



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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“Combustibles gaseosos a partir de biomasa
microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus*”**

Tesis que presenta

Miguel Angel Cortés Carmona

Para obtener el grado de

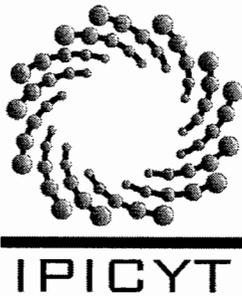
Maestro en Ciencias Ambientales

Co-directores de la Tesis:

Dr. Elías Razo Flores

Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2016



Constancia de aprobación de la tesis

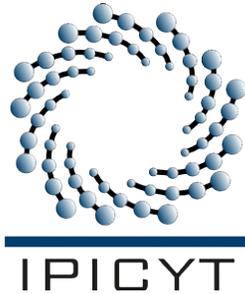
La tesis "**Combustibles gaseosos a partir de biomasa microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Miguel Ángel Cortés Carmona** y aprobada **el treinta de agosto de dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Elías Razo Flores
Codirector de la tesis

Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarria
Codirectora de la tesis

Dr. Felipe Alatraste Mondragón
Miembro del Comité Tutorial

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Miembro del Comité Tutorial



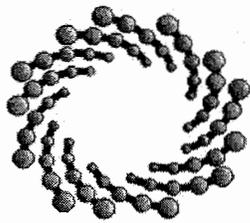
Créditos Institucionales

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 del Dr. Elías Razo Flores y de la Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarra.

Parte del trabajo experimental fue realizado en el Departamento de Procesos y Tecnología, División de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. La estancia fue financiada por una beca mixta nacional de CONACYT 291061.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del CONACYT 387726.

Este trabajo de investigación fue financiado con recursos del proyecto CONACYT PDCPN-2014-247402 “Desarrollo e innovación de sistemas integrales-sustentables a base de microalgas para tratamiento de aguas, fijación de CO₂ y generación de biocombustibles”, asignado al Dr. Elías Razo Flores.



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 034 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 30 días del mes de agosto del año 2016, se reunió a las 08:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Felipe Alatríste Mondragón	Presidente	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Secretaria	IPICYT
Dr. Elías Razo Flores	Sinodal	IPICYT
Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría	Sinodal externo	UAM-Cuajimalpa

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

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó el C.

Miguel Ángel Cortés Carmona

sobre la Tesis intitulada:

*Combustibles gaseosos a partir de biomasa microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus**

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Elías Razo Flores
Dr. Marcia Guadalupe Morales Ibarría (UAM-Cuajimalpa)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 10:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de agosto de 2016.

Dra. Ivonne Lizette Cuevas Vález
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada a mis padres, Jesús Cortes y María de los Ángeles, por su eterno cariño, a mis hermanos Gabriel, Jesús y Jérica por su inigualable apoyo, a mis abuelos, y a Paola por su paciencia y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Me complace extender mi más profundo agradecimiento al Dr. Elías Razo Flores por permitirme realizar esta tesis, por su paciencia y dedicación, así como a la Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarra por los aportes atinados a este trabajo y por las atenciones prestadas durante mi estancia en su grupo de investigación. Al Dr. Felipe Alatraste Mondragón y a la Dra. Berenice Celis por el tiempo invertido, por sus valiosos aportes y constantes comentarios.

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, Q.F.B. Elizabeth Cortez Cedillo, la I.Q. María del Carmen Rocha Medina por el apoyo brindado y a la M. en C. Ana Iris Peña Maldonado, de la división de Materiales Avanzados. De igual forma agradezco el uso de las instalaciones del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), asociado a la División de Materiales Avanzados del IPICYT.

A mis buenos amigos: Christian Cisneros Pérez y Rodolfo Palomo Briones, a todo el grupo de investigación del Dr. Elías Razo, así como al Dr. Juan Cabello, a León Sánchez, a Pierre-Louis Gorry miembros del grupo de investigación de la Dra. Marcia Morales en la UAM-C.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de Tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1.-Introducción	1
1.1.- <i>Problemática ambiental</i>	1
1.2.- <i>Energías renovables.</i>	1
1.3.- <i>Biomasa y biocombustibles</i>	2
1.4.- <i>Biomasa microalgal y potenciales aplicaciones.</i>	3
1.4.1.-Sistemas de cultivo y concentración para microalgas	4
1.5.- <i>Digestión anaerobia.</i>	5
1.5.1.-Digestión anaerobia de biomasa microalgal y pre-tratamientos.	7
1.5.1.1.- Sistemas de producción de metano usando biomasa microalgal	8
1.6.- <i>Producción fermentativa de hidrógeno a partir de biomasa microalgal.</i>	11
1.7.- <i>Justificación</i>	11
2.- Hipótesis y objetivos	12
3.- Materiales y métodos	13
3.1.- <i>Microalga: Scenedesmus obtusiusculus</i>	13
3.2.- <i>Sistemas de cultivo raceway pond (RWP) y columnas de burbujeo</i>	14
3.3.- <i>Caracterización de la biomasa microalgal</i>	16
3.3.1.-Determinación de carbohidratos	16
3.3.2.-Determinación de proteínas	16
3.3.3.-Determinación de lípidos neutros.	16
3.4.- <i>Tratamiento térmico</i>	17
3.4.1.-Diseño central compuesto	17
3.4.2.-Tratamiento térmico para distintas concentraciones de biomasa	18
3.5.- <i>Inóculo para la digestión anaerobia y fermentación oscura.</i>	18
3.6.- <i>Producción de metano en lote</i>	19
3.7.- <i>Producción de hidrógeno en lote</i>	20
3.8.- <i>Producción de metano en semi-continuo</i>	20
	vii

3.9.- <i>Métodos analíticos.</i>	21
3.10.- <i>Microscopía electrónica de barrido</i>	22
4.-Resultados y discusión	22
4.1.- <i>Cultivo y caracterización de S. obtusiusculus</i>	22
4.2.- <i>Tratamiento térmico.</i>	23
4.2.1.- Efecto de la concentración de biomasa microalgal en el tratamiento térmico	27
4.3.- <i>Producción de biogás en lote</i>	29
4.3.1.-Efecto del tratamiento térmico en la producción de biogás	29
4.3.2.- Efecto de la concentración de biomasa microalgal en la producción de biogás.	31
4.4.- <i>Producción de biogás en semi-continuo</i>	33
4.4.1.-Desempeño del reactor	33
4.4.2.-Efecto de la velocidad de carga orgánica en los rendimientos de metano	35
4.4.3.- Balance de masa	37
4.5.- <i>Producción de hidrógeno en experimentos en lote</i>	39
5.- Conclusiones y perspectivas	41
6.- Bibliografía	43

Lista de tablas

	Página
1.- Condiciones de tratamiento para la solubilización de materia orgánica	8
2.- Reportes de producción de metano con biomasa microalgal	10
3.- Diseño central compuesto para el tratamiento térmico	17
4.- Experimentos de producción de metano en lote	19
5.- Resultados del diseño central compuesto	24
6.- Datos cinéticos obtenidos en los experimentos de producción de metano en lote	32
7.- Resultados de la producción en semi-continuo y comparación con resultados de la literatura	39

Lista de figuras

	Página
1.-Etapas del proceso de digestión anaerobia	5
2.-Sistemas para el cultivo de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	15
3.-Esquema y fotografía del reactor de tanque agitado	21
4.-Cinéticas de crecimiento de la biomasa microalgal	23
5.-Superficie de respuesta para el diseño central compuesto	25
6.-Imágenes por SEM de la biomasa microalgal tratada térmicamente	27
7.-Efecto de la concentración de biomasa microalgal en el tratamiento térmico	28
8.-Cinéticas de producción de metano en lote	30
9.-Eficiencia de remoción de DQO en la producción de metano en lote	31
10.-Desempeño del reactor de tanque agitado operado en semi-continuo	34
11.-Consumo de DQO soluble en el reactor operado en semi-continuo	35
12.-Rendimientos en las etapas del reactor operado en semi-continuo	36
13.-Balance de DQO para las distintas etapas del reactor operado en semi-continuo	36
14.-Eficiencia de degradación de sólidos totales en el reactor semi-continuo	38
15.-Producción de hidrógeno a partir de biomasa microalgal	40

Abreviaturas

DQOs: Demanda química de oxígeno soluble

DQOt: Demanda química de oxígeno total

CCD: Diseño central compuesto (siglas en Inglés Central composite design)

ST: Sólidos totales

SV: Sólidos volátiles

SSV: Sólidos suspendidos volátiles

F/M: Relación substrato/inóculo (siglas en Inglés Food/Microorganism)

VCO: Velocidad de carga orgánica

TRH: Tiempo de retención hidráulica

VVPM: Velocidad volumétrica de producción de metano

Resumen

Combustibles gaseosos a partir de biomasa microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus*

Actualmente, los procesos biotecnológicos para la captura de CO₂ y la producción de biocombustibles representan una alternativa viable para disminuir los efectos negativos causados por la sobreexplotación de los combustibles fósiles. En particular, el biogás obtenido a partir de la digestión anaerobia de biomasa microalgal y el hidrógeno obtenido por fermentación oscura de los carbohidratos de la biomasa microalgal, son considerados biocombustibles gaseosos de tercera generación, lo cual representa ventajas importantes contra los biocombustibles de primera y segunda generación. En este trabajo se evaluó la producción de metano en sistemas en lote y semi-continuo a partir de biomasa microalgal seca de *Scenedesmus obtusiusculus* tratada térmicamente. En el caso de la producción en lote se observaron rendimientos entre 113 y 213 mL CH₄/g DQO_{consumida} para concentraciones de biomasa microalgal de 2 y 10 g DQO/L, respectivamente. Por otro lado, en el sistema semi-continuo se alcanzaron velocidades de 2 L CH₄/L-d con rendimientos de hasta 370 mL CH₄/g DQO_{consumida} para una velocidad de carga orgánica de 10 g DQO/L-d. El consumo de DQO en las mejores condiciones se encontró cerca de 70%. Estos resultados demuestran que la biomasa microalgal puede ser utilizada para la generación de biogás al realizar un tratamiento térmico para la liberación del contenido intracelular. Los resultados de producción de biogás en semi-continuo demuestran que no es necesario trabajar con tiempos de residencia hidráulica altos para obtener altos rendimientos y velocidades volumétricas de producción de metano, tal como se reporta en la literatura. La producción fermentativa de hidrógeno a partir de biomasa microalgal es viable. No obstante se debe estudiar a profundidad el desarrollo de pre-tratamientos eficientes para la solubilización de carbohidratos.

PALABRAS CLAVE: Biomasa microalgal, digestión anaerobia, tratamiento térmico, metano.

Abstract

Gaseous fuels by microalgae biomass from *Scenedesmus obtusiusculus*

In recent times, biotechnological processes for CO₂ sequestration and biofuel production represent a feasible alternative to reduce the negative effects caused by the overexploitation of fossil fuels. In particular, biogas generated from the anaerobic digestion of microalgae and hydrogen from dark fermentation are considered third generation biofuels alternative that shows important advantages in comparison to first- and second- generation biofuels. In this work, methane production from thermally treated microalgal biomass obtained from *Scenedesmus obtusiusculus* cultures was evaluated in systems operated under batch and semi-continuous mode. In batch experiments, methane production yield ranging from 113 to 213 mL CH₄/ g COD_{consumed} was observed with microalgal biomass concentrations between 2 and 10 g COD/L, respectively. On the other hand, systems operated under semi-continuous mode reached volumetric methane production rates of 2 L CH₄/L-d with methane yields of 370 mL CH₄/g COD_{consumed}, for 10 g COD/L-d of organic loading rate. COD consumption, under optimal conditions was about 70%. These results showed that microalgal biomass could be used for biogas generation. Moreover, the performance and its potential can be increased when performing a thermal treatment of the biomass. Semi-continuous biogas production results demonstrated that is not necessary to operate on large hydraulic retention times to get high yields and volumetric production rates. Fermentative hydrogen production through microalgal biomass is feasible. However this processes should be studied in terms of pre-treatments for carbohydrate solubilization.

KEY WORDS: Microalgae biomass, anaerobic digestion, thermal treatment, methane.

1.-Introducción

1.1.-Problemática ambiental

Durante la revolución industrial en el siglo XVIII se desencadenó un importante desarrollo tecnológico que involucró la mecanización de múltiples procesos productivos, lo cual conllevó a una explotación generalizada de los combustibles fósiles, situación que se ha extendido hasta la actualidad. Lo anterior ha generado problemas a la salud humana y el medio ambiente, siendo el calentamiento global una de las consecuencias más importantes de la quema de hidrocarburos y las emisiones de CO₂ (Chiari & Zecca, 2011). En México se registra un aumento en las emisiones de CO₂ de 1% cada año con una emisión per cápita de 3.8 toneladas métricas (González-Méndez et al., 2015). Debido a esto, ha sido necesario implementar medidas de reducción de las emisiones de CO₂ tales como los procesos de fijación de carbono y alternativas energéticas sostenibles (Sayre, 2010).

1.2.- Energías renovables

En el mundo, aproximadamente el 80% del consumo de energía proviene de los combustibles fósiles y solamente el 20% proviene de fuentes renovables. En México, durante el año 2012, se generaron 13 mil MW en centrales hidroeléctricas abasteciendo 16% de la demanda total. Actualmente, se encuentran en desarrollo tecnologías para producir energéticos que eventualmente puedan contribuir a cubrir un porcentaje más alto de la demanda (Alemán-Nava et al., 2014). Se han desarrollado tecnologías entre las que destacan la energía eólica, solar, geotérmica y la energía a partir de biomasa (Dresselhaus & Thomas, 2001). A los combustibles provenientes de biomasa, se les denomina biocombustibles y se clasifican con base al tipo de biomasa que se utiliza como materia prima. Los procesos biotecnológicos para la producción de biocombustibles se han desarrollado desde la primera mitad del siglo XX, sin embargo no han alcanzado su máximo desarrollo por la baja contribución a la demanda global. (Bridgwater, 2006).

1.3.- Biomasa y biocombustibles

La biomasa es materia orgánica compuesta primordialmente por carbono, hidrógeno y oxígeno. Existen diversas fuentes de biomasa a nivel global y local, (maíz, caña de azúcar, etc.). Recientemente, los residuos agrícolas y efluentes con características particulares, como el suero de leche, han llamado la atención debido a que su disposición final representa un problema ambiental (Petersen, 2008). Desarrollos más recientes se han enfocado en cultivos no convencionales como las micro y macro algas para la producción de biomasa (Patel et al., 2014). En específico, las fuentes de biomasa mencionadas han sido utilizadas para la producción de biocombustibles tanto líquidos como gaseosos.

Los biocombustibles de primera generación se refieren a los provenientes de biomasa de cultivos tradicionalmente empleados para la producción de alimentos y que, eventualmente, pueden obtenerse a través de procesos de fermentación. Los biocombustibles de segunda generación comprenden aquellos que provienen de materias primas que no son de fuentes alimenticias y se trata principalmente de residuos de cultivos, como la biomasa lignocelulósica proveniente del bagazo o cultivos de pastos de crecimiento rápido (biomass crops); la composición de estos es mucho más compleja, ya que la lignina es un polímero de difícil degradación biológica y forma una red que recubre la matriz de celulosa y, por consiguiente, se requieren pretratamientos agresivos de la biomasa para liberar el material fermentable (Balan & Balan, 2014).

