

# INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



## POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Co-digestión de *Scenedesmus obtusiusculus* con sustratos ricos en  
carbono para la producción de biogás

Tesis que presenta:

**Leonardo Daniel Arias García**

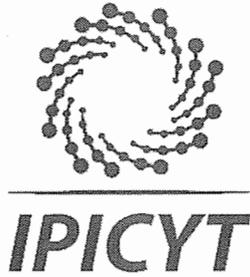
Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Ambientales**

Directora de Tesis:

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre 2019.



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Co-digestión de *Scenedesmus obtusiusculus* con sustratos ricos en carbono para la producción de biogás**" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Leonardo Daniel Arias García** y aprobada el trece de diciembre del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**  
Director de la tesis

**Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Elías Razo Flores**  
Miembro del Comité Tutorial

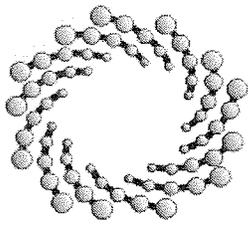


## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (862509) y un apoyo del Clúster Biocombustibles Gaseosos 247006.

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



**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 083 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 13 días del mes de diciembre del año 2019, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. María de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

**Leonardo Daniel Arias García**

sobre la Tesis intitulada:

*Co-digestión de Scenedesmus obtusiusculus con sustratos ricos en carbono para la producción de biogás*

que se desarrolló bajo la dirección de

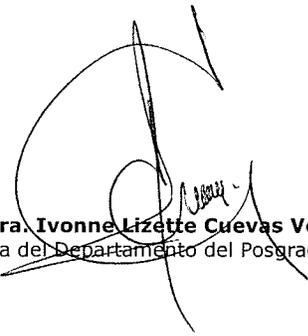
**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**

El Jurado, después de deliberar, determinó

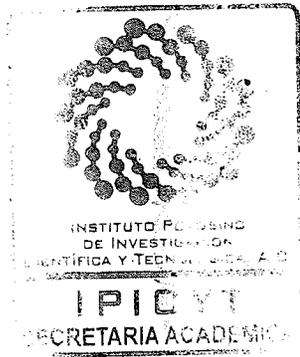
**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 14:00 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 13 días del mes de diciembre de 2019.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



*A mis padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional*

*A los amigos incondicionales por su extraordinaria motivación*

*A mis amigos del posgrado por ayudarme a no extrañar tanto mi casa*

*Muchísimas gracias a todos por su apoyo*

## **Agradecimientos**

A mi directora de tesis, la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García por incluirme en su grupo de trabajo, permitirme trabajar bajo su dirección, por su invaluable apoyo durante la realización de esta tesis, así como su paciencia y confianza. A mi comité tutorial, al Dr. Elías Razo Flores y la Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarra por sus consejos y críticas constructivas.

A los técnicos académicos, M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, M. en C. Juan Pablo Rodas Ortíz, M. en C. Karen Lizeth Galindo Hernández y Lic. Mario Delgado Cardozo por su apoyo.

Al grupo de trabajo del Clúster de Biocombustibles Gaseosos, particularmente a Casandra, Paulina, Jesús, Paola, Aída, Rodolfo y Jack, así como al grupo de trabajo de sulfato-reducción, Patricia, Tonatiuh, Erika y Nohemí por su motivación y apoyo, así como en resolución de dudas durante esta investigación.

A mis compañeros y amigos de la maestría por las experiencias y buenos momentos, en especial a Alejandro, Kristell, Fernanda, Jaqueline y Ruby.

## CONTENIDO

Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Tabla de contenido	vii
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Metano: Características importantes, usos, y producción .....	1
1.2 Digestión anaerobia .....	2
1.3 Fuentes de biomasa aprovechable para la producción de biogás .....	5
1.4 Tipos de biocombustibles.....	7
1.4.1 Biocombustibles de primera generación .....	7
1.4.2 Biocombustibles de segunda generación.....	8
1.4.3 Biocombustibles de tercera generación .....	8
1.5 Microalgas.....	9
1.5.1 Clasificación taxonómica y especies de microalgas de importancia biotecnológica .....	10
1.5.2 Cultivo de microalgas.....	10
1.5.3 Composición bioquímica y pared celular.....	12
1.5.4 Ventajas de la utilización de biomasa microalgal para la producción de biogás .....	13
1.5.5 Desventajas de la utilización de biomasa microalgal .....	15
1.6 Co-digestión de materia orgánica compleja .....	16
1.7 Estado del arte de la digestión anaerobia de biomasa microalgal .....	19
1.7.1 Mono-digestión.....	19
1.7.2 Co-digestión de biomasa microalgal .....	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	22
2.1 Planteamiento del problema.....	22
2.2 Justificación.....	22
2.3 Hipótesis .....	23
2.4 Objetivo General .....	23
2.4.1 Objetivos particulares.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
3.1 Biomasa microalgal.....	25

