el Lote 1 con este pretratamiento corresponde a un 70.5% del rendimiento teórico de metano, mientras que con el pretratamiento con NaOH 4M, 120°C por 20 min se logra obtener un 67.5% del rendimiento teórico de metano. En el caso del el lote 2 el rendimiento de metano obtenido con NaOH 4M, 120°C por 20 min corresponde a un 52.13% del rendimiento teórico de metano y con el pretratamiento con PHA 1.5% a 50 °C por 1.5 h se obtiene un 47.83% del rendimiento teórico de metano. Además de considerar que el pretratamiento con PHA se conduce a temperatura media y el tiempo de exposición es mucho menor que el tiempo de exposición en los pretratamientos con NaOH 2% a 50°C por 24 h y CaO 10% 72°C por 24 h. Se debe considerar que las pruebas de metano se realizaron en un pH 9 y que podrían tener la ventaja de disminuir el uso de reactivos para la neutralización de la biomasa microalgal pretratada, también se presenta el inconveniente de la disminución en la actividad metanogénica acetoclástica del lodo granular en un pH alcalino, lo que resulta desfavorable en este proceso. Dado que se encontraron resultados favorables con el uso de PHA, sería recomendable probar una concentración mayor en el pretratamiento y observar los efectos sobre el rendimiento en la producción de metano. De igual manera resultaría adecuado la aclimatación del lodo anaerobio al sustrato, además de explorar otras especies de microalgas que presenten una pared celular menos recalcitrante. Es importante mencionar que ya que las condiciones de cultivo de la microalga impactan en la composición bioquímica de la microalga, así como en su morfología celular, resultaría adecuado establecer aquellas condiciones en las que se pueda favorecer la digestibilidad de la biomasa microalgal. Cabe mencionar que estas

pruebas se realizaron en lote, por lo que resultaría conveniente evaluar el proceso en un sistema en continuo y en diferentes configuraciones de reactor y estar en orden de comparar cuál es más conveniente para el proceso. Finalmente evaluar las entradas y salidas de energía en la integración del cultivo de microalgas con el pretratamiento y la digestión anaerobia, y conocer la conveniencia del proceso, así como la posibilidad de extraer productos de valor agregado como lo son algunos metabolitos o pigmentos de las microalgas.

7. REFERENCIAS

- Abbasi, T., Tauseef, S. M., & Abbasi, S. . (2012). *Biogas Energy*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1040-9>
- Abo-Shady, A. M., Mohamed, Y. A., & Lasheen, T. (1993). Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biologia Plantarum*, 35(4), 629–632. <https://doi.org/10.1007/BF02928041>
- Agarwal, A. K., Agarwal, R. A., Gupta, T., & Gurjar, B. R. (2017). *Biofuels: technology, challenges and prospects*.
- Al Sandouk-Lincke, N. A., Schwarzbauer, J., Hartkopf-Fröder, C., Volk, H., Fuentes, D., Young, M., & Littke, R. (2014). The effect of different pyrolysis temperatures on organic microfossils, vitrain and amber—A comparative study between laser assisted- and Curie Point-pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry Nadia. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 10, 211–223. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.03.004>
- American Public Health Association. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater: selected analytical methods approved and cited by the United States Environmental Protection Agency*.
- Angelaalincy, M., Senthilkumar, N., Karpagam, R., Kumar, G. G., Ashokkumar, B., & Varalakshmi, P. (2017). Enhanced Extracellular Polysaccharide Production and Self-Sustainable Electricity Generation for PAMFCs by Scenedesmus sp. SB1. *ACS Omega*, 2(7), 3754–3765. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00326>
- Bahadar, A., & Bilal Khan, M. (2013). Progress in energy from microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 128–148. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.029>
- Biosantech, T. A. S., Rutz, D., Janssen, R., & Drosig, B. (2013). Biomass resources for biogas production. In *The Biogas Handbook* (pp. 19–51). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857097415.1.19>
- Bohutskyi, P., Betenbaugh, M. J., & Bouwer, E. J. (2014). The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. *Bioresource Technology*, 155, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.095>
- Borowitzka, M. A., Beardall, J., & Raven, J. A. (Eds.). (2016). *The Physiology of Microalgae* (1st ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae — A review of technologies for production , processing , and extractions of biofuels and co-products, 14, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Cho, S., Park, S., Seon, J., Yu, J., & Lee, T. (2013). Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresource Technology*, 143, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.017>
- Cortés-Carmona, M. A. (2016). Combustibles gaseosos a partir de biomasa microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus*.
- Cortés-Carmona, M., Tapia-Rodríguez, A., Morales, M., Celis, L. B., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2018). Methane production from thermally pretreated *Scenedesmus obtusiusculus* biomass in semi-batch reactors at low reaction times. *Biochemical Engineering Journal*, 136, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.05.006>
- Dorado, A. D., Arellano, L., Fortuny, M., Gabriel, D., Gamisans, X., Gonzalez.Sánchez, A., ... Sierra, H. (2017). *Purificación y usos del biogás Purification*. (D. Gabriel & H. Sierra, Eds.). Universitat Autònoma de Barcelona Servei de Publicacions.
- Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2010). Third generation biofuels from microalgae, 1355–1366.
- Gonzalez-Fernandez, C., & Muñoz, R. (Eds.). (2017). *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.09990-8>

- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J.-P. (2012). Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(2), 205–218. <https://doi.org/10.1002/bbb.337>
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J. P. (2012a). Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresource Technology*, 110, 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.043>
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J. P. (2012b). Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass and Bioenergy*, 40, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.008>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33(2), 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Hao, L., Lü, F., Li, L., Wu, Q., Shao, L., & He, P. (2013). Self-adaption of methane-producing communities to pH disturbance at different acetate concentrations by shifting pathways and population interaction. *Bioresource Technology*, 140, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.113>
- Jingura, R. M., & Kamusoko, R. (2017). Methods for determination of biomethane potential of feedstocks: a review. *Biofuel Research Journal*, 4(2), 573–586. <https://doi.org/10.18331/BRJ2017.4.2.3>
- Keymer, P., Ruffell, I., Pratt, S., & Lant, P. (2013). High pressure thermal hydrolysis as pretreatment to increase the methane yield during anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology*, 131, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.125>
- Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'Brien, J., & Baynes, J. W. (Eds.). (1998). *Maillard Reaction in Chemistry, Food, and Health*. Abington, Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-792-1.50002-3>
- Lakaniemi, A. M., Tuovinen, O. H., & Puhakka, J. A. (2013). Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers - A review. *Bioresource Technology*, 135, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.096>
- Lee, J. W. (2013). *Advanced Biofuels and Bioproducts* (1st ed.). Springer-Verlag New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4>
- Lee, R. E. (2008). *Basic characteristics of the algae*. *Phycology*. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511812897.002>
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2014). Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. *Energy*, 78, 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.05.052>
- Mallick, N., Bagchi, S. K., Koley, S., & Singh, A. K. (2016). Progress and challenges in microalgal biodiesel production. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01019>
- Martín, J., Lorenzo, A., Muñoz, R., Blanco, S., & Bolado, S. (2016). Bioresource Technology Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment, 218, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.087>
- Medipally, S. R., Yusoff, F. M., Banerjee, S., & Shariff, M. (2015). Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/519513>
- Meier, L., Pérez, R., Azócar, L., Rivas, M., & Jeison, D. (2015). Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading. *Biomass and Bioenergy*, 73, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.10.032>
- Mendez, L., Mahdy, A., Timmers, R. A., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2013). Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresource Technology*, 149, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.136>

- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, *155*, 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Montiel Corona, V., & Razo-Flores, E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresource Technology*, *249*, 334–341. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.10.032>
- Murphy, J. D., Drosig, B., Allen, E., Jerney, J., Xia, A., & Herrmann, C. (2015). *A Perspective on algal biomass*.
- Nolla-Ardevol, V., Strous, M., & Tegetmeyer, H. E. (2015a). Anaerobic digestion of the microalga *Spirulina* at extreme alkaline conditions: Biogas production, metagenome and metatranscriptome. *Frontiers in Microbiology*, *6*(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00597>
- Nolla-Ardevol, V., Strous, M., & Tegetmeyer, H. E. (2015b). Anaerobic digestion of the microalga *Spirulina* at extreme alkaline conditions: Biogas production, metagenome and metatranscriptome. *Frontiers in Microbiology*, *6*(MAY), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00597>
- Passos, F., Hom-diaz, A., Blanquez, P., Vicent, T., & Ferrer, I. (2016a). Bioresource Technology Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. *Bioresource Technology*, *199*, 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.084>
- Passos, F., Felix, L., Rocha, H., Pereira, J. de O., & de Aquino, S. (2016b). Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: Thermochemical pretreatment and biogas production. *Bioresource Technology*, *209*, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.006>
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., & Ferrer, I. (2014). Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresource Technology*, *172*, 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.114>
- Paul, R., Melville, L., & Sulu, M. (2016). Anaerobic Digestion of Micro and Macro Algae, Pre-treatment and Co-Digestion-Biomass — A Review for a Better Practice. *International Journal of Environmental Science and Development*, *7*(9), 646–650. <https://doi.org/10.18178/ijesd.2016.7.9.855>
- Persson, M., Jonsson, O., & Wellinger, A. (2007). Biogas Upgrading To Vehicle Fuel Standards and Grid. *IEA Bioenergy*, 1–32.
- Perumal, P., Balaji Prasath, B., Santhanam, P., Ananth, S., Shenbaga Devi, A., & Dinesh Kumar, S. (2015). Advances in marine and brackishwater aquaculture. *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*, (May), 1–262. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2271-2>
- Rajagopal, R., Massé, D. I., & Singh, G. (2013). Bioresource Technology A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresource Technology*, *143*, 632–641. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.030>
- Razzak, S. A., Hossain, M. M., Lucky, R. A., Bassi, A. S., & De Lasa, H. (2013). Integrated CO2 capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *27*, 622–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.063>
- Richmond, A. (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology/edited by Amos Richmond. *Orton.Catie.Ac.Cr*, 472. <https://doi.org/10.1002/9780470995280>
- Rittmann, B. E., & McCarty, P. L. (2012). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. (M.-H. H. Education, Ed.) (Indian Edi).
- Rodriguez, C., Alaswad, A., Mooney, J., Prescott, T., & Olabi, A. G. (2015). Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. *Fuel Processing Technology*, *138*, 765–779. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.06.027>

- Sandberg, M., & Ahring, B. K. (1992). Microbiology Biotechnology Anaerobic treatment of fish meal process waste-water in a UASB reactor at high pH, 800–804.
- Seadi, T. A., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., & Janssen, R. (2008). *Biogas Handbook. Igarss 2014*. <https://doi.org/10.1533/9780857097415.1.85>
- Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O. (2011). Comments on “Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable.” *Biotechnology Advances*, 29(1), 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.10.005>
- Singh, N. K., & Dhar, D. W. (2011). Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(4), 605–629. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0018-0>
- Solé-Bundó, M., Carrère, H., Garfí, M., & Ferrer, I. (2017). Enhancement of microalgae anaerobic digestion by thermo-alkaline pretreatment with lime (CaO), 24, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.025>
- Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K., & Pi, P. P. H.--. (1977). Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria, 41(1), 100–180.
- Wang, X., Nordlander, E., Thorin, E., & Yan, J. (2013). Microalgal biomethane production integrated with an existing biogas plant: A case study in Sweden. *Applied Energy*, 112, 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.04.087>
- Ward, A. J., Lewis, D. M., & Green, F. B. (2014). Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, 5(1), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.001>
- Williams, L., Gallagher, J., Bryant, D., & Ravella, S. R. (2017). Anaerobic Digestion and the Use of Pre-treatments on Lignocellulosic Feedstocks to Improve Biogas Production and Process Economics. *Advances in Biofeedstocks and Biofuels*, 1, 121–147. <https://doi.org/10.1002/9781119117322.ch6>
- Xiao, R., & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1225–1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>