El procesamiento de la biomasa proveniente de residuos agroindustriales presenta un cuello de botella ya que los pretratamientos necesarios para la hidrólisis pueden liberar compuestos que son potencialmente inhibidores (fenoles, furfural, etc.), además de los bajos rendimientos en cuanto a la solubilización de azúcares (Himmel et al., 2007). Los biocombustibles de tercera generación provienen de fuentes de biomasa no convencionales, cultivos energéticos especialmente diseñados y que no son destinados para fines alimenticios, estos cultivos son de crecimiento rápido y de alta densidad energética almacenada en sus componentes bioquímicos. Entre estos se encuentran las macro y microalgas que tienen una composición rica en azúcares fermentables, proteínas y lípidos.

Esta fuente de biomasa se considera otra alternativa ante el debate existente sobre la utilización de cultivos dedicados para la producción de combustibles provenientes de alimentos. La biomasa microalgal no presenta lignina en su estructura, por lo que los rendimientos de solubilización de materia orgánica son más altos y el potencial de producción de biocombustibles es sumamente alto (Posten & Schaub, 2009).

1.4.- Biomasa microalgal y potenciales aplicaciones

Las microalgas, al igual que las plantas, tienen un metabolismo fotosintético, por lo cual son un sumidero natural de CO₂. Además, su cultivo persigue diversos objetivos como: la producción de metabolitos de interés (por ejemplo, lípidos y pigmentos) o la generación de biomasa que pueda utilizarse como sustrato en la producción de biocombustibles (por ejemplo biogás mediante digestión anaerobia) (Maity et al., 2014). Las microalgas presentan ciertas ventajas en comparación con otras fuentes de biomasa, ya que fijan una mayor cantidad de CO₂ que las plantas y crecen mucho más rápido. En comparación con los cultivos destinados para los biocombustibles de primera generación, las microalgas no requieren grandes extensiones de suelo fértil ni grandes cantidades de agua para su cultivo, (Raja et al., 2008; J. Yang et al., 2011). El género *Scenedesmus* es uno de los que han sido ampliamente estudiados por su potencial para la producción de biodiesel, a partir de lípidos que se acumulan en su interior, esto bajo condiciones de limitación de nitrógeno; además, se caracteriza por su capacidad de crecer bajo condiciones ambientales extremas y de generar algunos pigmentos de interés (Mandal & Mallick, 2009; Toledo-Cervantes et al., 2013). Se ha reportado que la biomasa de *Scenedesmus* tiene la siguiente composición elemental: C₁₁₂H₁₉₄O₆₂N₁₀S y puede contener 30-40% de carbohidratos, 20-30% de proteínas y 17-25% de lípidos, siendo el porcentaje restante minerales y otros compuestos. (Ho et al., 2012; Z. Yang et al., 2011).

Con base a los componentes bioquímicos más abundantes en la biomasa microalgal, se han reportado las siguientes productividades específicas de metano para cada gramo de: proteínas 0.85 L CH₄/g sólidos volátiles (SV); lípidos, 1.01 L

CH₄/g SV; carbohidratos, 0.41 L CH₄/g SV (Sialve et al., 2009). Estos valores demuestran el potencial de la biomasa microalgal para la generación de biogás a través de procesos de digestión anaerobia. Este tema será abordado con mayor detalle en la sección 1.5.1.

Por otra parte, también se ha propuesto el uso de microalgas para la depuración de biogás proveniente de la digestión anaerobia de materia orgánica (Conde et al., 1993), lo que ha resultado ser una tecnología atractiva y competitiva comparada con sistemas convencionales para la depuración y comercialización del biogás proveniente de la digestión anaerobia.

1.4.1.-Sistemas de cultivo y concentración para microalgas

El crecimiento de las microalgas, depende, entre otras variables, de la cantidad de CO₂ suministrado y de la luz, por lo que los sistemas que se han diseñado para su cultivo buscan maximizar el crecimiento de biomasa incrementando la transferencia de CO₂ al medio y la superficie de contacto con la luz (Radmer & Ollinger, 1980). Las columnas de burbujeo son uno de los sistemas más eficientes para el cultivo de *Scenedesmus* ya que a porcentajes de CO₂ de 10%, una irradiación de 134 μmol/ m³ s y temperaturas de 30 °C se obtienen productividades de 0.18 toneladas/m³-año (Toledo-Cervantes et al., 2013). Por otro lado, existen sistemas de cultivo abiertos denominados estanques tipo raceway pond (RWP, raceway pond), que consisten en un recipiente que contiene la fase líquida a baja profundidad, se encuentra dividido en carriles de tal forma que un sistema de paletas motorizado hace circular el medio de cultivo continuamente evitando que la biomasa se sedimente. Los sistemas RWP son económicos y con bajos requerimientos de energía, sin embargo presentan productividades inferiores a las que se obtienen en los sistemas de cultivo cerrados, comúnmente se requieren grandes extensiones de cultivo y se operan bajo régimen de luz solar (Campo et al., 2007).

Una vez producida la biomasa microalgal, ésta debe concentrarse para poder ser procesada. Los mecanismos de concentración de biomasa consisten en disminuir considerablemente la cantidad de agua, por lo cual se ha utilizado el secado o el

centrifugado para este fin, así como la adición de floculantes para acelerar la sedimentación de la biomasa. Otros sistemas no convencionales han sido utilizados como los sistemas de flotación con aire disuelto (por sus siglas en Inglés DAF: Dissolved air flotation), los cuales han mostrado resultados positivos en la concentración de biomasa microalgal, sobre todo cuando se plantea su utilización a gran escala (Molina Grima et al., 2003).

1.5.-Digestión anaerobia

El metano es un gas que puede utilizarse directamente para su combustión o en cogeneradores de electricidad para la producción de energía. Este gas puede producirse mediante el proceso de digestión anaerobia el cual consiste en un proceso metabólico que llevan a cabo bacterias y arqueas a partir de la oxidación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno como aceptor de electrones (Nallathambi Gunaseelan, 1997). En la Figura 1 se pueden observar las diferentes etapas del proceso de digestión anaerobia, así como algunos de los microorganismos involucrados.

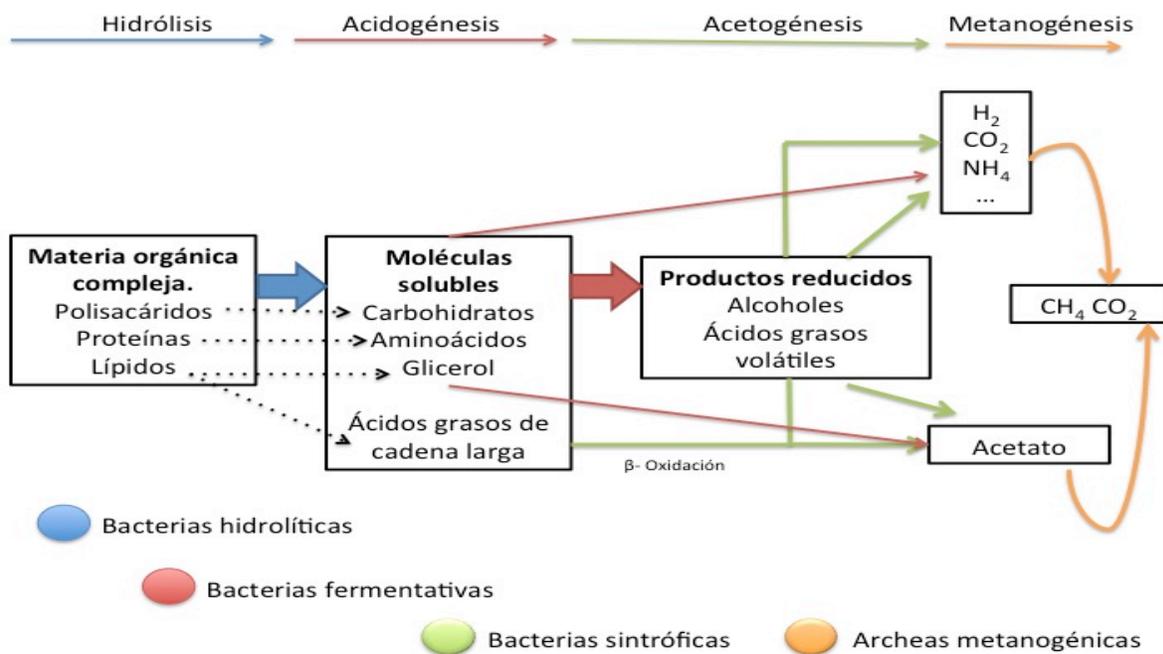


Figura 1.- Esquema de las etapas de la digestión anaerobia y los grupos de microorganismos involucrados de acuerdo con el color de las flechas. Modificado de Cabezas et al., 2015.

La primera etapa consiste en la hidrólisis de la materia orgánica en la que se generan compuestos orgánicos simples (carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos), siendo los microorganismos hidrolíticos los que llevan a cabo este proceso. Vale la pena mencionar que, cuando el sustrato es materia orgánica compleja o parcialmente soluble, esta etapa puede ser el paso limitante. Posteriormente, en la etapa de acidogénesis, otro grupo de microorganismos convierten la materia orgánica hidrolizada en ácidos grasos volátiles (AGV). Posterior a esto se encuentra la etapa de acetogénesis donde otro tipo de microorganismos generan acetato a partir de los AGV's de cadena larga ($C > 3$) producidos en la etapa previa, de igual manera puede generarse acetato por la ruta de homoacetogénesis utilizando H_2 y CO_2 (Ni et al., 2011). Finalmente, los microorganismos metanogénicos utilizan el H_2 y el CO_2 para producir metano mediante metanogénesis hidrogenotrófica y el acetato para producir metano mediante metanogénesis acetoclástica.

Los procesos de digestión anaerobia son ampliamente conocidos y se han optimizado las condiciones para la producción de metano: el pH que debe encontrarse entre 7-8 y una temperatura óptima de $37\text{ }^\circ\text{C}$ (Abdelgadir et al., 2014). Los microorganismos metanogénicos tienen una alta afinidad por el sustrato es decir, poseen un bajo K_s , por lo que generalmente la velocidad del proceso está gobernada por los fenómenos de difusión. Una estrategia que se ha seguido para aumentar la transferencia de masa es promover la agregación en gránulos que tienen una superficie de contacto mayor (Nishio & Nakashimada, 2007). El lodo granular es ampliamente utilizado en digestores anaerobios por su alta velocidad de sedimentación, además de ser una fuente diversa de microorganismos, ya que en estos microambientes coexisten bacterias fermentativas, anaerobias estrictas o facultativas, enterobacterias, microorganismos metanogénicos, etc. (Díaz et al., 2006). En resumen, la metanogénesis es un proceso en el cual un porcentaje de la materia orgánica es transformada hasta la forma más reducida de carbono, el CH_4 , y otro porcentaje a la forma más oxidada de carbono, el CO_2 . De manera general, el 72% del metano que se produce es por la vía acetoclástica y sólo el 28% se produce por la ruta hidrogenotrófica (Demirel y Scherer, 2008).

1.5.1.-Digestión anaerobia de biomasa microalgal y pre-tratamientos

Recientemente se ha estudiado la digestión anaerobia en lote de la biomasa microalgal del género *Scenedesmus* y se han reportado eficiencias de degradación de 53%, así como rendimientos de producción de metano en el intervalo de 153-320 mL CH₄/g de demanda química de oxígeno (DQO). Dado que el proceso de digestión generalmente es lento, las tasas volumétricas reportadas para la producción de metano usando biomasa microalgal son bajas, en un rango de 15 hasta 60 mL CH₄/L-d (González-Fernández et al., 2012; Mendez et al., 2014; Ramos-Suárez et al., 2014). Diversos trabajos han mostrado que la biomasa microalgal es biodegradable. Sin embargo, el proceso es lento debido a la estructura de la pared celular de las microalgas, la cual está compuesta por celulosa, un material de muy lenta degradación que debe romperse para la liberación del contenido intracelular (Aguirre & Bassi, 2013; Takeda, 1996). Con la finalidad de acelerar la transformación de la biomasa microalgal a metano, se han estudiado diversos pre-tratamientos para el rompimiento y desintegración de la pared celular. De esta manera se pretende aumentar la disponibilidad de la materia orgánica soluble. Los pre-tratamientos más estudiados son los físicos, como el térmico, procesos hidrotérmicos y microondas, ó mecánicos como los homogenizadores o las perlas de disrupción. Por otro lado, se encuentran los pre-tratamientos químicos, o biológicos mediante la adición de enzimas. En la Tabla 1 se muestran diversos tratamientos térmicos para la solubilización de materia orgánica en función de DQO soluble. Claramente se observa que los tratamientos térmicos son capaces de solubilizar hasta 23% del contenido de materia orgánica total de la biomasa microalgal, estos tratamientos han presentado una mayor eficiencia en comparación con tratamientos como el calentamiento por microondas o la sonicación, pero sobretodo son económicos y no requieren altas inversiones energéticas (Ward et al., 2014).

Tabla 1.- Comparación entre diferentes condiciones de tratamiento térmico (temperatura y tiempo de exposición) en la solubilización de biomasa microalgal de *Scenedesmus*.

Condiciones de pretratamiento			Respuesta		
Biomasa (g DQOt/L)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	DQOs (mg DQO/L)	Solubilización (%)	Referencia
8	70	0.5	590	7	González-Fernández et al., 2012
8	80		680	9	
14	90	3	990	7	González-Fernández et al., 2013
18	100	8	3600	20	Yang et al., 2010
2.5	120	0.5	500	23	Miranda et al., 2012

DQOt= DQO total; DQOs=DQO soluble

1.5.1.1.- Sistemas de producción de metano usando biomasa microalgal

La producción de metano usando biomasa microalgal ha sido estudiada tanto en sistemas en lote, como en sistemas en continuo (Tabla 2). En los procesos en lote los resultados más alentadores se han obtenido usando cultivos mixtos de microalgas y tratamientos físicos para la solubilización de materia orgánica. Pocos trabajos se acercan al rendimiento teórico (385 mL CH₄/g DQO) como se muestra en la Tabla 2. Alzate et al., (2012) reportaron un rendimiento de 306 mL CH₄/g DQO. Las variaciones en los rendimientos y velocidades de producción de biogás dependen de las características de la biomasa, pero sobretodo del pre-tratamiento que se aplica a la misma. Los procesos de producción en continuo de metano utilizando biomasa microalgal han sido poco estudiados. Generalmente se han utilizado tiempos de retención hidráulica (TRH) largos, desde 5 hasta 30 días. En estudios previos se ha reportado una disminución en los rendimientos desde 340 hasta 220 mL CH₄/g DQO al aumentar la velocidad de carga orgánica (VCO) de 3 a 9 g DQO/L-d respectivamente. Sin embargo, en la mayoría de los estudios la velocidad volumétrica de producción de metano (VVPM) aumenta en función del aumento de la VCO, al pasar de 0.4 L CH₄/L-d a una VCO de 2 g DQO/L-d a 1.1 L CH₄/L-d para una VCO de 5 g DQO/L-d (Ramos-Suárez et al., 2014). En cuanto a las eficiencias de remoción de SV y DQO, se encuentran en el rango de 20-68% y dependen tanto del TRH como del pre-tratamiento que se aplica a la biomasa

microalgal. Una de las ventajas que presenta el utilizar biomasa microalgal para la producción de biogás es el alto contenido de metano, el cual puede alcanzar hasta 80% (Frigon et al., 2013; Schwede et al., 2013). Los sistemas más utilizados para la producción en régimen semi-continuo son los reactores de tanque agitado, esto con la finalidad de favorecer la transferencia de masa y promover una mayor disponibilidad del sustrato para los microorganismos (González-Fernández et al., 2013). La biomasa microalgal, al ser un sustrato con alto contenido proteico, podría presentar inhibición por amonio en procesos de digestión anaerobia. Sin embargo, para el caso específico de *Scenedesmus*, las concentraciones de amonio no logran ser inhibitorias incluso para VCO de 10 g DQO/L-d (Tran et al., 2014). Se han reportado concentraciones de amonio en intervalos de 800 hasta 1400 mg/L, aunque las concentraciones inhibitorias para procesos de digestión anaerobia son alrededor de 6 g/L (Sung & Liu, 2003).