3.2 Caracterización de la biomasa microalgal.....	25
3.3 Inóculo .....	25
3.4 Co-sustratos.....	26
3.5 Medio mineral para cuantificar la actividad metanogénica y el potencial de metano. ....	26
3.6 Cuantificación de la actividad metanogénica acetoclástica.....	27
3.7 Determinación del potencial de producción de metano mediante co-digestión.....	27
3.8 Determinación del potencial de producción de metano mediante co-digestión con microalga seca .....	29
3.9 Pretratamiento termo-químico y co-digestión de la biomasa microalgal seca .....	29
3.10 Cálculos y análisis estadístico.....	30
3.10.1 Ajuste al modelo de Gompertz .....	31
3.10.2 Análisis de sinergismo.....	31
3.10.3 Análisis estadístico.....	33
3.11 Métodos analíticos .....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
4.1 Actividad metanogénica y caracterización del lodo granular.....	34
4.2 Caracterización de la biomasa microalgal y co-sustratos.....	34
4.2.1 Biomasa microalgal .....	34
4.2.2 Efluente de reactor productor de hidrógeno (ERPH).....	35
4.2.3 Vinazas tequileras .....	36
4.3 Análisis de potencial de producción de metano en mono y co-digestión .....	37
4.3.1 Co-digestión de microalga húmeda con ERPH .....	37
4.3.2 Co-digestión de microalga húmeda con vinazas.....	40
4.4 Selección del mejor co-sustrato. ....	43
4.5 Potencial bioquímico de metano de microalga seca en co-digestión con vinazas.....	44
4.6 Pretratamiento termo-químico y evaluación del potencial bioquímico de metano de microalga seca pretratada en co-digestión con vinazas.....	47
4.7 Análisis de DQO consumida en los ensayos.....	51
4.8. Evaluación del sinergismo entre sustratos.....	53
4.9 Selección de la mejor presentación de microalga .....	54
4.10 Análisis de Costos y energía.....	56
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	58
6. BIBLIOGRAFÍA .....	60
ANEXOS .....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Porcentaje de pared celular en peso seco y composición bioquímica	<b>14</b>
<b>Tabla 1.2</b> Rendimiento de metano a partir de distintos géneros de microalgas sometidas a digestión anaerobia	<b>19</b>
<b>Tabla 1.3</b> Procesos de co-digestión de biomasa microalgal con diferentes co-sustratos	<b>21</b>
<b>Tabla 4.1</b> Caracterización de sustratos empleados	<b>35</b>
<b>Tabla 4.2</b> Concentración de amonio residual en los ensayos con microalga húmeda y ERPH	<b>39</b>
<b>Tabla 4.3</b> Ajuste al modelo de Gompertz para la co-digestión de microalga húmeda y ERPH	<b>40</b>
<b>Tabla 4.4</b> Determinación de las concentraciones de amonio en ensayos con microalga húmeda y ERPH	<b>42</b>
<b>Tabla 4.5</b> Ajuste al modelo de Gompertz modificado empleando biomasa húmeda con vinazas tequileras	<b>42</b>
<b>Tabla 4.6</b> Determinación de las concentraciones de amonio en ensayos con microalga seca y vinazas tequileras	<b>46</b>
<b>Tabla 4.7</b> Ajuste al modelo de Gompertz modificado empleando biomasa seca con vinazas tequileras	<b>47</b>
<b>Tabla 4.8</b> Determinación de amonio para los ensayos con biomasa seca pretratada y vinazas tequileras	<b>48</b>
<b>Tabla 4.9</b> Ajuste al modelo de Gompertz modificado para los ensayos con microalga seca pretratada con vinazas tequileras	<b>50</b>
<b>Tabla 4.10</b> Análisis de sinergismo en los ensayos de co-digestión con vinazas	<b>54</b>
<b>Tabla 4.11</b> Resultados prueba de Tukey para Rmax y Hmax	<b>55</b>
<b>Tabla 4.12.</b> Valores de producción de energía para las distintas presentaciones de biomasa microalgal	<b>56</b>
<b>Tabla 4.13.</b> Costos de producción por litro de metano. Se muestran los valores para cada tipo de microalga y en las 3 condiciones analizadas	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Esquema de la digestión anaerobia propuesto por Kaspar y Whurmman	<b>3</b>
<b>Figura 1.2</b> Sustratos empleados en la digestión anaerobia y rendimientos obtenidos	<b>6</b>
<b>Figura 1.3</b> Sistema de cultivo abierto tipo <i>Raceway</i>	<b>10</b>
<b>Figura 1.4</b> Sistema de cultivo cerrado	<b>11</b>
<b>Figura 1.5</b> Composición de la pared celular microalgal	<b>13</b>
<b>Figura 1.6</b> Esquema que ilustra las interacciones que ocurren al llevar a cabo un proceso de co-digestión	<b>17</b>
<b>Figura 3.1</b> Diagrama experimental general para evaluar el potencial de producción de metano de biomasa microalgal en co-digestión	<b>28</b>
<b>Figura 3.2</b> Ejemplo de ajuste al modelo de Gompertz modificado	<b>32</b>
<b>Figura 4.1</b> Cinética de producción de metano utilizando microalga húmeda y ERPH	<b>38</b>
<b>Figura 4.2</b> Cinética de producción de metano utilizando microalga húmeda y vinazas	<b>41</b>
<b>Figura 4.3</b> Diagrama de distribución de los co-sustratos utilizados	<b>44</b>
<b>Figura 4.4</b> Cinética de producción de metano utilizando microalga seca y vinazas	<b>45</b>
<b>Figura 4.5</b> Cinética de producción de metano utilizando microalga seca pretratada y vinazas	<b>48</b>
<b>Figura 4.6</b> Fracción soluble y particulada inicial	<b>52</b>
<b>Figura 4.7</b> Fracción soluble y particulada final	<b>53</b>
<b>Figura 4.8</b> Diagrama de distribución para los diferentes tipos de microalgas utilizadas	<b>55</b>

## ABREVIATURAS

AGV	Ácidos grasos volátiles
C/N	Relación carbono/nitrógeno
CH <sub>4</sub>	Metano
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DQO	Demanda química de oxígeno
ERPH	Efluente de reactor productor de hidrógeno
H <sub>2</sub>	Hidrógeno
Hmax	Producción máxima de metano
Rmax	Velocidad máxima de producción de metano
SF	Sólidos fijos o cenizas
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles

## RESUMEN

**Arias García Leonardo Daniel (2019). Co-digestión de *Scenedesmus obtusiusculus* con sustratos ricos en carbono para la producción de biogás. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.**

El uso de biomasa microalgal como sustrato para la producción de biogás resulta una alternativa interesante para aprovechar este tipo de biomasa dado su contenido de materia orgánica. Sin embargo, la biomasa microalgal tiene la desventaja de poseer una pared celular rígida y recalcitrante que evita el aprovechamiento completo de toda la materia orgánica que compone a la microalga, resultando en rendimientos de metano menores a los teóricos. Dentro de las alternativas para aumentar la solubilidad de la pared celular, se encuentran los pretratamientos que ayudan a romper la membrana, alternativamente se puede llevar a cabo la co-digestión de la biomasa. La co-digestión tiene como fundamento aumentar la relación C/N, favoreciendo la producción de metano. En este trabajo se evaluaron dos co-sustratos (efluente de reactor productor de hidrógeno y vinazas tequileras) a diferentes concentraciones (75, 50, y 25% de la demanda química de oxígeno) con biomasa microalgal húmeda para determinar cuál era el mejor co-sustrato. Posteriormente, se analizó cuál era el mejor tipo de biomasa (biomasa húmeda, seca o seca con pretratamiento) y se determinó si existió un sinergismo con el co-sustrato empleado para cada condición. De acuerdo con los resultados obtenidos, el mejor co-sustrato fueron las vinazas tequileras al obtener diferencias significativas con respecto al efluente de reactor productor de hidrógeno. Los valores de producción de metano con los diferentes tipos de de microalga arrojaron un aumento de 31.5% para la condición con 75% de microalga pretratada en co-digestión con vinazas y de 17.4% para la condición de 50% con respecto al control de microalga seca pretratada (100%). La microalga seca pretratada resultó ser la mejor opción respecto a las otras dos (seca sin pretratamiento y húmeda sin pretratamiento), las cuales no presentaron un aumento en la producción de metano experimental con respecto al valor teórico para cada condición.

**Palabras clave:** Biogás, co-digestión, efluente, microalga, vinazas.

## ABSTRACT

**Arias García Leonardo Daniel (2019). Co-digestion of *Scenedesmus obtusiusculus* with carbon rich substrates for the production of biogas. Master of Sciences Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Mexico.**

The use of microalgal biomass as substrate for biogas production is an interesting alternative to harness the organic matter content of this type of biomass. However, microalgal biomass has the disadvantage of having a rigid and recalcitrant cell wall that avoids the complete availability of all the organic matter that constitutes the microalgae, resulting in methane yields lower than the theoretical. Among the alternatives to increase the solubility of the cell wall, there are pretreatments that could help to degrade the membrane, alternatively the co-digestion of biomass can be carried out. Co-digestion is based on increasing the C/N ratio, favoring the production of methane. In this work, two rich carbon co-substrates (effluent of hydrogen producing reactor and tequila vinasses) were used at different proportions (25, 50, and 75% of the chemical oxygen demand) with microalgal biomass to determine what was the best co-substrate to increase methane production. Subsequently, the best type of biomass was analyzed (wet, dry or dry biomass with pretreatment) and it was determined if there was a synergism between the co-substrate used at each condition. According to the results, the best co-substrate was the tequila vinasses compared to the hydrogen producing reactor effluent. The methane production values with the different types of microalgae showed an increase of 31.5% for the condition with 75% of pre-treated microalgae in co-digestion with vinasses and 17.4% for the 50% of pre-treated microalgae condition compared to the control of pretreated dry microalgae (100%). The pretreated microalgae proved to be the best option respect to the other two types (dry microalgae without pretreatment and wet microalgae), which did not show an increase in experimental methane production when compared to the theoretical value for each condition.

**Palabras clave:** Biogas, co-digestion, effluent, microalgae, vinasses.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Metano: Características importantes, usos, y producción

El metano es un compuesto orgánico formado por un átomo de carbono y cuatro átomos de hidrógeno unidos mediante enlaces covalentes (González-Hoyos, 2017). Es el hidrocarburo de cadena más corta y es el principal producto de la descomposición de la materia orgánica en ambientes anóxicos, así como en ambientes acuáticos (Bastviken, 2009). Es el principal componente del gas natural ( $\approx 80\%$ ), posee una constante de Henry de  $1.29 \times 10^{-3} \text{ M atm}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , valor que indica su baja solubilidad en agua, lo que explica la facilidad con la que es liberado al ambiente cuando no es consumido en los humedales y cuerpos de agua con materia orgánica (Bastviken, 2009).

El biogás (llamado así al estar en mezcla con  $\text{CO}_2$ ) con concentraciones mayores al 60%, puede ser utilizado con tres fines diferentes: producción de calor o vapor, generación de electricidad y combustible de vehículos (Blanco et al., 2017). El uso más simple es para la obtención de energía térmica. Se suele utilizar a pequeña escala, como en estufas u hornos pequeños donde se logran alcanzar hasta los  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ . En cambio, para la generación de energía eléctrica se requieren sistemas combinados de calor y electricidad y una concentración de metano mínima de 70% en el gas. Asimismo, se pueden usar celdas de combustible, logrando una conversión del 60% de energía eléctrica y el calor obtenido es utilizado para calentar agua durante el proceso (Blanco et al., 2017). El uso del biogás como combustible para vehículos también es posible y en países como España y Portugal es una práctica común. Para tal fin, el contenido de metano debe ser alrededor de 80% del total del biogás, valor parecido al contenido normal del gas natural. Estos motores funcionan con el mismo principio que los que utilizan diésel o gasolina, al ser ambos de combustión interna, además de que este puede ser complementario al sistema normal de gasolina/diésel. Sin embargo, los vehículos con estos motores han presentado problemas operacionales, principalmente debido al tamaño de los

cilindros contenedores del gas, disminuyendo la capacidad de carga del vehículo (González-Hoyos, 2017).

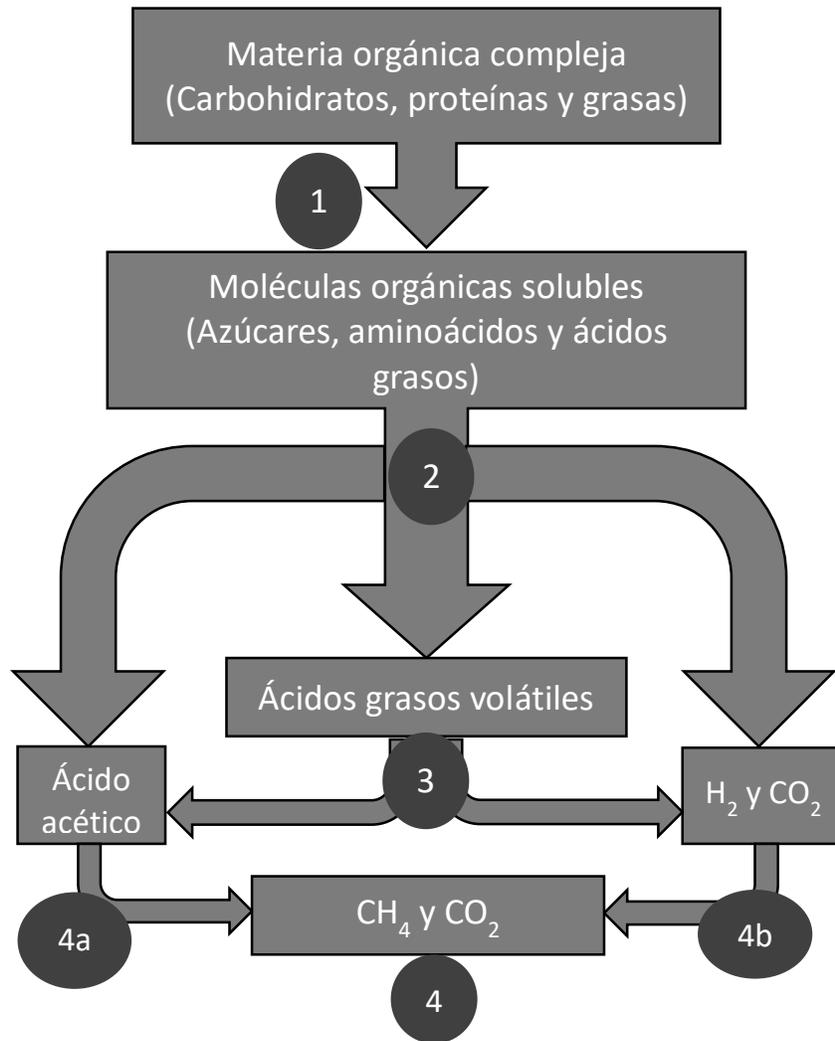
Existen distintos métodos de producción de metano, como lo es el originado por procesos geológicos, el cual se obtiene por la ruptura de materia orgánica a temperaturas y presiones elevadas (Etiope & Sherwood, 2013). También se puede producir a través de reacciones químicas como una hidrogenación de dióxido de carbono, conocido como el proceso Sabatier, hidrogenación de monóxido de carbono, conocido como el proceso Fischer-Tropsch o la protonación de metil-litio o yoduro de metil-magnesio. Por último se encuentra el de origen biológico, donde las arqueas metanogénicas son las encargadas de la producción de metano a partir de materia orgánica ( $\approx 70\%$ ). Este proceso, conocido como digestión anaerobia, ha destacado como una de las mejores alternativas tanto para la producción de metano, como para la degradación de materia orgánica compleja, como por ejemplo la que se encuentra en aguas residuales, desechos orgánicos e incluso biomasa (Siddique y Wahid, 2018). Además, las arqueas metanogénicas son las responsables de la producción de alrededor del 57% del metano atmosférico liberado (Houweling et al., 2008)

## **1.2 Digestión anaerobia**

La digestión anaerobia es un proceso biológico que tiene como finalidad la degradación de materia orgánica mediante consorcios de microorganismos en ausencia de oxígeno, obteniendo como producto final el biogás. Este proceso involucra distintos tipos y especies de microorganismos para cada uno de los pasos de la degradación. En este proceso se distinguen cuatro etapas principales, las cuales fueron propuestas por Kaspar y Whurmman (1978).