Tabla 2.- Resumen de los estudios de digestión anaerobia reportados en la literatura para microalgas verdes en sistemas en lote y semi-continuo.

Tipo de reactor	Microalga y tratamiento	Concentración de sustrato (g DQO/L)	TRH (días)	VCO (g DQO/L-d)	WPM (L CH ₄ /L-d)	Rendimiento (mL CH ₄ /g DQO)	Remoción de Sólidos (%)	Referencia
Lote	Mezcla/NR*	12.9	-	-	-	306.6	68	Alzate et al., 2012
Lote	Mezcla/Térmico	7.39	-	-	-	104	NR	Passos et al., 2015
Lote	<i>Scenedesmus</i> /Térmico	1.54	-	-	-	201	53.3	Mendez et al., 2014
Lote	<i>Scenedesmus</i> /Térmico	1	-	-	-	160	NR	González-Fernández et al., 2012
Lote	Mezcla/microondas	2.87	-	-	-	98	NR	Passos et al., 2015
Lote	Mezcla/Ultrasonido	2.79	-	-	-	88.13	NR	Passos et al., 2015
Semi-continuo	<i>Scenedesmus</i> sp.	13.12	16	0.82	NR	245	50	Tartakovsky et al., 2013
Semi-continuo	<i>Scenedesmus</i> /Térmico	23	23	1	NR	84	23	González-Fernández et al., 2012
Semi-continuo	<i>Scenedesmus</i> /NR	102	30	3.4	0.52	170	NR	Tran et al., 2014

*NR: No reportado

1.6.- Producción fermentativa de hidrógeno a partir de biomasa microalgal.

El hidrógeno es una alternativa energética renovable que puede producirse por diversos métodos. Sin embargo, el proceso fermentativo llevado a cabo por bacterias anaerobias estrictas (*Clostridium*) o facultativas (Enterobacterias) es potencialmente uno de los más importantes debido al uso de biomasa como sustrato (Meher Kotay & Das, 2008). El hidrógeno puede producirse a través de la fermentación acético-butírica de carbohidratos, por lo que la biomasa microalgal representa un sustrato atractivo para el proceso, después de un pre-tratamiento adecuado para la liberación de materia orgánica. Existen diversos trabajos donde se evalúa el potencial de la biomasa de *Scenedesmus* para producir hidrógeno. Los tratamientos utilizados para liberar los carbohidratos de la biomasa microalgal son variables, y aún no se ha logrado optimizar el proceso de solubilización de carbohidratos. En cuanto a los rendimientos de producción de hidrógeno, se encuentran en un intervalo de 65 a 147 mL H₂/g DQO (Batista et al., 2014; Ortigueira et al., 2015). Lui et al., (2012) al igual que Batista et al., (2014) estudiaron la producción fermentativa de hidrógeno usando como sustrato biomasa microalgal rica en carbohidratos y cepas de *Clostridium butyricum* y *Enterobacter aerogenes* como inóculo, obteniendo tasas volumétricas de producción de hidrógeno de 246 mL/L-h, superiores a lo descrito por otros autores. Davila-Vazquez et al., (2008) reporta tasas de producción de hidrógeno de 180 mL/L-h usando suero de leche como sustrato.

1.7.-Justificación

Debido a los problemas causados por la sobreexplotación de los combustibles fósiles y las emisiones de CO₂, es imprescindible la implementación de sistemas eficientes para la captura de CO₂ como lo es la producción de biomasa microalgal y el desarrollo de alternativas sostenibles de generación de energía, como los biocombustibles. Actualmente la utilización de microalgas ha generado especial atención debido a sus potenciales aplicaciones en la generación de metabolitos de interés industrial, pero también como sustrato en la producción biológica de energía en forma de metano y/o biohidrógeno. Particularmente, la degradación

anaerobia de biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* ha sido poco estudiada y no se han optimizado las condiciones para la producción de biogás. Por lo cual, establecer pre-tratamientos eficientes para aumentar el potencial de dicha microalga para la producción de biogás por medio de la digestión anaerobia, tanto en sistemas en lote como en semi-continuo, es un punto clave para el acoplamiento de procesos de producción de biomasa microalgal y procesos de digestión anaerobia, lo cual conlleva una recuperación integral de la energía contenida en la biomasa microalgal, por medio del concepto de biorefinería. Los altos TRH reportados en los sistemas de producción de biogás a partir de la biomasa microalgal, hace necesaria una investigación a detalle sobre el proceso de pre-tratamiento a la biomasa microalgal y sobre las condiciones operacionales de los reactores para maximizar la productividad de metano. En el caso de la producción de hidrógeno es importante realizar una exploración del potencial de los carbohidratos contenidos en la biomasa de *S. obtusiusculus* para su utilización en el proceso de fermentación oscura.

2.- Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Si se logran solubilizar los componentes celulares de *S. obtusiusculus*, entonces esta microalga puede ser una fuente de biomasa para la producción de combustibles gaseosos como el metano o el hidrógeno.

Si el pre-tratamiento térmico para liberar la materia orgánica celular de *S. obtusiusculus* es el adecuado, entonces se espera un aumento en la velocidad y rendimientos de producción de metano en experimentos en lote, en comparación con la biomasa sin pre-tratamiento.

Dado que un reactor de tanque agitado permite la operación a tiempos de retención hidráulica bajos, y como consecuencia altas velocidades de carga orgánica, además de promover un mezclado eficiente, entonces se espera

aumentar considerablemente la velocidad volumétrica de producción de metano con respecto a lo que ha sido descrito en la literatura en modo semi-continuo.

Objetivo general

Producir metano e hidrógeno a partir de biomasa seca de *S. obtusiusculus*.

Objetivos específicos

Caracterizar la biomasa microalgal seca de *S. obtusiusculus* en términos de DQO, carbohidratos, proteínas y lípidos.

Determinar la mejor condición de pretratamiento térmico con base en la temperatura y tiempo de exposición para la solubilización de materia orgánica de biomasa seca de *S. obtusiusculus*.

Producir metano a partir de biomasa microalgal seca de *S. obtusiusculus* en experimentos en lote, con la finalidad de evaluar el efecto del tratamiento térmico y la concentración de sustrato.

Producir metano a partir de biomasa microalgal seca de *S. obtusiusculus* en un sistema semi-continuo para evaluar el efecto de la velocidad de carga orgánica y el tiempo de residencia hidráulica.

Determinar el uso potencial de la biomasa seca de *S. obtusiusculus* para la producción de biohidrógeno en experimentos en lote.

3.- Materiales y métodos

3.1.- Microalga: *Scenedesmus obtusiusculus*

La microalga que se utilizó en este trabajo es *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM que fue aislada, identificada y caracterizada por el grupo de investigación de

la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa (UAM-C) de una poza ubicada en Churince, Cuatro Ciénegas Coahuila (Toledo-Cervantes et al., 2013).

3.2.- Sistemas de cultivo raceway pond (RWP) y columnas de burbujeo

Medio de cultivo. Se usó un medio mineral sintético BG11 que contiene (g/L): 1.5 NaNO₃, 0.004 K₂HPO₄ · 3H₂O, 0.075 Mg SO₄, 0.001 EDTA, 0.036 CaCl₂ · 2H₂O, 0.006 ácido cítrico, 0.006 Citrato de amonio Férrico, 0.02 Na₂CO₃, además de 1 mL/L de una solución de metales traza que contiene (mg/L): H₃BO₃, 2.86; MnCl₂·4H₂O, 1.81; ZnSO₄·7H₂O, 0.222; NaMoO₄·2H₂O, 0.39; CuSO₄·5H₂O, 0.079; Co(NO₃)₂·6H₂O, 0.494.

La propagación de la microalga se llevó a cabo dentro de un invernadero ubicado en la azotea de la UAM-C. Los sistemas operaron 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 para el caso de las columnas de burbujeo, en el caso de los RWP, únicamente se burbujeó aire pero no se determinó el flujo. La biomasa producida en las columnas de burbujeo fue utilizada para la inoculación de los estanques tipo *raceway*

Columnas de burbujeo. Se utilizaron 2 columnas de burbujeo de acrílico en un volumen efectivo de 24 L (diámetro interno de 14.3 cm, altura de 172.6 cm), un aspersor de aire colocado en la parte inferior de la columna y una válvula de purga y muestreo en el fondo. Las columnas se operaron en lote para generar biomasa y poder inocular los estanques tipo RWP.

Estanques tipo raceway. Se utilizaron dos estanques contruidos de fibra de vidrio con un volumen de operación de 100 L cada uno. En la Figura 2, se muestra la configuración de ambos sistemas de cultivo. La agitación se realizó a 15 rpm con un sistema de paletas motorizado y aspersores tipo cortina de burbujeo para introducir el aire dentro del líquido.

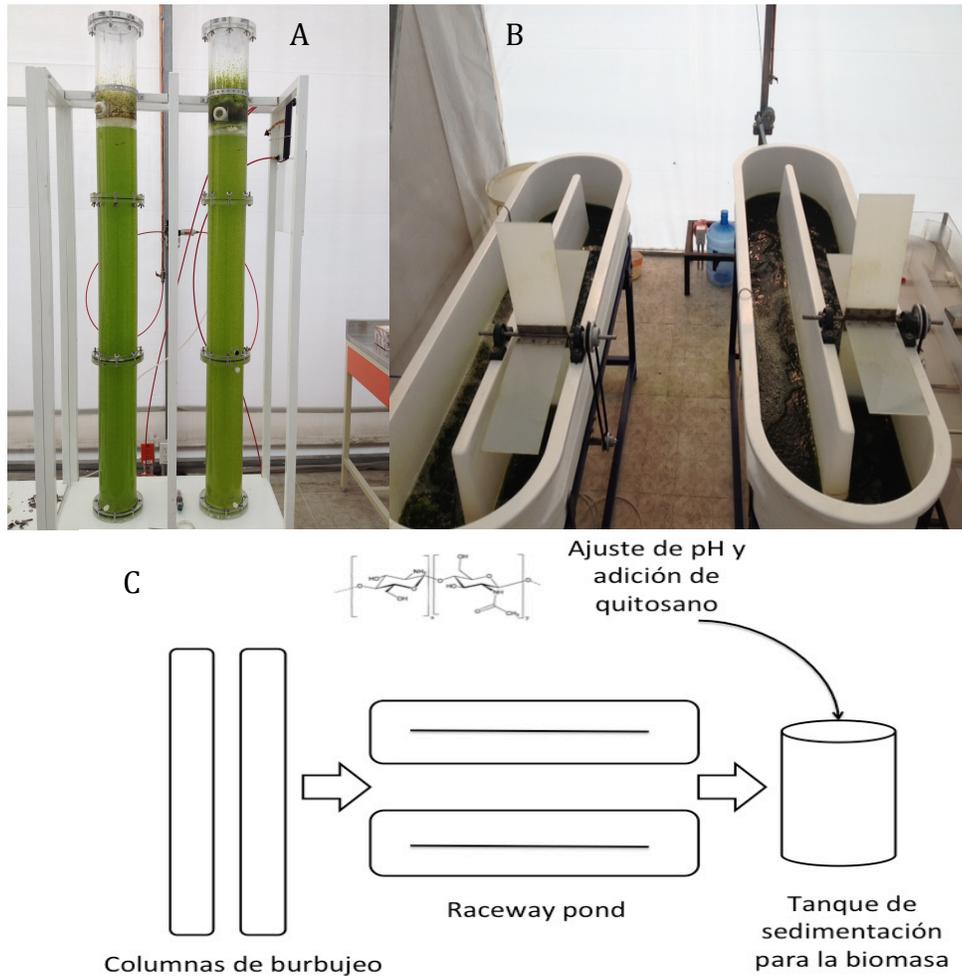


Figura 2.- Sistemas para el cultivo de *S. obtusiusculus*; A: Columnas de burbujeo y B: sistemas raceway pond, C: esquema de producción de biomasa.

En estos sistemas se hizo el seguimiento del consumo de nitratos para determinar las condiciones de crecimiento (limitación o suficiencia de nutrientes) de igual manera se dio seguimiento al crecimiento de biomasa mediante la medición de sólidos totales.

Al terminar la operación del sistema, la biomasa se transfirió a un tanque contenedor donde se agregaron 50 mg/L de quitosano como floculante, se ajustó el pH a 7 y se dejó sedimentar por 12 horas. Posteriormente el concentrado de biomasa de ambos RWP se centrifugó a 4000 rpm y se secó por 3 días a 60 °C. Por último, la biomasa se homogenizó triturándola y tamizándola en un tamaño de malla de 500 μm . Se utilizó la ecuación 3 de la sección 3.6 para determinar la productividad máxima de biomasa.

3.3.- Caracterización de la biomasa microalgal

La caracterización de la biomasa microalgal se llevó a cabo utilizando muestras de biomasa seca obtenidas con el procedimiento anteriormente descrito. Los análisis se describen a continuación.

3.3.1.-Determinación de carbohidratos

La determinación se llevó a cabo utilizando 50 mg de biomasa seca mediante una hidrólisis ácida en H_2SO_4 2 N a 70 °C por 2 horas, esto con la finalidad de hidrolizar todos los carbohidratos. Posteriormente, la muestra se centrifugó y a partir del sobrenadante se realizó la determinación de carbohidratos totales por el método fenol-sulfúrico (DuBois et al., 1956).

3.3.2.-Determinación de proteínas

El contenido de proteínas se determinó utilizando 50 mg de biomasa seca mediante una hidrólisis en NaOH 0.5M en un baño ultrasónico durante 20 min. La muestra hidrolizada se centrifugó y se determinó el contenido proteico del sobrenadante por el método de Lowry et al., 1951.

3.3.3.-Determinación de lípidos neutros.

Los lípidos se cuantificaron utilizando tinciones por rojo de Nilo. Un mg de biomasa seca se resuspendió en agua desionizada para adicionar una solución de Dimetil sulfóxido (DMSO), la cual permite que el colorante rojo de Nilo (banda de excitación a 485 nm y de emisión a 525 nm) permee la membrana celular mediante el uso de microondas. La cuantificación se realizó utilizando un fluorómetro (Turner Desings Instruments, modelo 7200-000, Sunnyvale CA, USA). Para obtener la concentración de lípidos se utilizó una curva estándar que se obtuvo de extracciones por Soxhlet de biomasa seca de *S. obtusiusculus* comparada con Unidades relativas de fluorescencia (URF) de la biomasa obtenidas por las tinciones con rojo de Nilo sin realizar extracciones de lípidos (Chen et al., 2011).