La primera etapa se conoce como hidrólisis, seguida por la fermentación (también conocida como acidogénesis), la tercera etapa se denomina acetogénesis y por último la metanogénesis (Figura 1). Durante el proceso de hidrólisis, los compuestos presentes en el sustrato (carbohidratos, lípidos y proteínas principalmente), se

convierten en moléculas más simples y solubles en el exterior de las células, mediante enzimas extracelulares excretadas por los microorganismos hidrolíticos presentes en el inóculo (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Esquema de la digestión anaerobia propuesto por Kaspar y Whurmmman. Los etapas se denotan con números: 1. Hidrólisis, 2. Fermentación o acidogénesis, 3. Acetogénesis, 4. Metanogénesis (Modificado de Gould, 2015).

Una vez que los nutrientes se encuentran como monómeros, son transportados al espacio intracelular de los microorganismos hidrolíticos y fermentativos; los aminoácidos, azúcares, y ácidos grasos son metabolizados mediante el proceso de fermentación, también conocido como acidogénesis. Al mismo tiempo ocurre la degradación de los ácidos grasos de cadena larga mediante el proceso de oxidación

anaerobia, generando ácidos grasos volátiles como intermediarios (propionato, butirato, entre otros), también se puede producir directamente acetato e hidrógeno, los cuales son sustratos que se usan directamente en la metanogénesis. Los compuestos intermediarios deben pasar por una oxidación anaerobia para ser convertidos en acetato e hidrógeno (Figura 1.1), en el proceso conocido como acetogénesis.

El paso final de la digestión anaerobia consiste en la conversión del acetato e hidrógeno en metano por medio de dos vías. Mediante la ruta acetoclástica se produce alrededor de 70% del metano, esta ruta la realizan arqueas metanogénicas acetoclásticas que convierten el acetato en metano y dióxido de carbono. La segunda ruta se conoce como metanogénesis hidrogenotrófica y genera aproximadamente 30% del metano, las arqueas hidrogenotróficas usan hidrógeno como donador de electrones y  $\text{CO}_2$  como aceptor (Ganesh Saratale et al., 2018; Metcalf y Eddy, 2013; Rittmann y McCarty, 2012).

Existen dificultades en puntos específicos del proceso metabólico, siendo la hidrólisis y la metanogénesis los pasos limitantes. La hidrólisis es afectada por la complejidad del sustrato; por ejemplo, si el sustrato contiene muchos sólidos orgánicos complejos (Ma et al., 2013), los cuales impiden el correcto funcionamiento de las enzimas hidrolíticas. Por otro lado, las arqueas metanogénicas son de crecimiento lento, consumen un espectro reducido de sustratos (hidrógeno,  $\text{CO}_2$  y acetato) lo que impacta en la velocidad de producción de metano, recordando que la velocidad más lenta es la que determina la velocidad final del proceso (Moreno et al., 2014).

Además de las limitaciones mencionadas, existen diversos factores que deben ser considerados al llevar a cabo el proceso de digestión anaerobia, como son el pH, temperatura, acumulación de sulfuros, metales pesados, y acumulación de determinados productos metabólicos como el amonio (valores mayores a 4 g  $\text{NH}_4^+$ -N/L), ácidos grasos volátiles (concentraciones mayores a 6 g/L), entre otros (Chen

et al., 2008). Otro aspecto que debe tomarse en cuenta y que pocas veces es debidamente controlado durante la digestión anaerobia es la relación carbono/nitrógeno (C/N), que es el cociente entre las concentraciones de carbono y nitrógeno presentes en el reactor.

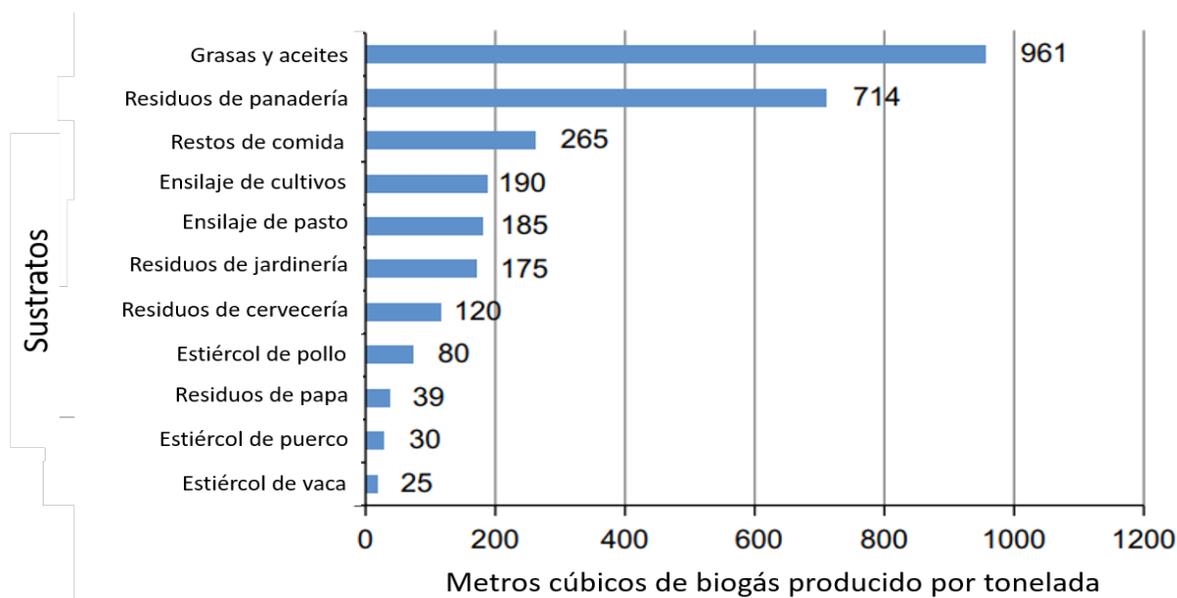
Se considera que la relación C/N para una correcta digestión del sustrato debe encontrarse entre 20 y 30, debido a que con estas concentraciones se garantiza que existen los suficientes nutrientes para los microorganismos, con lo que se maximiza la producción de biogás (Siddique y Wahid, 2018). Cuando existen relaciones por debajo de este valor, se ha detectado que existe un aumento en los niveles de amonio en el proceso, este afecta directamente el valor de pH, lo que permite la formación de iones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y amoniaco libre ( $\text{NH}_3$ ) (Ganesh Saratale et al., 2018). La toxicidad se refleja en la difusión pasiva de  $\text{NH}_4^+$  a través de la membrana celular, lo que se presenta en concentraciones mayores de 4000 mg  $\text{NH}_4^+$ /L a un pH por encima de 7.5 causando un desequilibrio de protones y deficiencia de potasio en las arqueas metanogénicas principalmente (Sialve et al., 2009).

Por otro lado, se ha encontrado que con relaciones C/N mayores a 30 ocurre un incremento en la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), que también impide la producción de metano (valores mayores a 6 g/L) (Ganesh Saratale et al., 2018). El incremento de estos ácidos orgánicos impacta principalmente en una disminución del pH, inhibiendo a las arqueas metanogénicas, cuyo pH ideal está en un rango de 6 a 8 (Siddique y Wahid, 2018).