3.4.- Tratamiento térmico

3.4.1.-Diseño central compuesto

Se utilizó el programa DesignExpert para realizar las combinaciones entre los factores que se evaluaron en este trabajo (temperatura y tiempo de exposición) por medio de un diseño central compuesto (CCD, por sus siglas en inglés: Central Composite Design). Para realizar el diseño, se propuso un punto mayor: 90°C durante 10h y un punto menor: 50°C durante 2h, este rango fue definido de acuerdo al trabajo de Passos et al., 2015. El programa arrojó una serie de combinaciones que se muestran en la Tabla 3. Para evaluar el efecto del tratamiento térmico en la solubilización de materia orgánica, se utilizó biomasa microalgal seca en tubos HACH y se ajustó a una concentración de 1 g DQO total (DQOt)/L en un volumen efectivo de 5 mL de agua destilada para cada combinación, se utilizó una estufa para controlar la temperatura de cada experimento en condiciones estáticas. Transcurrido el tiempo de exposición de cada experimento, las muestras inmediatamente fueron analizadas en términos de DQO soluble (DQOs, muestra centrifugada) y por el método de DuBois et al., 1956 para determinar los carbohidratos en la fracción soluble.

Tabla 3.- Combinaciones de temperatura y tiempo generadas por el CCD para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de exposición para la solubilización de DQO y carbohidratos.

Ensayo	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
1	90	2
2	98	6
3	41	6
4	70	6
5	70	11
6	50	10
7	50	2
8	70	6
9	70	0.3
10	70	6
11	70	6
12	90	10
13	70	6

Se determinó además la eficiencia de solubilización para los experimentos mediante la ecuación 2:

$$\%Solubilizacion = \frac{DQOs-DQOso}{DQOt} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

DQOs; Demanda química de oxígeno soluble después del pretratamiento.

DQOso; Demanda química de oxígeno soluble antes del pretratamiento.

DQOt; Demanda química de oxígeno total (1 g/L).

Finalmente se ajustaron las variables de respuesta empleadas (DQO y concentración de carbohidratos solubles) empleando un modelo polinomial de la forma $z = Ax^2 + By^2 + Cx + Dy + Exy + F$ (2) para generar superficies de respuesta.

3.4.2.-Tratamiento térmico para distintas concentraciones de biomasa

Posterior a determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de exposición, se seleccionaron las condiciones que generaron una mayor solubilización de materia orgánica. Esto con el objetivo de evaluar el comportamiento de la eficiencia de solubilización al realizar ese mismo tratamiento en una cantidad mayor de biomasa. La estrategia fue ajustar en tubos HACH concentraciones de 3, 6 y 10 g DQOt/L de biomasa microalgal seca en 5 mL de agua destilada. La eficiencia de solubilización fue calculada como se mencionó en la sección anterior.

3.5.- Inóculo para la digestión anaerobia y fermentación oscura.

Para los experimentos de metanogénesis se utilizó lodo granular anaerobio de un reactor UASB a nivel industrial que trata vinazas tequileras (Casa Herradura, Jalisco México), el cual tenía las siguientes características: 27.50 g sólidos suspendidos totales (SST)/L, 23.75 g sólidos suspendidos volátiles (SSV)/L, así como una actividad acetoclástica de 0.1525 g DQO-CH₄/g SSV-d. El mismo lodo fue utilizado para la producción de hidrógeno, el cual fue sujeto a un tratamiento térmico (90 °C durante 45 min) después de disgregar los gránulos a 500 μm, esto con la finalidad de eliminar a los microorganismos consumidores de hidrógeno.

3.6.- Producción de metano en lote

Los experimentos en lote se llevaron a cabo en botellas serológicas de 120 mL, en un volumen de trabajo de 80 mL y un espacio de cabeza de 40 mL. Se exploraron distintas concentraciones de sustrato usando la biomasa microalgal tratada térmicamente con una concentración de inóculo de 2 g SSV/L, de esta manera se determinó el efecto de la concentración de sustrato en la digestión anaerobia de la biomasa microalgal. Por otro lado, se montó un experimento control con biomasa microalgal seca sin pre-tratamiento para determinar el efecto del tratamiento térmico. En la Tabla 4 se muestra la secuencia de experimentos. La composición del medio mineral usado fue (g/L): 0.25 K₂HPO₄, 0.28 NH₄Cl, 0.83 MgCl₂ 6H₂O, 0.01 CaCl₂ 2H₂O, 2.5 NaHCO₃. Se realizó un intercambio de atmósfera mediante el burbujeo de una mezcla de CO₂/N₂ en las botellas durante 30 segundos. Se controló la temperatura a 37 °C y el pH inicial fue 7, las botellas se mantuvieron en agitación a 180 rpm (Arreola-Vargas et al., 2015). Los perfiles de producción de metano se ajustaron al modelo modificado de Gompertz presentado en la ecuación 3:

$$H(t) = H_{max} * \exp \{-\exp [R/H_{max}(\lambda - t) + 1]\} \quad (3)$$

donde:

H (t): la producción acumulada de CH₄/H₂ o biomasa en el tiempo t (mL ó g ST).

H_{max}: la producción máxima acumulada de CH₄/H₂ o biomasa (mL ó g ST).

R: la velocidad de producción de CH₄/H₂ o biomasa (mL/h ó g ST/día).

λ: el tiempo de retardo (h).

Tabla 4.-Experimentos de producción de biogás en lote utilizando biomasa microalgal como sustrato. En todos los ensayos se usó una concentración de inóculo de 2 g SSV/L

Ensayo	Tratamiento	Sustrato (g DQOt/L)	F/M
Actividad endógena	Sin tratamiento	-	-
F/M1	Sin tratamiento	2	1
F/M 0.5T	Térmico	1	0.5
F/M 1T	Térmico	2	1
F/M 2.5T	Térmico	5	2.5
F/M 5T	Térmico	10	5

3.7.- Producción de hidrógeno en lote

La producción de hidrógeno en lote se realizó por triplicado en botellas serológicas de 120 mL con un volumen efectivo de 80 mL, el procedimiento de intercambio de atmósfera fue el mismo descrito para los experimentos de digestión anaerobia. Se utilizó un medio mineral sintético modificado de Davila-Vazquez et al., 2008 (mg/L): 75 ZnCl₂; 125 K₂HPO₄; 100 MgCl₂ 6H₂O, 10.77 MnCl₂ 4H₂O, 25.97 FeCl₃ 6H₂O; 3.41 CuCl₂ 2H₂O, 101.25 NiCl₂ 6H₂O, 5950 Na₂HPO₄, 4500 NH₄H₂PO₄. Como sustrato se empleó una concentración de 20 g DQOt/L de biomasa microalgal seca sin tratamiento. Las botellas se inocularon con 10 g SSV/L de lodo tratado térmicamente. Se implementaron dos experimentos control: el positivo con 20 g glucosa/L y el negativo sin ninguna fuente de carbono (control sustrato endógeno).

3.8.-Producción de metano en semi-continuo

La producción de metano en semi-continuo se llevó a cabo en un reactor de tanque agitado (STR por sus siglas en Inglés: stirred tank reactor) Applikon, modelo Z310210011, equipado con una chaqueta térmica y sensores de pH, temperatura, potencial oxido-reducción y un software integrado que se utilizó para el control de los parámetros del proceso. El reactor tiene un volumen total de 1.5 L y el experimento se llevó a cabo en un volumen efectivo de 0.8 L. El reactor fue inoculado con 10 g SSV/L de lodo granular y para evaluar distintas VCO (1, 3, 6, 8 y 10 g DQOt/L-d) se alimentó con la biomasa microalgal tratada térmicamente usando tanto el sobrenadante como la fracción insoluble. Se realizaron lotes de biomasa tratada y la concentración de DQOt en la alimentación fue ajustada para las cargas orgánicas propuestas. Se evaluaron dos TRH (3 y 1 días), el pH se controló en 7.5 y la temperatura se mantuvo a 35 °C,. La agitación en el reactor se mantuvo a 180 rpm y el potencial oxido-reducción se midió en línea. La estrategia de alimentación fue la siguiente: para el TRH inicial de 3 días se estableció un recambio de la mitad del volumen efectivo cada 1.5 días, este TRH se mantuvo por un periodo de 10 días, posteriormente el TRH de 1 día fue utilizado durante el

resto de la operación (40 días). El recambio para el TRH de 1 día se realizó cada 12 horas. En la Figura 3 se muestra una fotografía de la configuración del reactor.



Figura 3.- Fotografía del reactor tanque agitado utilizado para la producción de biogás con biomasa microalgal tratada térmicamente en régimen semi-continuo.

3.9.- Métodos analíticos.

La producción de biogás se midió mediante un dispositivo de registro de gas por desplazamiento de líquido (modelo U.V.R.G, SEV, Puebla, México). La concentración de metano e hidrógeno se determinó 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, la temperatura del puerto de inyección, horno y detector fueron de 250 °C, 60 °C y 250 °C, respectivamente. Todas las mediciones de gas son reportadas a condiciones estándar (273.15 K y 1 atm). Se extrajo diariamente una muestra del efluente del reactor y se determinaron también las concentraciones de DQOs, DQOt, sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos volátiles (SST) por métodos estándar (APHA, 1981). Las concentraciones de AGV se determinaron mediante un equipo de electroforesis capilar (Agilent 1600A, Waldbronn, Germany) con un buffer aniónico básico (Agilent pH 12.1) y una columna capilar

de sílice (Agilent, id = 50 mm, L = 80.5 cm, longitud efectiva = 72 cm). La temperatura y el voltaje fueron de 20 °C y -30 Kv, respectivamente. Las muestras se inyectaron a una presión de 300 mbar por 6 s.

Los balances de DQO fueron realizados con la ecuación 4.

$$DQO_t = DQO_{\text{metano}} + DQO_{\text{AGV}} + DQO_{\text{s indeterminada}} + DQO_{\text{crecimiento}} + DQO_{\text{particulada}} \quad (4)$$

3.10.- Microscopía electrónica de barrido

Muestras de la biomasa tratada térmicamente fueron fijadas en un pin de acero inoxidable sin ningún material de recubrimiento, con la finalidad de observar la estructura de las microalgas empleando un microscopio electrónico de barrido ambiental (SEM, por sus siglas en Inglés; Scanning Electron microscopy) Quanta 250 FEG-FEI, en condiciones de bajo vacío (130 pascales), ubicado en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), asociado a la División de Materiales Avanzados del IPICYT.

4.-Resultados y discusión

4.1.-Cultivo y caracterización de *S. obtusiusculus*

El pre-inóculo para las columnas de burbujeo tenía una concentración de 19 g ST/L y estos sistemas operaron por 5 días en lote con productividades de 0.037 toneladas/año-m³. Los sistemas RWP operaron en lote durante 13 días y las productividades fueron de 1.9 x 10⁻⁴ toneladas/año-m³. En la Figura 4 se pueden observar las cinéticas de crecimiento de ambos sistemas. La temperatura dentro del invernadero presentó fluctuaciones importantes (10 hasta 48 °C) con relación con la temperatura ambiente fuera del invernadero (10 hasta 32 °C). Las temperaturas más altas fueron registradas durante el día y las más bajas durante la noche. Estos cambios abruptos en los sistemas pueden explicar las bajas productividades obtenidas en comparación con otros reportes, los cuales han

logrado obtener productividades en sistemas abiertos de hasta 0.1 toneladas/año- m^3 utilizando otras microalgas (Campo et al., 2007; Rodolfi et al., 2009).

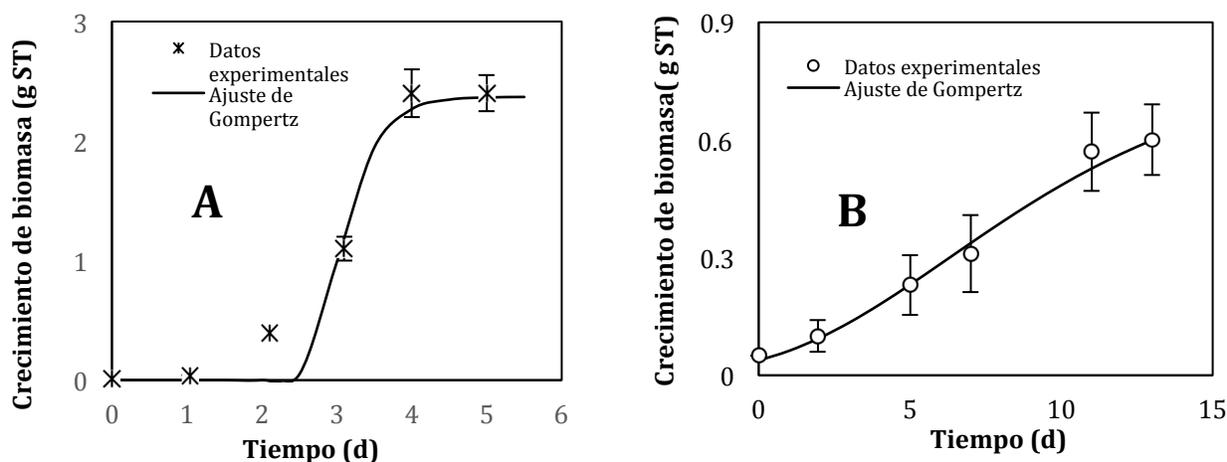


Figura 4.- Cinéticas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* en columnas de burbujeo (A, $R < 0.8$) y sistemas RWP (B, $R = 0.98$). Las líneas verticales representan la desviación estándar.

Las columnas de burbujeo presentaron un consumo de nitratos del 90%, mientras que en el caso de los sistemas RWP el consumo fue de 75%. Al final de la operación de los sistemas RWP y de la recuperación de la biomasa, se obtuvo un lote final de 200 g de biomasa seca, la cual presentó una DQOt de 1.29 g/g ST. Al resuspender la biomasa seca en agua desionizada se determinó una DQOs del orden de 50 mg/g biomasa seca. En cuanto a la determinación de los componentes bioquímicos de la biomasa microalgal, se obtuvieron las siguientes proporciones: $45 \pm 9\%$ de carbohidratos, $11 \pm 2\%$ de lípidos neutros, $22 \pm 6\%$ de proteínas, el porcentaje restante es atribuido a lípidos polares y cenizas.

4.2.-Tratamiento térmico.

El diseño central compuesto para el pretratamiento de la biomasa microalgal arrojó 13 ensayos a diferentes condiciones de tiempo y temperatura. Los resultados se presentan en la Tabla 5. La condición de tratamiento 2 fue la que presentó la mayor eficiencia de solubilización tanto en DQO como en carbohidratos: a una

temperatura de tratamiento de 98°C durante 6 horas se obtuvo 29% de solubilización en DQO y una concentración de carbohidratos de 74.1 mg/L. Estos resultados indican que a la temperatura de 98 °C podría existir un efecto positivo de la presión de vapor en el rompimiento de la pared celular, y por consecuencia en la liberación del material intracelular.

Tabla 5.- Concentraciones de DQOs y carbohidratos obtenidos del diseño experimental para el tratamiento térmico y variables de respuesta observadas después de los experimentos.

Ensayo	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	DQO soluble (mg DQOs/L)	Carbohidratos (mg/L)
1	90	2	122.25	43.59
2	98	6	298.50	74.10
3	41	6	149.75	31.47
4	70	6	73.50	27.51
5	70	11	146.00	38.43
6	50	10	107.25	42.51
7	50	2	94.75	32.71
8	70	6	76.00	42.14
9	70	0.3	<50	<30
10	70	6	96.00	44.00
11	70	6	88.50	40.70
12	90	10	197.25	47.61
13	70	6	53.50	35.03

Es claro que el tratamiento térmico por si sólo no es capaz de liberar todo el contenido de carbohidratos en la microalga utilizada ya que la microalga posee un 45 % de carbohidratos totales. Sin embargo, otros tratamientos físicos como microondas o la sonicación tampoco son capaces de aumentar la solubilización de carbohidratos, ya que generalmente se reportan eficiencias de solubilización en un intervalo de 10-25%, incluso la mayoría de los reportes no indican la solubilización de carbohidratos (Passos et al., 2015).