### **1.3 Fuentes de biomasa aprovechable para la producción de biogás**

Actualmente se buscan sustratos ideales para la producción de biogás mediante digestión anaerobia, que tengan rendimientos elevados de metano, así como que aporten los nutrientes esenciales para mantener a los microorganismos involucrados y que su uso no tenga un impacto ambiental negativo. La biomasa puede ser un sustrato ideal para la digestión anaerobia; de acuerdo con la Real

Academia de la Lengua, la biomasa se define como materia orgánica originada de un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía (RAE, 2019). Dentro de esta clasificación se encuentran la biomasa agrícola y forestal, así como la materia orgánica presente en las aguas residuales y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos principalmente. En la Figura 2 se muestran algunos de los sustratos que se han utilizado para la producción de biogás. Como se observa, existe una gran diferencia en los rendimientos de biogás, la cual se debe principalmente a la composición del sustrato en cuestión. Por ejemplo, el estiércol suele tener gran cantidad de nitrógeno, lo que puede disminuir la producción de biogás por inhibición por amonio, además de que, por su origen, la concentración de nutrientes presentes en el residuo es limitada (Gould, 2015).



**Figura 1.2.** Sustratos empleados en la digestión anaerobia y rendimientos obtenidos (m<sup>3</sup>/Ton) (Modificado de Gould, 2015).

En contraste, los residuos de jardinería carecen de nitrógeno, elemento esencial en la síntesis de proteínas de los microorganismos encargados de realizar la degradación anaerobia.

Además de los sustratos que se muestran en la Figura 2, los lodos residuales o lodos de purga de plantas de tratamiento son otro tipo de biomasa que también puede usarse como sustrato para la digestión anaerobia. Sin embargo, algunos

lodos tienen como desventaja la presencia de metales pesados, dificultando en gran medida su correcta degradación (Xu, et al., 2018). Es por esto que es indispensable tomar en consideración las características físicas, químicas, así como todos los componentes que puede tener el sustrato y que pueden inhibir el proceso de digestión anaerobia al momento de la elección. Otras alternativas de biomasa que han sido utilizadas en el proceso de digestión anaerobia, son los cultivos destinados para tal fin, como el maíz, la caña de azúcar, la soya, semillas oleaginosas, entre otros. Sin embargo, el uso de estos cultivos “dedicados” ha generado polémica debido a que también son fuente de alimento.

#### **1.4 Tipos de biocombustibles**

Los biocombustibles, denominados así debido a que provienen de recursos naturales renovables, representan una opción para disminuir la utilización de combustibles fósiles y las emisiones de CO<sub>2</sub>. Estos biocombustibles se dividen de acuerdo a la fuente de biomasa utilizada para su producción en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación.

##### **1.4.1 Biocombustibles de primera generación**

Los combustibles obtenidos a partir de cultivos alimenticios son conocidos como biocombustibles de primera generación, resaltando principalmente la obtención de etanol mediante procesos fermentativos. Dentro de las ventajas que tiene la utilización de estos sustratos podemos encontrar la alta capacidad de producción de materia prima, ya que la tecnología que suele utilizarse para su producción se encuentra completamente desarrollada, además de presentar un costo competitivo para los combustibles fósiles (Salinas & Gasca; 2009). Por otra parte, existen determinadas circunstancias que complican su establecimiento en ciertas regiones, como son algunos métodos de procesamiento, las limitaciones geográficas para la producción de estos cultivos, el debate entre el destino de estos cultivos, principalmente por preferir la producción de combustible, a pesar de la escasez de alimentos en otras regiones del mundo (Salinas & Gasca; 2009). Dentro del mismo rubro, la sobreexplotación del suelo con fines de producción de materia prima para

la producción de biocombustibles es preocupante, desencadenando en la erosión del mismo.

#### **1.4.2 Biocombustibles de segunda generación**

En los biocombustibles de segunda generación se encuentran los que se producen a partir de residuos lignocelulósicos principalmente, resaltando los residuos de cultivos alimenticios o biomásas de plantas no comestibles. Además de la clasificación básica del sustrato empleado, también se pueden categorizar como bioquímicos y termoquímicos (Salinas & Gasca, 2009). Dentro de las ventajas que presenta esta generación, encontramos que al utilizar residuos de cultivos, existe un excedente de materia prima y puede emplearse en países con gran actividad agrícola, favoreciendo el desarrollo económico de la región (Kagan, 2010). Sin embargo, para la implementación de biorrefinerías de esta generación de biocombustibles, se requiere un alto costo capital, además de la necesidad de avances tecnológicos para el mayor aprovechamiento de estos residuos, ya que suelen existir compuestos recalcitrantes que dificultan su aprovechamiento.

#### **1.4.3 Biocombustibles de tercera generación**

En la búsqueda de reducir las desventajas de las dos generaciones de biocombustibles anteriores, se han propuesto los de tercera generación, los cuales se basan en la integración de metodologías que permiten la producción de materia prima (biomasa), así como la generación de un combustible o un precursor de los mismos (Kagan, 2010). Los biocombustibles de tercera generación tienen la ventaja de que no emplean terrenos cultivables directamente, es decir, no se requiere el cultivo en el suelo, lo que evita la erosión de los mismos y permite un futuro empleo como zona agrícola. La biomasa microalgal es un tipo de materia prima que promete ser el candidato ideal para la producción de biocombustibles de tercera generación. Principalmente, por la disponibilidad de nutrientes en aguas residuales municipales, así como su capacidad de fijación de carbono, lo que se traduce en bajos requerimientos nutricionales. Actualmente la implementación de este tipo de materia prima se encuentra en desarrollo, buscando disminuir los costos en su

implementación y aprovechar completamente este sustrato. A continuación se abordan de manera más extensa las características y ventajas de la utilización de microalgas en la producción de biocombustibles.

### **1.5 Microalgas**

Las microalgas son organismos fotoautótrofos unicelulares, constituidas por 7-23% de lípidos, 6-71% de proteínas y 5-64% de carbohidratos. Estas proporciones varían dependiendo de la especie de microalga, así como de las condiciones de crecimiento (Jankowska et al., 2017). Tienen la capacidad de desarrollarse en diferentes intervalos de temperatura, alta salinidad, y valores de pH, así como crecer en simbiosis con otros organismos (Khan et al., 2018). Pueden ser procariotas, como las cianobacterias (Chloroxybacteria), o eucariotas como las algas verdes (Chlorophyta) (Gómez Luna, 2007).

Es importante aclarar las diferencias entre una cianobacteria y una microalga ya que sus características son muy parecidas. Ambas son organismos de tamaño pequeño (microscópicos), unicelulares, que poseen pigmentos fotosintéticos y suelen ser fotoautotróficos (Olaizola 2003). Sin embargo, la principal diferencia entre las microalgas y las cianobacterias, es que las microalgas poseen clorofila *a*, pigmento que les otorga su característica coloración verde y en segundo lugar, también poseen otros pigmentos específicos que les permiten realizar la fotosíntesis oxigénica como la ficobilina y algunos carotenoides como la astaxantina y la cantaxantina, los cuales son de gran interés como suplementos alimenticios en acuicultura (Gómez-Luna, 2007; Minhas, et al., 2016). Otra diferencia es la capacidad de las cianobacterias de fijar nitrógeno atmosférico, capacidad de la cual carecen las microalgas (Richmond & Hu, 2013).

#### **1.5.1 Clasificación taxonómica y especies de microalgas de importancia biotecnológica**

Anteriormente la clasificación de microalgas se basaba en características fenotípicas como la morfología, anatomía celular, metabolismo y fisiología, lo que

se reflejaba en pocas especies descritas. Posteriormente se agregaron características que permitieron distinguir entre especies, como son la pigmentación, la naturaleza química de los productos fotosintéticos, organización de tilacoides, estructura de la membrana, así como la clasificación genética de cada microorganismo (Metting, 1996). De acuerdo a esto, existe un solo grupo de microalgas incluida dentro del grupo de las procariotas, que se conocen como cianobacterias, mientras que en el caso de las eucariotas, existen al menos 10 grupos de microalgas clasificadas (Murphy et al., 2015). Dentro de estos grupos, destacan los géneros *Chlorella*, *Dunaliella*, *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Euglenela*, entre otras (Ganesh Saratale et al., 2018).

### 1.5.2 Cultivo de microalgas

Para la producción de biomasa microalgal se usan cepas o consorcios de microalgas aislados de aguas naturales. Estos consorcios se cultivan en fotobiorreactores los cuales son contenedores para la producción de microalgas, que se clasifican en sistemas de cultivo abiertos y cerrados (Murphy et al., 2015). Los sistemas abiertos se emplean principalmente para la producción a gran escala, destacando el reactor tipo *raceway*, como el que se muestra en la Figura 1.3. Este sistema permite un mayor aprovechamiento de la energía solar, pero a diferencia de los sistemas cerrados, no garantiza el crecimiento exclusivo de una cepa (Medipally et al., 2015).



**Figura 1.3.** Sistema de cultivo abierto tipo *Raceway*.

Los sistemas cerrados consisten principalmente en tubos o bolsas fabricadas de materiales transparentes (cristal o plástico principalmente), que permiten el suministro adecuado de luz al cultivo. Como se mencionó anteriormente, este sistema permite el monocultivo de microalgas, lo que permitiría la caracterización y uso exclusivo de una sola especie con fines bioenergéticos, alimenticios o farmacéuticos, según sea el caso (Mallick et al., 2016). Se muestra un ejemplo de sistema cerrado en la Figura 1.4.



**Figura 1.4.** Sistema de cultivo cerrado.

Otra de las ventajas que ofrecen estos sistemas de cultivo, es que es posible la utilización de aguas residuales municipales, lo que permite hacer más barato el proceso (Jankowska, et al., 2017). Dentro del rubro nutricional requiere de fósforo y nitrógeno, elementos que se encuentran en gran abundancia en el agua residual municipal, lo que facilita el suministro de los mismos. Es importante mencionar que, dependiendo del fin con el que sean utilizadas las microalgas, se pueden manipular condiciones durante su cultivo para aumentar la producción de lípidos, proteínas, o carbohidratos.

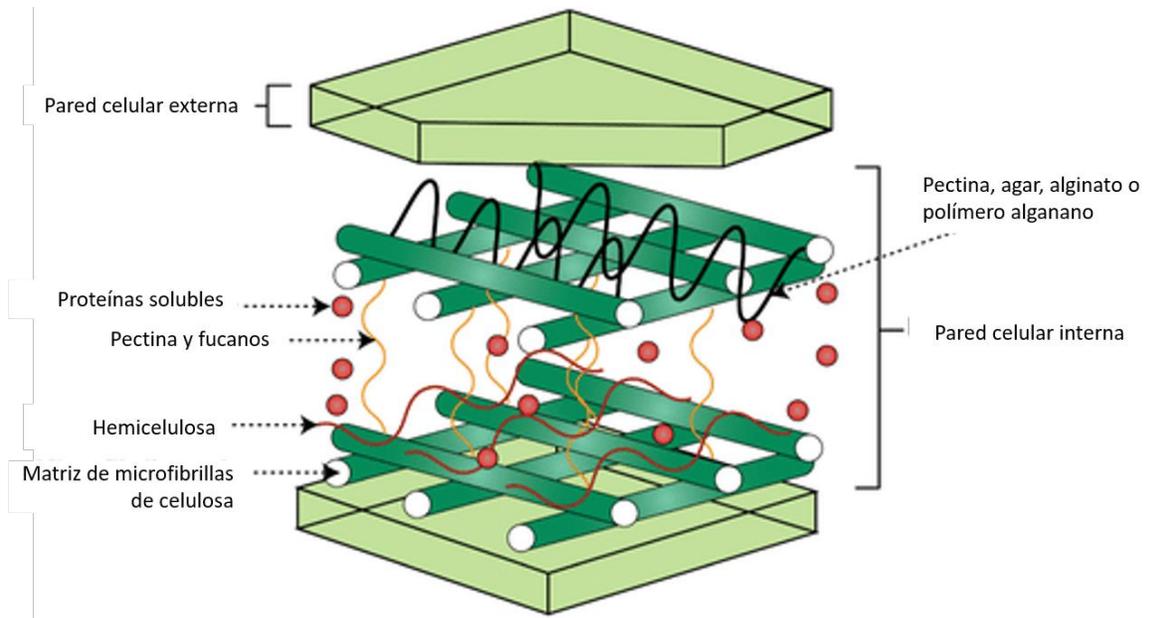
Si se quiere favorecer la producción de lípidos, se ha demostrado que el aumentar la salinidad en el medio tiene un efecto positivo en este rubro, a diferencia de si el objetivo es una mayor producción de proteínas se debe aumentar la cantidad de

nitrógeno al medio de cultivo. Por otra parte, a diferencia de los cultivos dedicados para la producción de biocombustibles de primera generación, estos microorganismos no consumen nutrientes del suelo, los cuales pueden ser utilizados en el futuro para cultivo de alimentos para la población, además de su tasa de crecimiento, ya que su tiempo de duplicación es alrededor de 3.5 horas (Ganesh Saratale et al., 2018). Una de las características importantes por lo que se ha mostrado interés en la utilización de microalgas, es debido a su capacidad de fijar CO<sub>2</sub> y utilizarlo como fuente de carbono. Particularmente el género *Scenedesmus* y *Chlorella* poseen la capacidad de tolerar concentraciones de CO<sub>2</sub> arriba del 50% y mantener su velocidad de crecimiento elevada (Jankowska et al., 2017).

### **1.5.3 Composición bioquímica y pared celular**

La pared celular de las microalgas está compuesta principalmente de celulosa y hemicelulosa, enriquecida con polisacáridos y proteínas solubles como pectina, agar, alginato y glicoproteínas en las matrices microfibrilares de celulosa. Esta composición le da gran rigidez y recalcitrancia, lo que disminuye la biodegradabilidad de esta biomasa. En la Figura 1.5 se muestra un esquema general de la pared celular de las microalgas.

La composición general de las microalgas está fuertemente definida por el porcentaje de pared celular, así como en porcentaje de masa total dependiendo de la especie que se trate (Torres et al., 2013), por ejemplo, de acuerdo con Domozych y colaboradores (1980), en *Klebsormidium flaccidum* la pared celular representa el 36% de la composición total y esta a su vez, contiene un 38% de carbohidratos y 22.6% de proteínas. En la Tabla 1.1 se presentan algunas especies de microalgas, su composición y el porcentaje de pared celular que estas contienen.