De acuerdo a la literatura, las hidrólisis químicas (ácidas o alcalina) o biológicas (enzimática) pueden solubilizar hasta 50% de los carbohidratos totales contenidos en la biomasa microalgal después de 4 horas de tratamiento. Yang et al., (2010), reportaron que la utilización de NaOH, en combinación con temperaturas de hasta 100 °C, logra una solubilización de 40% de los carbohidratos totales contenidos en

la biomasa microalgal. Sin embargo una de las limitaciones de utilizar tratamientos químicos son los altos costos y potenciales inhibidores que pueden formarse durante el proceso (González-Fernández et al., 2012; Miranda et al., 2012).

En cuanto a las superficies de respuesta generadas por el CCD, se observa un comportamiento tipo valle, tal como se muestra en la Figura 5, tanto para la concentración de DQOs como para los carbohidratos, lo cual indica que a temperaturas de 70 °C existe un efecto negativo en la solubilización, esto podría deberse a que la temperatura promueve reacciones de polimerización que ocurren entre los componentes de la microalga formando sólidos insolubles. La formación de estos sólidos se ve favorecida, muy probablemente por la formación de gradientes de temperatura generados en los aglomerados de biomasa, consecuencia de las condiciones estáticas en el tratamiento (Sumaya-Martinez et al., 2005), este efecto se observa sobretodo en tiempos de exposición cortos. En los experimentos del CCD no se logró definir un tratamiento óptimo, sin embargo se pudo observar una tendencia al aumento en la concentración de DQO soluble y como carbohidratos a partir de temperaturas superiores a 90 °C.

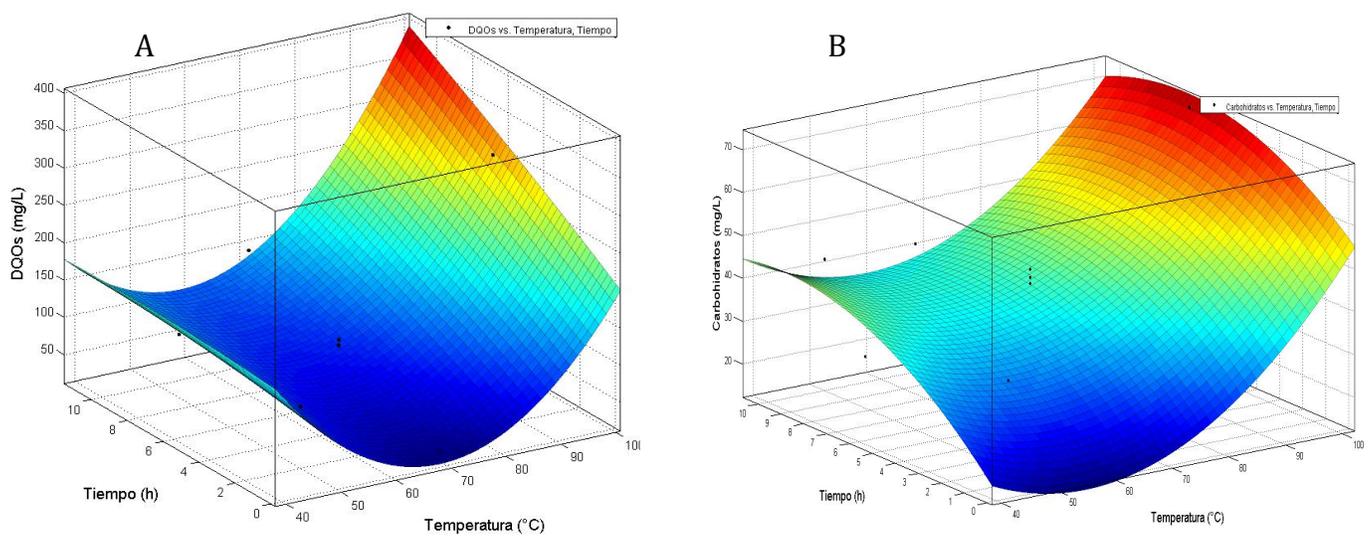


Figura 5.-Superficie de respuesta generada por el diseño central compuesto para la solubilización de DQO (A) y carbohidratos (B). DQO soluble. ■ menor concentración ■ mayor concentración

Para la solubilización de DQO la ecuación del modelo fue:

$$Z= 0.17X^2 - 0.44Y^2 + 0.18XY - 23x + 1.8Y + 776.6 \quad (5)$$

Donde:

Z: la respuesta, concentración de DQOs

X: la temperatura

Y: el tiempo de exposición.

Para la solubilización de carbohidratos la ecuación del modelo fue:

$$Z=0.01X^2 - 0.09Y^2 - 0.018XY - 1.76X + 3.02Y + 72.07 \quad (6)$$

Donde:

Z: la respuesta, concentración de carbohidratos

X: la temperatura

Y: el tiempo de exposición

El valor de R^2 fue de 0.93 para el caso de la solubilización de DQO, y de 0.87 para la solubilización de carbohidratos. Ambos modelos fueron significativos con un valor de $P < 0.05$.

Por medio de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (Figura 6), se puede realizar, de manera visual, una comparación entre la microalga integra antes del pretratamiento con imágenes después del colapso de la pared celular por efecto del tratamiento térmico. Es claro que las microalgas ya no guardan su conformación después del tratamiento térmico y han liberado el contenido intracelular, lo cual se comprueba mediante el aumento en la cantidad de DQOs después del tratamiento. La formación de aglomerados por efecto de la adición de quitosano y el secado de la biomasa sustenta la hipótesis de la formación de gradientes de temperatura en el tratamiento térmico ya que, como se observa en la figura 6B, la biomasa microalgal seca presenta agregados de gran tamaño ($>100 \mu\text{m}$ de diámetro). Los gradientes de temperatura que probablemente se generan en los agregados de biomasa podrían ser la causa de la ineficiencia en la solubilización de carbohidratos. A la fecha, no existe un estudio que evalúe el efecto del secado o la adición de floculantes en las

características fisicoquímicas de la biomasa. Estos agregados podrían tener un efecto negativo en la transferencia de calor, sin embargo, este efecto puede minimizarse bajo condiciones de tratamiento no estáticas.

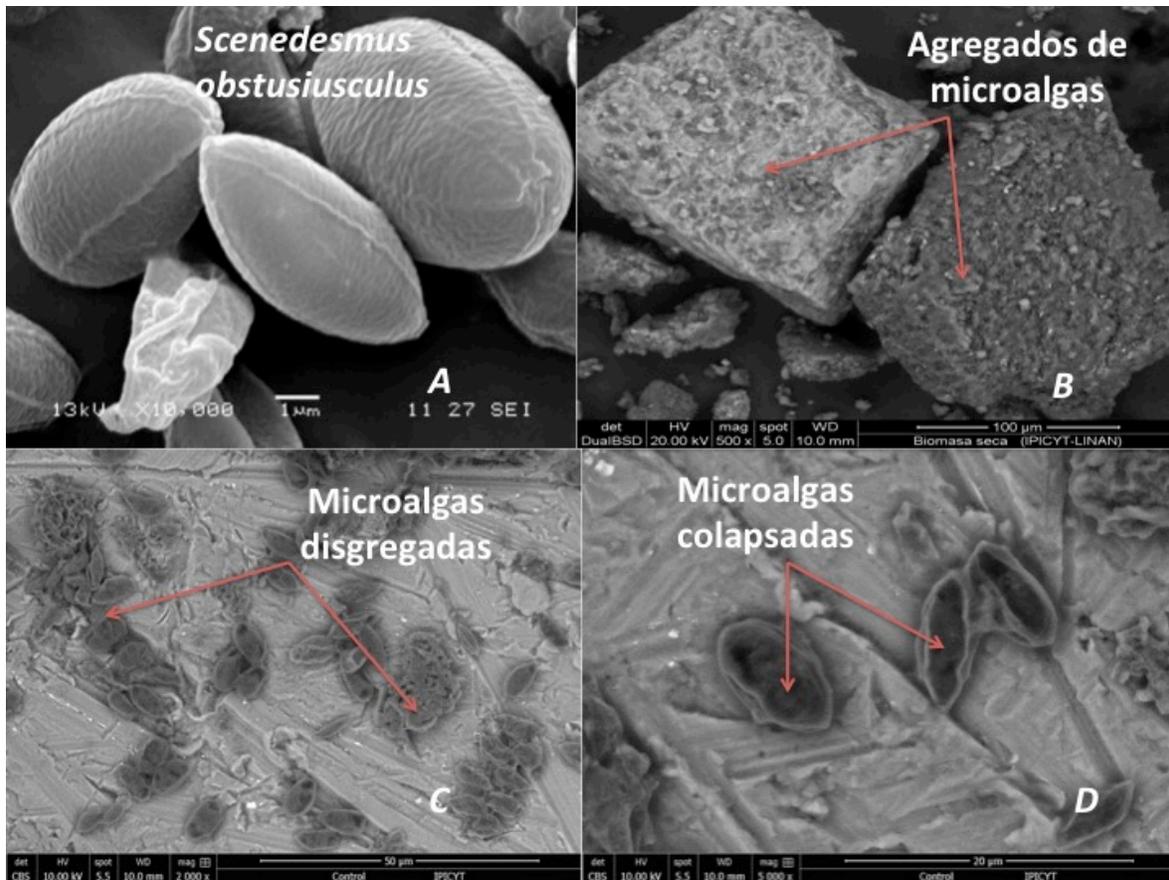


Figura 6.-Imágenes de muestras de biomasa microalgal tomadas por medio de SEM. A: *S. obtusiusculus* hidratada y en condiciones óptimas de crecimiento tomado de (Toledo-Cervantes et al., 2016). B: biomasa seca antes del pre-tratamiento. C: microalgas disgregadas después del pre-tratamiento, y D: microalgas colapsadas después del pre-tratamiento. C y D, corresponden a micrografías del ensayo 2.

4.2.1.- Efecto de la concentración de biomasa microalgal en el tratamiento térmico

Con el fin de determinar el efecto de la concentración inicial de biomasa microalgal (3, 6 y 10 g DQOt/L) sobre la solubilización de DQO y carbohidratos, se efectuaron experimentos adicionales utilizando las condiciones del ensayo 2 de pre-tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 7. Se determinó que, en el caso de la solubilización de DQO, la eficiencia disminuye de 29% a 22% para un aumento en la concentración inicial de biomasa microalgal de 3 a 10 g DQOt/L

respectivamente, lo que indica que no existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la eficiencias de solubilización (Figura 7A). La ligera disminución en la eficiencia podría deberse a fenómenos de transferencia de calor como ya se discutió anteriormente (gradientes de temperatura). En el caso de la solubilización de carbohidratos, no existe diferencia para concentraciones de 3 y 6 g DQOt/L, tal como se observa en la Figura 7B, sin embargo, al pasar a una concentración de 10 g DQOt/L, la eficiencia disminuye de 20 a 6%. Probablemente una mayor cantidad de biomasa aumenta la ineficiencia en la transferencia de calor, lo que favorece las reacciones de polimerización entre carbohidratos y proteínas, sugiriendo que la DQOs que se cuantifica proviene de los lípidos. Los trabajos que reportan una mayor solubilización de carbohidratos son aquellos que utilizan tratamientos químicos (Yang et al., 2011).

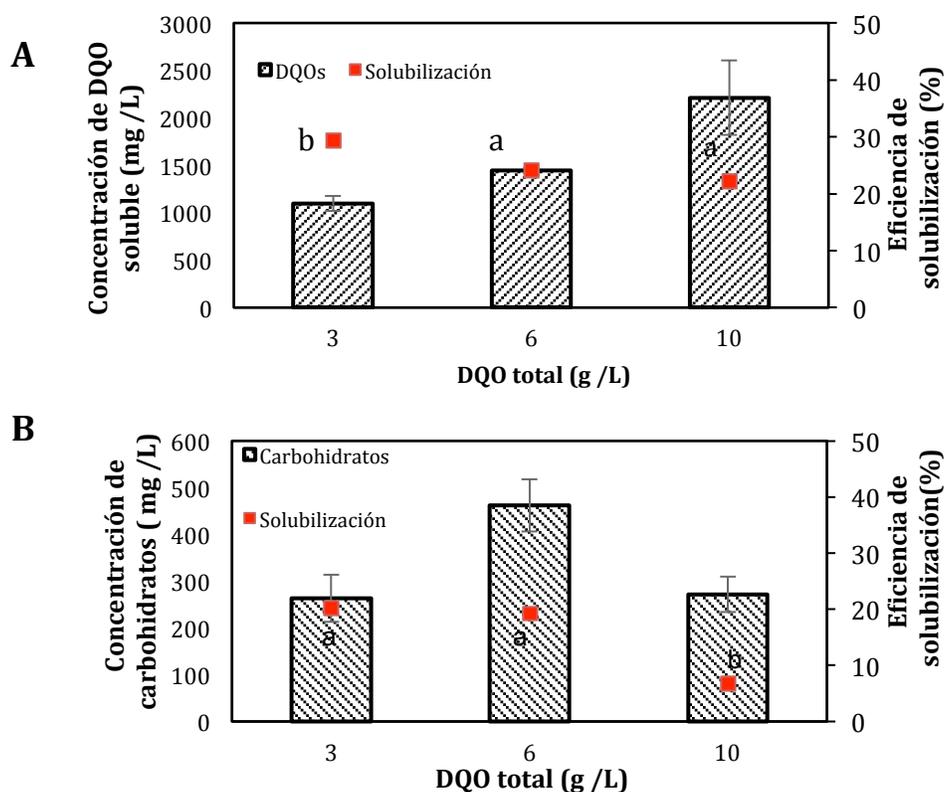


Figura 7.- Efecto de la concentración de biomasa microalgal inicial (expresada en DQO_t) sobre la solubilización de materia orgánica: DQO_s (A) y carbohidratos (B). Las condiciones del tratamiento térmico fueron 98 °C durante 6 h. Letras minúsculas representan las diferencias estadísticas, letras iguales: no existen diferencias, letras distintas: existen diferencias ($p=0.05$).

La solubilización de DQO es similar a lo reportado por otros autores para tratamientos físicos. En específico para tratamientos térmicos, el intervalo de eficiencia de solubilización va desde 7 hasta 23% (González-Fernández et al., 2012; Miranda et al., 2012). Existe un efecto del tiempo de exposición a temperaturas menores a 90°C, mientras que a temperaturas superiores parece ser que el tiempo de exposición no presenta influencia importante (González-Fernández et al., 2013). En comparación con los reportes en la literatura para el tratamiento térmico de *Scenedesmus* este trabajo logró tener eficiencias de solubilización de materia orgánica de hasta 30%, ligeramente superiores a lo descrito en la Tabla 1, lo cual podría deberse al secado.

4.3.-Producción de biogás en lote

4.3.1.-Efecto del tratamiento térmico en la producción de biogás

Para observar el efecto del pre-tratamiento térmico de la biomasa microalgal sobre la producción de metano, se efectuaron diversos experimentos en lote cuyos resultados se presentan en la Figura 8.