**Figura 1.5** Composición de la pared celular microalgal (Modificado de Zabed et al, 2019)

#### **1.5.4 Ventajas de la utilización de biomasa microalgal para la producción de biogás**

Gracias a su alto contenido de carbono, las microalgas pueden ser utilizadas como suplementos alimenticios, ingredientes farmacéuticos y cosméticos, así como biomasa para biocombustibles. En este último uso, se aprovecha la capacidad de captura de CO<sub>2</sub> que realizan estos microorganismos, donde se sabe que tienen una alta capacidad de fijación de dióxido de carbono atmosférico: 1.82 kg de CO<sub>2</sub>/kg de biomasa seca (Hadiyanto et al., 2012), debido a que este gas es utilizado como fuente de carbono. En comparación con la eficiencia de fijación de carbono de las plantas, se ha determinado que las microalgas poseen de 10 a 50 veces mayor eficiencia (Toledo-Cervantes et al., 2013).

Otras ventajas son que el cultivo de microalgas no requiere la utilización de suelo agrícola y la subsecuente erosión del mismo. La implementación de fotobiorreactores no genera una disminución en la calidad del suelo y podría ser conectado directamente a tubos emisores de gas de combustión para disminuir la liberación de dióxido de carbono a la atmósfera.

**Tabla 1.1** Porcentaje de pared celular en peso seco y composición bioquímica (Modificado de Torres et al., 2013)

Microalga	Pared celular (% w/w)	Composición pared celular (%)			Referencias
		Carbohidratos	Proteínas	N.D	
<i>Chlorella Vulgaris</i>	20.00	30.00	2.46	67.45	(Abo-Shady et al., 1993)
<i>Scenedesmus obliquos</i>	ND	39.00	15.00	46.00	(Blumreisinger et al., 1983)
<i>Monoraphidium braunii</i>	ND	47.00	16.00	37.00	(Blumreisinger et al., 1983)
<i>Pleurastrum terrestre</i>	41.0	31.50	37.30	31.20	(Domozych et al., 1980)
<i>Kirchneriella lunaris</i>	23.0	75.00	3.96	21.04	(Abo-Shady et al., 1993)
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	36.7	38.00	22.60	39.40	(Domozych et al., 1980)

(%w/w): porcentaje peso/peso; N. D. No determinado.

Además estos reactores permiten la utilización de aguas residuales municipales como medio de cultivo para la remoción de nitrógeno, fósforo, carbono, azufre, potasio, sodio, hierro, magnesio, calcio y otros elementos traza de las mismas (Zhou et al., 2012). Es de gran importancia mencionar que deben de cubrirse algunos puntos clave en la producción de biocombustibles a partir de microalgas si el objetivo es comercializarlos. Los medios de cultivo deben ser económicos, es por esto que en muchas investigaciones de cultivo de microalgas se busca usar agua residual o agua residual tratada. Los sistemas de cultivo de las microalgas deben de ser de bajo costo, de fácil instalación y mantenimiento. La fuente de carbono deberá ser suficiente para un crecimiento óptimo de las microalgas; asimismo, los métodos para cosecharlas deberán ser eficientes, de esta manera el proceso de producción de biocombustibles usando biomasa microalgal podría ser rentable (Cai et al., 2013). Tomando en cuenta las características mencionadas, podríamos considerar que la biomasa microalgal es una muy buena opción para utilizarla como sustrato en la digestión anaerobia, pero también tiene sus limitantes.

### 1.5.5 Desventajas de la utilización de biomasa microalgal

Dentro de las principales desventajas que no permiten la implementación de las microalgas como sustrato a gran escala están la gran variabilidad en la composición de las microalgas, así como los factores que la alteran (incluso aunque se trate de la misma especie), los problemas que enfrenta el desarrollo de técnicas para el cultivo de una sola especie, así como la baja eficiencia de biodegradabilidad de componentes específicos de la microalga por la presencia de celulosa y otros compuestos en procesos de mono-digestión anaerobia (Brennan y Owende, 2010; Ganesh Saratale et al., 2018; Jankowska et al., 2017). La difícil degradación de la biomasa microalgal se debe principalmente a la composición compleja de la pared celular. En el género *Scenedesmus*, por ejemplo, se ha demostrado la presencia de multicapas de celulosa y hemicelulosa, así como la presencia de una capa exterior compuesta de esporopolenina y politerpenos, los que generan una resistencia elevada a la biodegradación (Zhang et al., 2018). La esporopolenina es un biopolímero hidrocarbonoso que está compuesto de ácidos grasos mono y di-insaturados, unidos por enlaces tipo éter, éster y glucosídicos. La presencia de este compuesto aumenta la resistencia a la degradación mediante técnicas de ruptura celular como la hidrólisis mecánica, enzimática y química. (Alhattab et al., 2019).

Toledo-Cervantes y colaboradores (2018), caracterizaron la especie de *Scenedesmus obtusiusculus*, esto debido a su capacidad de tolerancia al CO<sub>2</sub> (10%). Dicho estudio reportó una composición de 18.3 ± 2.1% de carbohidratos, 19.2 ± 3.5% de lípidos, un 51.3 ± 1.8% de proteínas y un 8.2 ± 1.1% de elementos inorgánicos. Dado que esta microalga es la fuente de biomasa elegida para este proyecto, se debe considerar el alto contenido de proteínas, lo que se traduce en una mayor concentración de nitrógeno que impacta en la relación C/N, por lo que se debe poner especial atención en la generación de amonio si se quiere llevar a cabo una correcta digestión anaerobia. Una opción para evitar la inhibición de los microorganismos por el amonio, que eventualmente se produciría, es aumentar la concentración de carbono en el proceso, es decir, modificar la relación C/N para tener una cercana a la ideal. La forma más práctica de incrementar la relación C/N

es mediante una metodología llamada co-digestión, que involucra la adición de un segundo sustrato, y se presenta con más detalle a continuación.

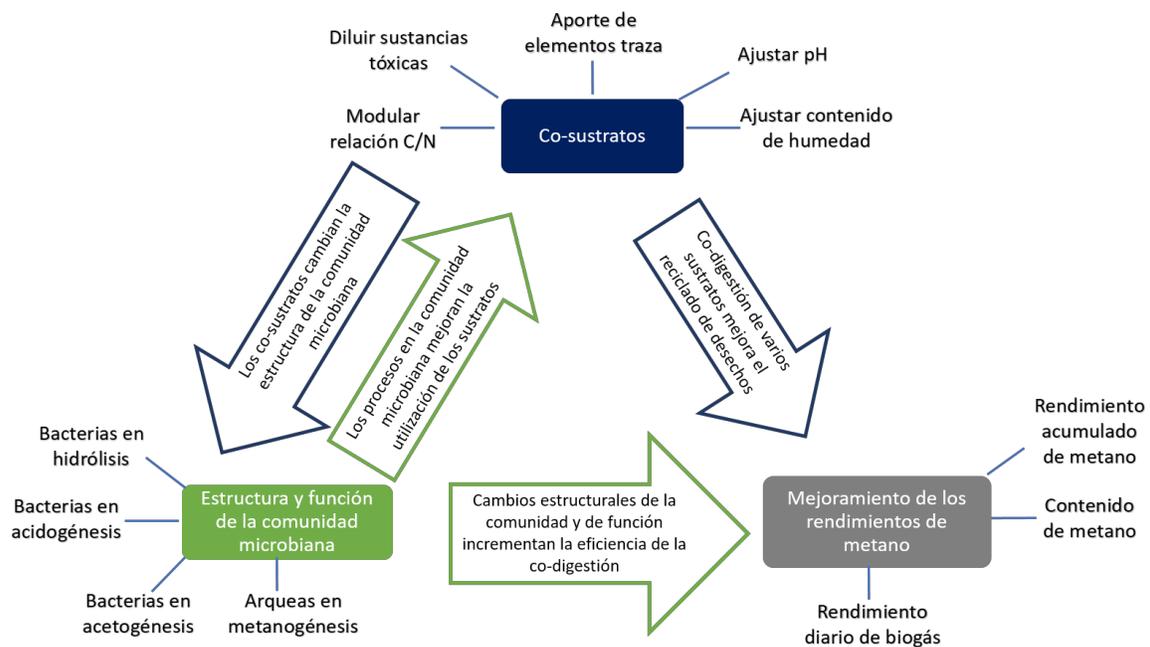
### **1.6 Co-digestión de materia orgánica compleja**