El rendimiento de producción de metano al usar biomasa seca de *Scenedesmus obtusiusculus* sin tratamiento térmico (F/M 1) fue de 113.75 mL CH₄/g DQO_{t_{consumida}}, que es menor a lo observado por Zamalloa et al., (2012) y González-Fernández et al., (2012), quienes reportan un rendimiento de 184 y 158 mL CH₄/g DQO_{t_{agregada}}. El rendimiento observado para la biomasa seca de *S. obtusiusculus* sin tratamiento se encuentra por debajo del intervalo reportado en la literatura de 153-350 mL CH₄/g DQO (Alzate et al., 2012; Passos et al., 2015). De igual forma, para este experimento, se observó una tasa específica de producción de metano baja de 15.2 mL/d-g SSV. Una vez que se aplicó el tratamiento térmico (F/M 1T), el rendimiento aumentó significativamente ($p < 0.01$) a 213.54 mL CH₄/g DQO_{t_{consumida}} para la misma concentración de biomasa microalgal, de esta manera, se comprobó que existe un efecto positivo por el tratamiento térmico en la producción de metano en lote. En cuanto a la tasa específica de producción de metano se pudo determinar un aumento después del tratamiento térmico de 15.2 a

21.5 mL/d-g SSV, lo cual indica que el tratamiento térmico es eficiente para aumentar el rendimiento y la velocidad específica de producción de metano en experimentos en lote.

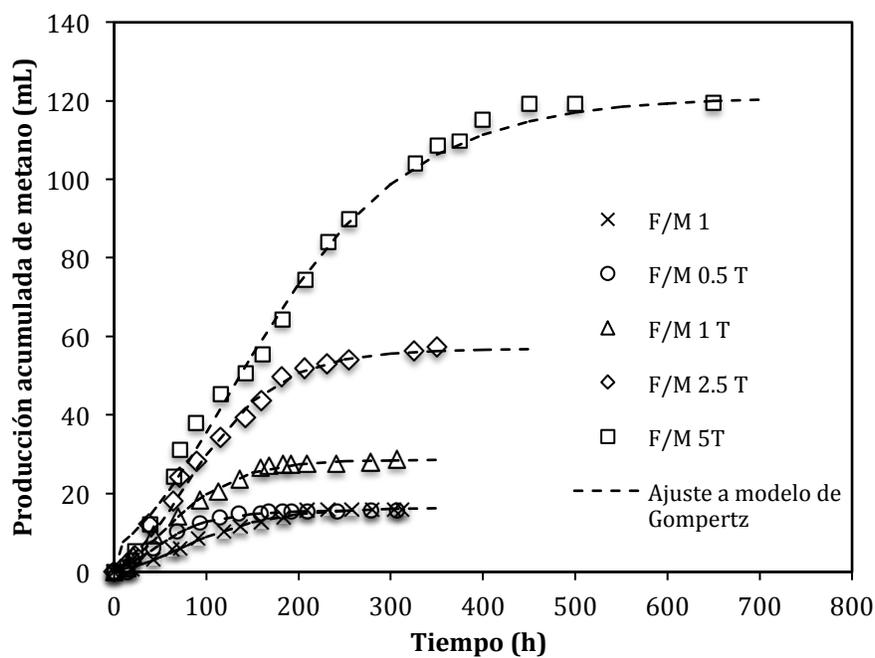


Figura 8.- Producción de metano a partir de biomasa microalgal seca de *S. obtusiusculus*. Relación F/M (food/microorganism) aplicada: F/M 1 es la relación a la cual no se le aplicó tratamiento térmico, mientras que para las relaciones F/M 0.5 T hasta F/M 5 T se realizaron utilizando biomasa microalgal seca tratada térmicamente. La desviación estándar de los experimentos fue menor de 15% y el valor de $R^2 > 0.98$.

Como se observa en la Figura 9 el consumo de DQOt aumentó de 39 a 70% para la biomasa sin tratamiento y con tratamiento térmico, respectivamente; lo que explica el aumento en el rendimiento. No obstante, las diferencias en el consumo de DQOt entre las relaciones F/M aplicadas una vez que se realizó el tratamiento térmico son mínimas.

En el caso de la remoción de DQO, el presente trabajo demostró que durante el proceso de digestión de la biomasa seca de *S. obtusiusculus* en lote, se oxida hasta 40% de la DQO total cuando se usa biomasa sin tratamiento térmico. Es decir, existe un proceso hidrolítico por acción biológica del inóculo. Este porcentaje de consumo se encuentra en los rangos reportados en general para la digestión anaerobia de material parcialmente soluble, y específicamente para microalgas,

los cuales se encuentran entre 40 y 70% (Zamalloa et al., 2012; Alzate et al., 2012; Frigon et al., 2013). Esto indica que por si sola, la biomasa microalgal seca sin tratamiento de *S. obtusiusculus* presenta una biodegradabilidad relativamente baja en condiciones anaerobias.

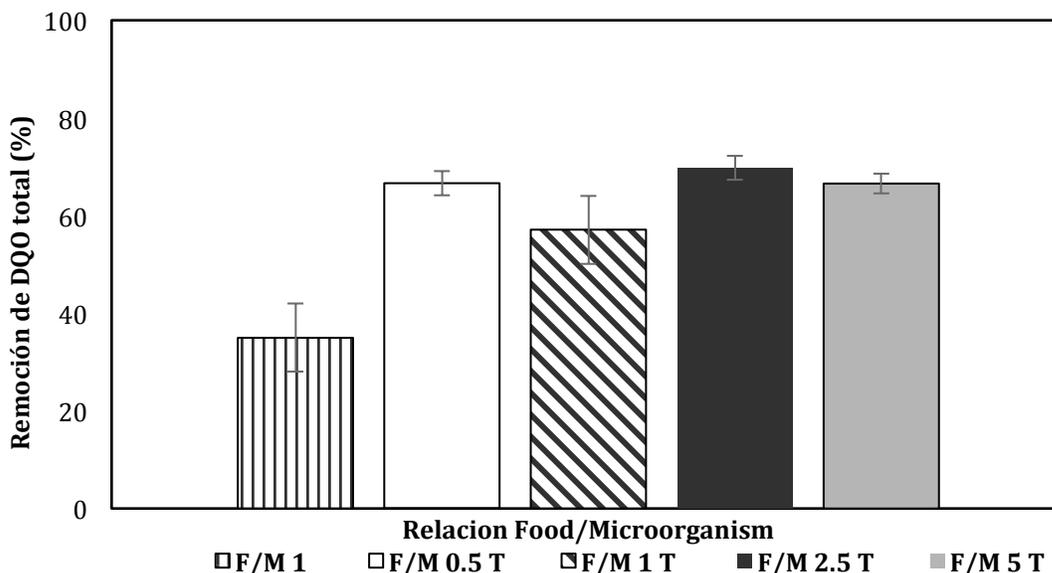


Figura 9.- Eficiencia de consumo de DQOt en experimentos en lote para la producción de biogás a través de la digestión anaerobia de biomasa seca de *S. obtusiusculus*. La T indica los ensayos donde se utilizó biomasa tratada térmicamente.

4.3.2.- Efecto de la concentración de biomasa microalgal en la producción de biogás.

Una vez que se aplicó el tratamiento térmico para la solubilización de la materia orgánica a la biomasa de *S. obtusiusculus*, se pudo determinar que no existe diferencia apreciable en los rendimientos al pasar de una relación F/M de 0.5 a 5. En la Tabla 6 se puede observar que el rendimiento para una relación F/M de 1 es de 213 mL CH₄/g DQOt_{consumida}, mientras que para la relación F/M de 5 es de 232.114 mL CH₄/g DQOt_{consumida}. Los experimentos a relaciones de F/M 0.5T, 1T, 2.5 T y 5 T no presentaron diferencias significativas en cuanto a los rendimientos (p>0.05). La fase de retardo, disminuyó conforme se aumentó la cantidad de biomasa desde 19 hasta 9.2 horas, esta disminución se puede atribuir a que existe una mayor cantidad de DQO soluble, por lo que el proceso se ve ligeramente favorecido. En cuanto a las tasas de producción específica de metano, éstas

aumentaron de 21 a 51 mL/d-g SSV para la relación F/M de 0.5 y 5, respectivamente; de igual manera, la tasa aumenta por la mayor cantidad de DQO soluble. En cuando a la eficiencia de consumo de DQO, no se observó una diferencia importante para los experimentos en los que se aplicó tratamiento térmico, en promedio la eficiencia fue de 70% (Figura 9), lo cual indica una alta biodegradabilidad de la biomasa proveniente del crecimiento de *S. obtusiusculus* cuando se aplica el pre-tratamiento térmico. En el biogás, las concentraciones de CH₄ se encontraron en un intervalo de 60-75%, ligeramente menores en el experimento con biomasa microalgal sin tratamiento térmico. Las concentraciones son más altas a comparación con la digestión de otros residuos, como los residuos de la industria cárnica que presentan concentraciones inferiores a 60% (Bere, 2000; Ward et al., 2014).

Tabla 6.- Datos cinéticos del ajuste al modelo de Gompertz para las distintas concentraciones de sustrato evaluadas para la producción de metano en lote. $R^2 > 0.98$.

Ensayo	biomasa microalgal*	pH final	CH ₄ max ¹ (mL/g SSV)	Rmax ² (mL/d-g SSV)	λ ³ (horas)	Rendimiento (mL CH ₄ /g DQO)
F/M 1	2	7.8±0.1	70.9±1.2	15.2±0.2	26±1.1	113.75±5.2
F/M 0.5 T	1	7.1±0.2	68.2±0.9	21.5±0.3	19±2	195.2±10.5
F/M 1 T	2	7.14	128.1±3.1	28.5±0.9	12±3.1	213.54±7.2
F/M 2.5 T	5	7.4±0.2	359.8±5.2	43.9±1.2	9±2.1	207.14±5.21
F/M 5 T	10	7.1±0.1	811.8±19	51.5±1.4	9.2±4	232.14±5.12

1; Volumen máximo acumulado de metano.

2; Velocidad máxima específica de producción de metano.

3; Fase de retardo.

*; g DQO/L.

Los rendimientos de producción en lote de metano a distintas concentraciones de biomasa microalgal obtenidos en este trabajo, se encuentran en los intervalos reportados en la literatura para la microalga del género *Scenedesmus* y para tratamientos físicos, los cuales son de 153-350 mL CH₄/ g DQO. En cuanto a las tasas específicas de producción de metano, éstas son variables y dependen del

pre-tratamiento, del inóculo para la digestión anaerobia y de características específicas de la biomasa microalgal: húmeda o seca, fresca o refrigerada, entre otros (González-Fernández et al., 2012; Zamalloa et al., 2012; Frigon et al., 2013; Tran et al., 2014).

4.4.- Producción de biogás en semi-continuo

4.4.1.-Desempeño del reactor

El reactor operó durante 50 días y en la Figura 10 podemos observar el desempeño del reactor en cuanto a la velocidad volumétrica de producción de metano (VVPM), en función de las velocidades de carga orgánica que fueron evaluadas. Se observó que las VVPM se encontraron en un intervalo de 0.109 a 2 L CH₄/L-d, así como rendimientos del orden de 120 a 350 mL CH₄/g DQO alimentada. El porcentaje de metano cuantificado en el biogás estuvo entre 65 y 75%. Se observó que la VVPM aumentó conforme se incrementó la velocidad de carga orgánica. Para los periodos de VCO de 8 y 10 g DQO/L-d, no se observó diferencia significativa en cuanto a los rendimientos de producción de metano ($p < 0.01$), esto se discutirá en la sección 4.4.2. El periodo de VCO de 6 g DQO/L-d, el cual es distinto significativamente a los otros periodos ($p < 0.01$), presentó una variación en cuanto a VVPM menor a 15%. El aumento progresivo en las tasas VVPM es debido al aumento en la cantidad de DQO soluble en el sistema, lo cual promueve una mayor disponibilidad de sustrato para los microorganismos.

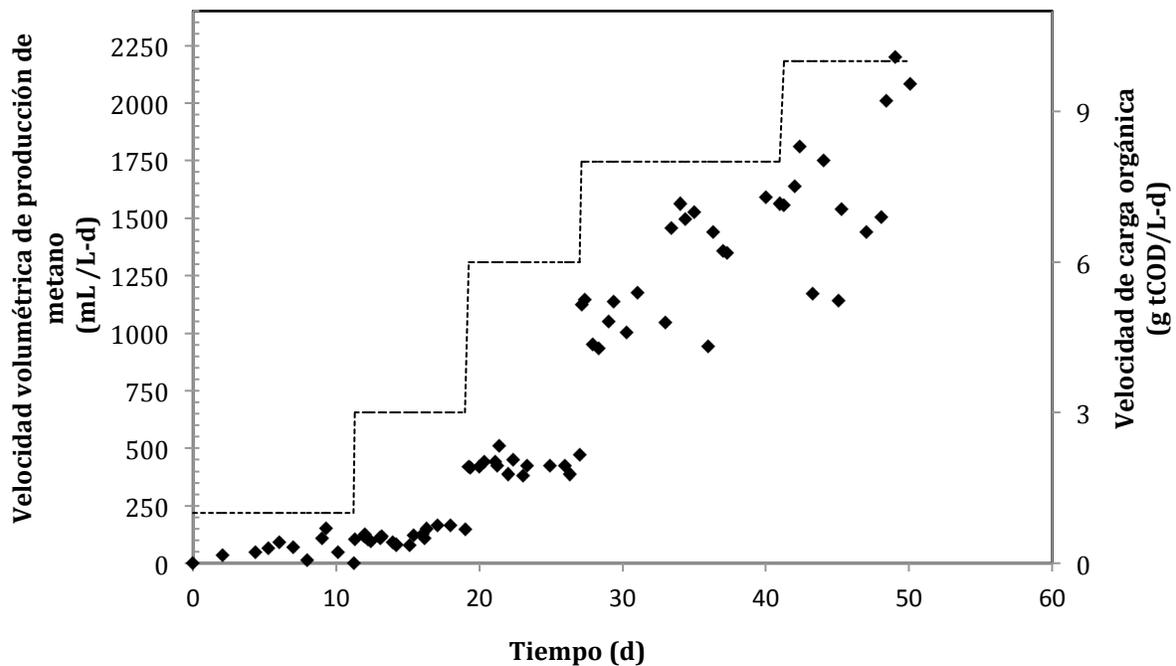


Figura 10.- Desempeño del reactor CSTR para la producción de metano en régimen semi-continuo utilizando biomasa microalgal seca (*S. obtusiusculus*) tratada térmicamente. ♦; Velocidad volumétrica de producción de metano, (----): velocidad de carga orgánica. Los primeros 10 días de operación fueron a un TRH de 3 días.

El perfil de consumo de DQOs fue similar en las distintas cargas orgánicas evaluadas en el reactor tal como se observa en la Figura 11. Al aumentar la concentración desde 1 g DQOs/L hasta 2.7 g DQOs/L no existe diferencia en la velocidad de consumo de DQOs, debido a que para las concentraciones descritas, se logra remover el 89 % durante las primeras 20 horas dentro del reactor, esta premisa permitió reducir el tiempo de retención hidráulica desde 3 a 1 día después de los primeros 10 días de operación.

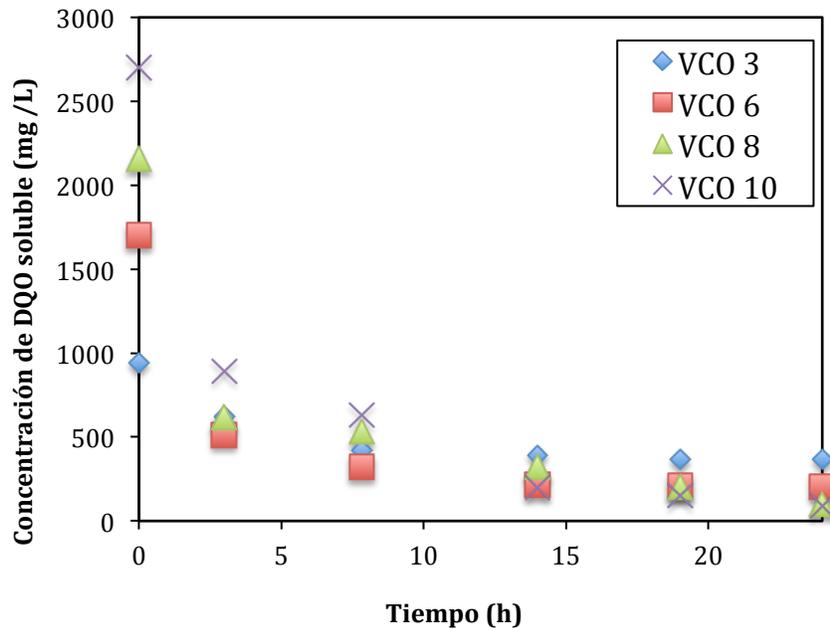


Figura 11.-Cinéticas de consumo de DQO soluble, en el transcurso de un TRH (TRH=1 día) en el reactor a partir de las distintas velocidades de carga orgánica evaluadas.

4.4.2.-Efecto de la velocidad de carga orgánica en los rendimientos de metano

Los rendimientos de producción de metano en el sistema presentaron variaciones importantes sobre todo en el arranque (primeros 10 días), donde el TRH se mantuvo en 3 días. Esto se debe a que el consumo del 80% de la DQOs se llevaba a cabo en las primeras 24 horas y durante las siguientes 48 horas la DQOs fue mínima, incluso podría provenir de la hidrólisis del material particulado. Los rendimientos fueron similares al disminuir el TRH a 1 día y elevar la carga a 3 g DQO/L-d. Se puede observar en la Figura 12, que la etapa más estable en el reactor fue cuando el sistema operó a una velocidad de carga orgánica de 6 g DQO/L-d y TRH de 1 día. Como ya se mencionó esta etapa es distinta de las demás de manera significativa.

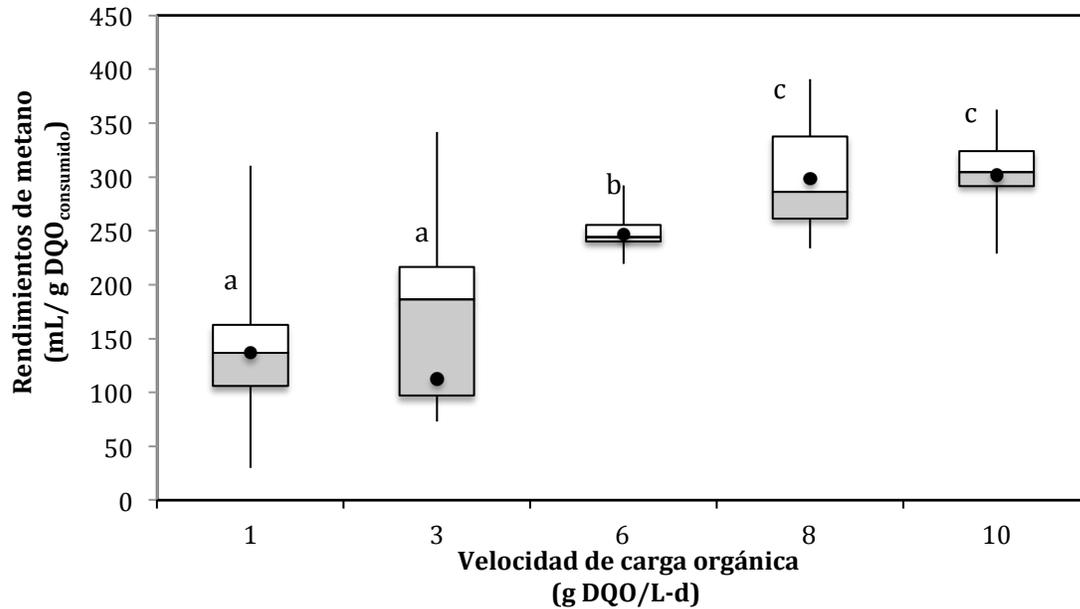


Figura 12.- Gráfico de cajas y bigotes para los rendimientos de producción de metano observados en el reactor de tanque agitado a distintas velocidades de carga orgánica. Se utilizaron todos los datos para construir los gráficos. El punto negro en las cajas representa la media, la línea horizontal es la mediana, la caja gris son los datos que se encuentran por debajo de la mediana, la caja blanca son los datos que se encuentran por encima de la mediana y las líneas verticales representan la desviación de los datos. Las letras minúsculas (a,b,c) representan las diferencias estadísticas por medio del método de Duncan entre los distintos periodos, letras iguales; no existe diferencia significativa $P > 0.01$, letras distintas: existen diferencias significativas $P < 0.01$.

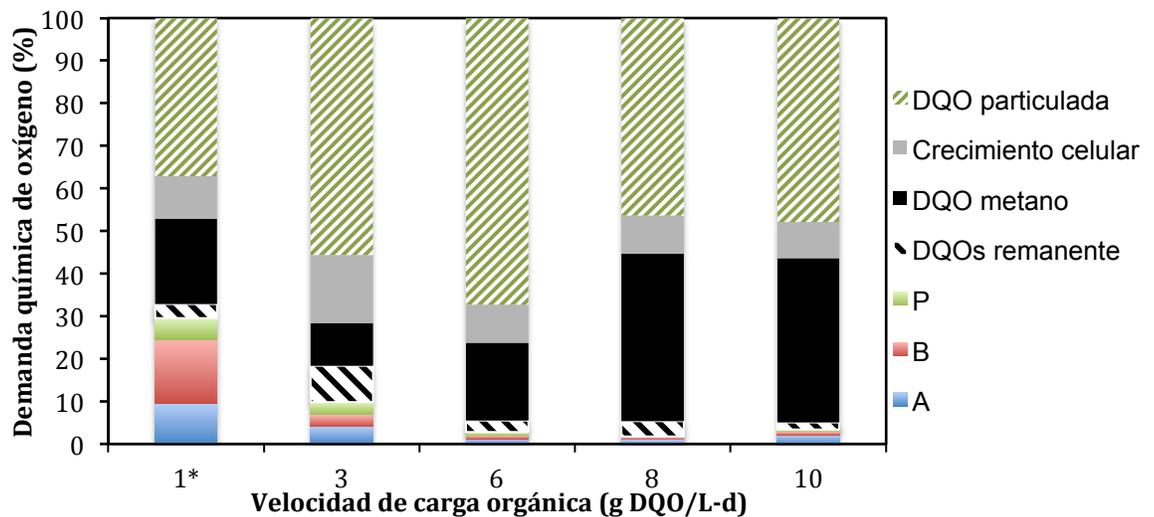


Figura 13.- Balance de DQO para las distintas velocidades de carga orgánica evaluadas en el reactor para producción de metano. *TRH=3 días, P, ácido propiónico; B, ácido butírico; A, ácido acético. Para construir el gráfico se utilizaron todos los datos de las mediciones diarias del efluente.

4.4.3.- Balance de masa

El balance de DQO efectuado durante las distintas condiciones operacionales aplicadas al reactor se muestra en la Figura 13. Se puede observar que el porcentaje de DQO que se dirige a la producción de metano aumenta progresivamente, alcanzando un 40% durante los últimos dos periodos (8 y 10 g DQO/L-d). Se determinó la producción de ácidos orgánicos, sin embargo, la concentración residual es baja durante la mayoría de las condiciones aplicadas, lo cual se debe a que se consumen rápidamente. De manera relevante se observó una disminución en la DQO insoluble desde 70 % hasta menos de 45% durante la digestión, esto indica que se está llevando a cabo la hidrólisis del material particulado que no logró solubilizarse por efecto del tratamiento térmico. Lo anterior debido muy probablemente a un enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos después de 30 días de operación del reactor. No se observaron diferencias significativas entre estos dos últimos periodos ($p < 0.01$) en cuanto a los rendimientos de producción de metano, los cuales estuvieron en un intervalo de 250 a 370 mL CH₄/g DQO_{consumida}, muy cercanos al rendimiento teórico de 385 mL CH₄/ g DQO. En la Figura 14 se observan los resultados de la eficiencia de degradación de sólidos. Se determinó que la degradación de sólidos totales provenientes de la biomasa no superó 30%, aún en las condiciones más estables del reactor. Cabe destacar que los resultados de la remoción de sólidos pudieran estar sobreestimados, debido al aporte de sólidos del inóculo.

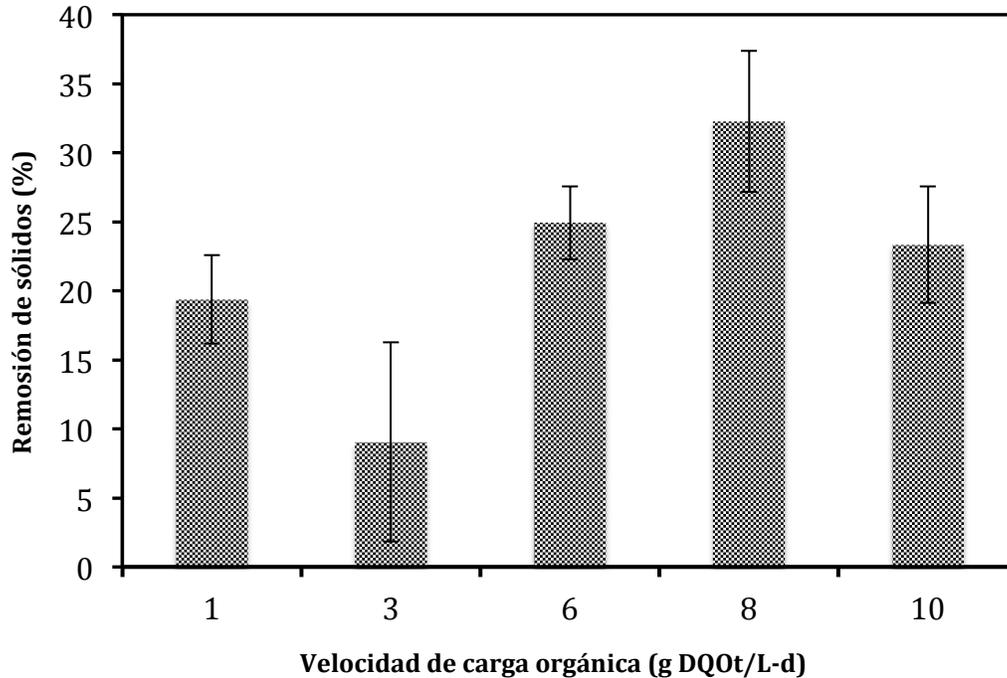


Figura 14.-Remoción de sólidos totales en el reactor para la producción de biogás a partir de biomasa microalgal. Las líneas verticales representan la desviación estándar promedio de los datos.

En general el reactor presentó mayores eficiencias de transformación a metano en comparación con los experimentos en lote, muy probablemente por la aclimatación de los microorganismos al sustrato, así como por el hecho de que se encuentran constantemente recibiendo sustrato fresco. En cuanto a lo descrito en la literatura, existen muy pocos trabajos de producción de metano en semi-continuo o continuo, González-Fernández et al., (2013) reporta tasas muy bajas en la producción en continuo utilizando biomasa de *Scenedesmus*, del orden de 15 mL/L-d así como rendimientos no mayores a 111 mL CH₄/g DQO. Este autor concluye que la biomasa de *Scenedesmus* no es un sustrato adecuado para la producción de biogás ya que no logra una solubilización mayor a 10%, contrario a los resultados que se obtuvieron en este trabajo. En la Tabla 7 se puede observar una comparación entre algunos trabajos de producción de biogás en semi-continuo, incluso para distintos tipos de microalgas, y en efecto, en el trabajo realizado en esta tesis se logró disminuir el tiempo de retención hidráulica,

obteniendo tasas volumétricas de producción de metano similares y, en algunos casos, superiores a lo reportado en la literatura.

Tabla 7.-Tabla comparativa de condiciones operacionales de reactores de tanque agitado, operados en semi-continuo para la digestión anaerobia de biomasa microalgal.

Microalga	Tratamiento	TRH (días)	VCO (g DQO/L-d)	VVPM (mLCH ₄ /L-d)	Rendimiento (mLCH ₄ /g DQO)	Referencia
<i>Scenedesmus</i>	90 °C, 3 h	15	1	15	96	González-Fernández et al., (2013)
<i>Scenedesmus</i>	90 °C, 3h	15	2.5	N.R*	111	
<i>Scenedesmus spp.</i>	-	12.5	2.6	66	180	Tran et al., (2014)
<i>Scenedesmus sp.</i>	-	16	0.83	53	284	Tartakovsky et al., (2013)
<i>Scenedesmus y Opuntia maxima</i>	Liofilización	10	7.8	N.R	216	Ramos- et al., (2014)
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	98 °C, 6h	3	1	80	150	Este trabajo
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	98 °C, 6h	1	6	480	260	Este trabajo
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	98 °C, 6h	1	10	1500	320	Este Trabajo

*N.R reportado.

4.5.- Producción de hidrógeno en experimentos en lote

De manera preliminar, se efectuaron cinéticas de producción de hidrógeno en experimentos en lote usando biomasa microalgal seca sin ningún pre-tratamiento. Se generó un volumen acumulado de hidrógeno que no superó los 12 mL. Estos resultados se presentan en la Figura 15. La producción de hidrógeno, proviene de la fermentación de los carbohidratos solubles (<50 mg/L). Esto se comprueba debido a que el control de producción endógena (únicamente lodo con el medio mineral) no presentó producción. El proceso fermentativo estuvo limitado por la hidrólisis de la pared celular, debido a que el tratamiento térmico aplicado al

inóculo suprime los microorganismos hidrolíticos. En cuanto a los metabolitos determinados en el efluente se detectó y cuantificó ácido acético y butírico en concentraciones menores a 80 mg/L. El consumo de DQO no superó el 12%, por lo que el rendimiento de producción de hidrógeno fue de 180 mL H₂/g DQO_{consumida}. Con respecto a lo reportado en la literatura, los intervalos van desde 57 hasta 280 mL H₂/g DQO (Batista et al., 2014; Liu et al., 2012). Los rendimientos observados en el presente trabajo están dentro del intervalo mencionado. Sin embargo, es necesario aumentar la cantidad de carbohidratos solubles para aumentar la cantidad de hidrógeno que se produce. En relación a los carbohidratos contenidos en la biomasa, es necesario una exploración más detallada de los pretratamientos que pudieran aumentar la liberación de azúcares y, de esta manera, aumentar el potencial de *S. obtusiusculus* para la producción fermentativa de hidrógeno.

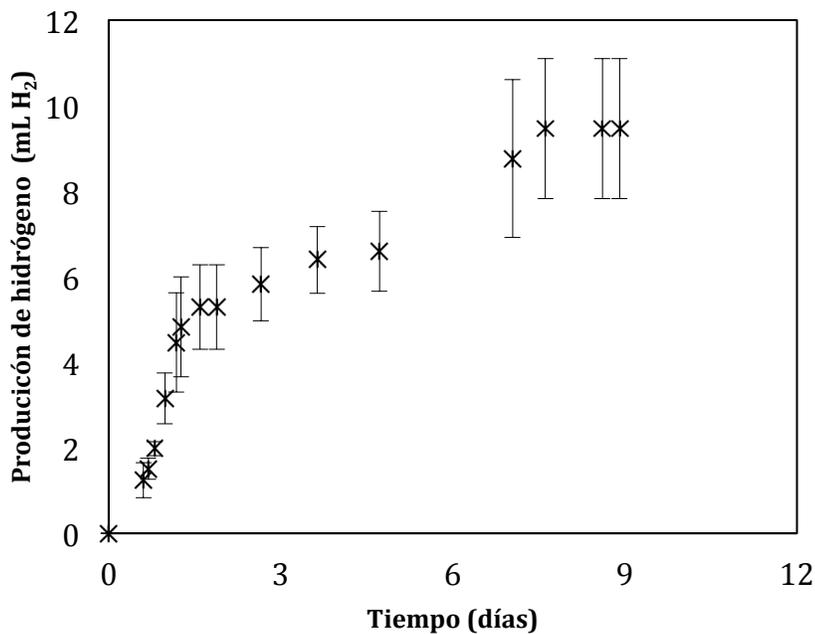


Figura 15.-Cinética de producción fermentativa de hidrógeno a partir de biomasa microalgal seca de *S. obtusiusculus*. Las x representan los valores de volumen acumulado corregido restando la producción endógena del lodo, las barras verticales representan la desviación estándar de las repeticiones.

5.- Conclusiones y perspectivas

Con base en los resultados obtenidos de la digestión anaerobia en lote de biomasa microalgal tratada térmicamente, podemos concluir que el tratamiento efectuado a 98 °C por 6 horas es eficiente para aumentar al doble la digestibilidad de la biomasa seca de *S. obtusiusculus*, en comparación con biomasa sin pretratamiento. De igual forma, el tratamiento térmico tiene un efecto positivo al aumentar tanto la velocidad como los rendimientos de producción de metano en lote de manera significativa. La producción de metano en semi-continuo, utilizando biomasa microalgal seca tratada térmicamente, es posible a bajos tiempos de retención hidráulica (1 y 3 días) y altas velocidades de carga orgánica (8 Y 10 g DQO/L-d). Esto por el aprovechamiento de la DQO soluble. Las altas velocidades y rendimientos de producción obtenidos están en función del aumento de la cantidad de sustrato que se añade al sistema, es decir, al incremento en la relación F/M. Los resultados de producción en semi-continuo son de los más altos reportados a la fecha. En cuanto a los resultados de la producción en semi-continuo, se puede afirmar que son alentadores, debido a que se logró comprobar que utilizar velocidades de carga orgánicas de 10 g DQO/L-d a un tiempo de retención hidráulica de 1 día, se obtienen rendimientos del orden de 370 mL/g DQO y VVPM de 1.5 L/L-d, contrario a los reportes en la literatura, donde se utilizan tiempos de retención hidráulica mayores a 10 días. Uno de los aportes más importantes de este trabajo es llegar a la conclusión de que la producción de metano en semi-continuo es eficiente a tiempos de retención hidráulica de 1 día, cuando se aumenta la cantidad de DQO soluble en el sistema. Para la producción de hidrógeno en lote a partir de biomasa microalgal seca de *S. obtusiusculus*, se puede concluir que es necesario la aplicación de tratamientos que faciliten la liberación de carbohidratos y en general, de material fermentable, esto con la finalidad de aumentar tanto rendimientos como tasas de producción de hidrógeno. Uno de los intereses de estudiar la digestión anaerobia de la biomasa microalgal es el acoplamiento de procesos eficientes de captura de CO₂ y de producción de

energías sustentables. Sin embargo, uno de los cuellos de botella se encuentra en los pre-tratamientos a la biomasa para acelerar el proceso de digestión, esto debido a que los tratamientos son variables, y dependen de las características de la biomasa. Otro problema que debe solucionarse es la recuperación y concentración de la biomasa microalgal, generalmente este es un proceso muy lento. Deben estudiarse y diseñarse nuevos sistemas eficientes tanto de concentración y pre-tratamientos para recuperar la mayor cantidad de energía de este tipo de cultivos. Recientemente, se han desarrollado sistemas, conocidos como de “nueva generación” para la solubilización de materia orgánica de otros residuos, un ejemplo es el proceso de “steam explosion” del cual recientemente se han obtenido buenos resultados en la liberación de materia orgánica. Es imprescindible diseñar sistemas acoplados, donde el pre-tratamiento y la recuperación de la biomasa no representen un problema en el tren de proceso, por lo que estudiar estos sistemas por separado para su optimización es un área de oportunidad, mientras que lograr acoplarlos para tener sistemas de producción continua de biogás es un punto importante para la investigación.

Es claro que el concepto de biorrefinería debe aplicarse en general a los procesos biotecnológicos para aumentar sus rendimientos en la producción de energía, esto podría vencer la barrera económica que representa el costo de los pre-tratamientos. Sobre el estudio de *S. obtusiusclus* en particular, se requiere determinar el potencial que esta microalga tiene en la generación de biogás después de un proceso de extracción de lípidos, ya que dicho proceso involucra condiciones de crecimiento distintas y un tratamiento intrínseco para la extracción de lípidos. La presencia de posibles inhibidores por los solventes utilizados en el proceso de extracción o un menor potencial de producción de metano por la ausencia de lípidos en los componentes de la biomasa, son aspectos que también podrían abordarse.

6. - Bibliografía

- Abdelgadir, A., Chen, X., Liu, J., Xie, X., Zhang, J., Zhang, K., Wang, H., Liu, N., 2014. Characteristics, process parameters, and inner components of anaerobic bioreactors. *BioMed Res.* Volumen 2014, 10 páginas.
- Aguirre, A.-M., Bassi, A., 2013. Investigation of biomass concentration, lipid production, and cellulose content in *Chlorella vulgaris* cultures using response surface methodology. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2114–2122. doi:10.1002/bit.24871
- Alemán-Nava, G.S., Casiano-Flores, V.H., Cárdenas-Chávez, D.L., Díaz-Chavez, R., Scarlat, N., Mahlkecht, J., Dallemand, J.-F., Parra, R., 2014. Renewable energy research progress in Mexico: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 32, 140–153. doi:10.1016/j.rser.2014.01.004
- Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-González, R.I., Alatrísté-Mondragón, F., Méndez-Acosta, H.O., 2015. Methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresour. Technol.* 181, 191–199. doi:10.1016/j.biortech.2015.01.036
- American Public Health Association, (A.P.H.A.), 1981. Standard methods for the examination of water and wastewater: selected analytical methods approved and cited by the United States Environmental Protection Agency.
- Balan, V., Balan, V., 2014. Current Challenges in Commercially Producing Biofuels from Lignocellulosic Biomass, Current Challenges in Commercially Producing Biofuels from Lignocellulosic Biomass. *Int. Sch. Res. Not. Int. Sch. Res. Not.* 2014, 2014, e463074. doi:10.1155/2014/463074, 10.1155/2014/463074
- Batista, A.P., Moura, P., Marques, P.A.S.S., Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., 2014. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel* 117, Part A, 537–543. doi:10.1016/j.fuel.2013.09.077
- Bere, L.D., 2000. Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art. *Water Sci. Technol.* 41, 283–290.
- Bridgwater, T., 2006. Biomass for energy. *J. Sci. Food Agric.* 86, 1755–1768. doi:10.1002/jsfa.2605
- Cabello, J., Morales, M., Revah, S., 2014. Dynamic photosynthetic response of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* to light intensity perturbations. *Chem. Eng. J.* 252, 104–111. doi:10.1016/j.cej.2014.04.073
- Cabezas, A., Araujo, J.C. de, Callejas, C., Galès, A., Hamelin, J., Marone, A., Sousa, D.Z., Trably, E., Etchebehere, C., 2015. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 555–593. doi:10.1007/s11157-015-9380-8
- Campo, J.A.D., García-González, M., Guerrero, M.G., 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 1163–1174. doi:10.1007/s00253-007-0844-9
- Chen, W., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2011. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells 102, 135–141. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.076
- Conde, J.L., Moro, L.E., Travieso, L., Sanchez, E.P., Leiva, A., Dupeirón, R., Escobedo, R., 1993. Biogas purification process using intensive microalgae cultures. *Biotechnol. Lett.* 15, 317–320. doi:10.1007/BF00128326
- Davila-Vazquez, G., Alatrísté-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E.,

2008. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *Int. J. Hydrog. Energy*, 2nd Asian Bio Hydrogen Symposium 33, 4989–4997. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.06.065
- Demirel, B., Scherer, P., 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 173–190. doi:10.1007/s11157-008-9131-1
- Díaz, E.E., Stams, A.J.M., Amils, R., Sanz, J.L., 2006. Phenotypic Properties and Microbial Diversity of Methanogenic Granules from a Full-Scale Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor Treating Brewery Wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4942–4949. doi:10.1128/AEM.02985-05
- Dresselhaus, M.S., Thomas, I.L., 2001. Alternative energy technologies. *Nature* 414, 332–337. doi:10.1038/35104599
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Frigon, J.-C., Matteau-Lebrun, F., Hamani Abdou, R., McGinn, P.J., O’Leary, S.J.B., Guiot, S.R., 2013. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Appl. Energy* 108, 100–107. doi:10.1016/j.apenergy.2013.02.051
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2013. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresour. Technol.* 129, 219–223. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.123
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresour. Technol.* 110, 610–616.
- González-Méndez, B., Webster, R., Fiedler, S., Loza-Reyes, E., Hernández, J.M., Ruíz-Suárez, L.G., Siebe, C., 2015. Short-term emissions of CO₂ and N₂O in response to periodic flood irrigation with waste water in the Mezquital Valley of Mexico. *Atmos. Environ.* 101, 116–124. doi:10.1016/j.atmosenv.2014.10.048
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315, 804–807. doi:10.1126/science.1137016
- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.*, 113, 244–252. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.133
- Liu, C.-H., Chang, C.-Y., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2012. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock. *Int. J. Hydrog. Energy*, The 2011 Asian Bio-Hydrogen and Biorefinery Symposium (2011ABBS) 37, 15458–15464. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.04.076
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Maity, J.P., Bundschuh, J., Chen, C.-Y., Bhattacharya, P., 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. *Energy* 78, 104–113. doi:10.1016/j.energy.2014.04.003
- Mandal, S., Mallick, N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 281–291. doi:10.1007/s00253-009-1935-6

- Meher Kotay, S., Das, D., 2008. Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials. *Int. J. Hydrog. Energy*, IWHE 2006 33, 258–263. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.07.031
- Mendez, L., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014. Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. *Appl. Energy* 129, 238–242. doi:10.1016/j.apenergy.2014.04.110
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C., Gouveia, L., 2012. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 104, 342–348. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.059
- Molina Grima, E., Belarbi, E.-H., Ación Fernández, F.G., Robles Medina, A., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20, 491–515. doi:10.1016/S0734-9750(02)00050-2
- Nallathambi Gunaseelan, V., 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass Bioenergy* 13, 83–114. doi:10.1016/S0961-9534(97)00020-2
- Ni, B.-J., Liu, H., Nie, Y.-Q., Zeng, R.J., Du, G.-C., Chen, J., Yu, H.-Q., 2011. Coupling glucose fermentation and homoacetogenesis for elevated acetate production: Experimental and mathematical approaches. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 345–353. doi:10.1002/bit.22908
- Nishio, N., Nakashimada, Y., 2007. Recent development of anaerobic digestion processes for energy recovery from wastes. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 105–112. doi:10.1263/jbb.103.105
- Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., Moura, P., 2015. Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass. *Fuel* 153, 128–134. doi:10.1016/j.fuel.2015.02.093
- Patel, A.K., Singhanian, R.R., Pandey, A., 2014. Biofuels from Biomass, in: Agarwal, A.K., Pandey, A., Gupta, A.K., Aggarwal, S.K., Kushari, A. (Eds.), *Novel Combustion Concepts for Sustainable Energy Development*. Springer India, pp. 25–44.
- Petersen, J.-E., 2008. Energy production with agricultural biomass: environmental implications and analytical challenges†. *Eur. Rev. Agric. Econ.* 35, 385–408. doi:10.1093/erae/jbn016
- Posten, C., Schaub, G., 2009. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels—A process view. *J. Biotechnol., Solar Bio-Fuels* 142, 64–69. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.03.015
- Radmer, R., Ollinger, O., 1980. Light-driven Uptake of Oxygen, Carbon Dioxide, and Bicarbonate by the Green Alga *Scenedesmus*. *Plant Physiol.* 65, 723–729. doi:10.1104/pp.65.4.723
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S., Rengasamy, R., 2008. A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.* 34, 77–88. doi:10.1080/10408410802086783
- Ramos-Suárez, J.L., Martínez, A., Carreras, N., 2014. Optimization of the digestion process of *Scenedesmus* sp. and *Opuntia maxima* for biogas production. *Energy Convers. Manag.* 88, 1263–1270. doi:10.1016/j.enconman.2014.02.064
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112. doi:10.1002/bit.22033
- Sayre, R., 2010. Microalgae: The Potential for Carbon Capture. *BioScience* 60, 722–727. doi:10.1525/bio.2010.60.9.9

- Schwede, S., Kowalczyk, A., Gerber, M., Span, R., 2013. Anaerobic co-digestion of the marine microalga *Nannochloropsis salina* with energy crops. *Bioresour. Technol.* 148, 428–435. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.157
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.* 27, 409–416. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.03.001
- Sumaya-Martinez, M.T., Thomas, S., Linard, B., Binet, A., Guerard, F., 2005. Effect of Maillard reaction conditions on browning and antiradical activity of sugar–tuna stomach hydrolysate model system. *Food Res. Int.*, Third International Congress on Pigments in Food/Third International Congress on Pigments in Food 38, 1045–1050. doi:10.1016/j.foodres.2005.03.015
- Sung, S., Liu, T., 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere* 53, 43–52. doi:10.1016/S0045-6535(03)00434-X
- Takeda, H., 1996. Cell wall sugars of some *Scenedesmus species*. *Phytochemistry* 42, 673–675. doi:10.1016/0031-9422(95)00952-3
- Tartakovsky, B., Matteau-Lebrun, F., McGinn, P.J., O'Leary, S.J.B., Guiot, S.R., 2013. Methane production from the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD in a continuous anaerobic reactor. *Algal Res.* 2, 394–400. doi:10.1016/j.algal.2013.07.002
- Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., Revah, S., 2013. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour. Technol.* 130, 652–658. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.081
- Toledo-Cervantes A., Garduño G., Martínez M., Campos J., Morales M*. 2016. Taxonomic, molecular and biochemical characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT UAM under nitrogen starvation and different levels of irradiance. Submitted to *Algal Research*. Ms. Ref. No.: ALGAL-D-16-00472.
- Tran, K.C., Mendoza Martin, J.L., Heaven, S., Banks, C.J., Acien Fernandez, F.G., Molina Grima, E., 2014. Cultivation and anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. grown in a pilot-scale open raceway. *Algal Res.* 5, 95–102. doi:10.1016/j.algal.2014.06.001
- Ward, A.J., Lewis, D.M., Green, F.B., 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Res.* 5, 204–214. doi:10.1016/j.algal.2014.02.001
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., Chen, Y., 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells 102, 159–165. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.017
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Li, X., 2011. Thermo-alkaline pretreatment of lipid-extracted microalgal biomass residues enhances hydrogen production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 454–460. doi:10.1002/jctb.2537
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Li, X., 2010. Enhanced hydrogen production from lipid-extracted microalgal biomass residues through pretreatment. *Int. J. Hydrog. Energy, HE (Hydrogen Systems and Materials For Sustainability)* 35, 9618–9623. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.07.017
- Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W., 2012. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Appl. Energy* 92, 733–738. doi:10.1016/j.apenergy.2011.08.017