Ante las bajas tasas de degradabilidad de algunos compuestos sometidos a digestión anaerobia, se ha empleado un procedimiento denominado co-digestión. Este proceso, también llamado “co-fermentación”, consiste en la digestión simultánea de dos o más sustratos diferentes o residuos en un mismo reactor o digestor (Shah et al., 2015). El principio básico de esta técnica consiste en aminorar los problemas que presenta la digestión anaerobia con un solo sustrato, como son la presencia de sustancias inhibitorias, aumento de la concentración de nutrientes y la adecuación de la relación C/N presente en el reactor con el fin de aumentar la producción de biogás en el proceso. Se sabe que los sustratos con alta concentración de proteína tienen relaciones C/N bajas, lo que complica la digestión de los residuos, ya que estos valores indican que existirá alta formación de amonio en el reactor, inhibiendo el proceso. Se recomienda tener una relación C/N en el digestor de 20-35 (Ganesh Saratale et al., 2018). Por otra parte, la co-digestión cambia la dinámica de la población microbiana en el reactor; por ejemplo, cuando se trata de un sustrato semisólido y se agrega un co-sustrato líquido, se favorece la producción de metano debido al cambio en la hidrodinámica del medio y transferencia de masa, lo que se traduce en una sinergia de biodegradación de ambos sustratos (Yu et al., 2013).

En la co-digestión es importante tener en cuenta que el co-sustrato debe cumplir ciertas características para que el proceso se lleve a cabo de manera satisfactoria. Estas características son una alta biodegradabilidad, alta relación C/N (si se trata de un co-sustrato biológico, que tenga baja concentración de proteínas), baja concentración de azufre, que posea un alto potencial de metanización, que tenga una alta capacidad buffer que permita amortiguar cambios drásticos de pH y que sea de bajo costo (Shah et al., 2015; Xie et al., 2016).

Los ensayos de co-digestión han logrado aumentar considerablemente los valores de metano al agregar un co-sustrato, como lo obtenido por Zheng y colaboradores (2015), quien evaluó la co-digestión de estiércol de vaca con pasto, y logró un aumento del 39% en una relación 50%-50%. Por otra parte, Jason (2015), obtuvo un aumento de 24% al co-digerir residuos alimenticios con microalgas identificadas como *Chlorella vulgaris*.

En la Figura 1.6 se muestran las interacciones específicas que pueden ocurrir entre el sustrato y la comunidad microbiana en los procesos de co-digestión. Dentro de las mejoras que ofrece el uso de un co-sustrato son la dilución de sustancias tóxicas presentes en el reactor. Algunos de estos compuestos inhibitorios son el amonio, ácidos grasos volátiles, ácidos grasos de cadena larga, fenol, sulfuro, y metales pesados, los cuales son inhibitorios de bacterias y arqueas presentes en el proceso. Las interacciones podrán llevarse a cabo, siempre y cuando el co-sustrato no contenga alguno de estos compuestos inhibitorios.



**Figura 1.6** Esquema que ilustra las interacciones que ocurren al llevar a cabo un proceso de co-digestión (Modificado de Xu et al., 2018).

El ajuste de humedad y de la comunidad microbiana son elementos importantes a considerar, ya que sustratos que contienen un porcentaje mayor al 65% de humedad, han logrado incrementar considerablemente la producción de metano (Xu et al., 2018). El aumento en la humedad impacta principalmente en la comunidad microbiana, de acuerdo al análisis realizado por Wu y colaboradores (2016). Ellos utilizaron desperdicio de col, la cual presentaba un 90% de agua y lograron observar un aumento en la producción de metano, asociándolo al aumento de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* en la población microbiana, así como una disminución en la población de *Proteobacteria*. El phylum *Firmicutes* tiene la capacidad de degradar sustratos lignocelulósicos, así como ricos en carbohidratos.

El ajuste de pH se debe principalmente a la presencia de capacidad buffer en el co-sustrato empleado. Esto ha sido observado al añadir pajas y estiércol como co-sustrato. Las poblaciones microbianas en este tipo de procesos son muy sensibles a los cambios bruscos de pH, causando inhibición en la función metabólica de los microorganismos, lo que genera una disminución evidente en la producción de biogás (Murto et al., 2004).

## **1.7 Estado del arte de la digestión anaerobia de biomasa microalgal**

### **1.7.1 Mono-digestión**

Investigaciones recientes acerca de la utilización de biomasa microalgal como sustrato para la digestión anaerobia, destacan de manera específica que la producción de metano resulta ser eficiente y económica. Las principales especies sometidas a digestión anaerobia se muestran en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2** Rendimiento de metano a partir de distintos géneros de microalgas sometidas a digestión anaerobia en lote a escala laboratorio.

<b>Alga utilizada</b>	<b>Rendimiento de metano</b>	<b>Referencia</b>
<i>Scenedesmus sp.</i>	81.8 mL CH <sub>4</sub> /g DQO	(González-Fernández et al., 2015)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	318 mL CH <sub>4</sub> /g VS	(Beltrán et al., 2016)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	287 mL CH <sub>4</sub> /g VSS	(Mussgnug et al., 2010)
Mezcla de microalgas	110 mL CH <sub>4</sub> /g VSS	(Passos et al., 2014)
<i>Dunaliella salina</i>	505 mL CH <sub>4</sub> /g VSS	(Mussgnug et al., 2010)

Dentro del grupo de trabajo, se ha evaluado la producción de biogás con biomasa microalgal seca de *Scenedesmus obtusiusculus* mediante mono-digestión en lote de cuatro maneras distintas: sin pretratamiento y con pretratamiento térmico (Cortés-Carmona et al., 2018), pretratamiento termo-ácido (Rincón-Pérez et al., 2019) y con pretratamiento termo-alcálico (Candia et al., 2019). Para las dos primeras condiciones, se obtuvieron rendimientos de metano de 109.3 y 192.7 mL/g sólido volátil (SV) añadido, respectivamente. Para la tercera condición se evaluó el pretratamiento con ácido clorhídrico al 3% a 105°C por 1.5 horas y se realizaron pruebas de potencial bioquímico de metano en dos secciones, se utilizó exclusivamente la fracción soluble del pretratamiento y la segunda con la fracción particulada del mismo. El pretratamiento logró un aumento en la solubilidad de DQO total del 60% y los valores de producción de metano obtenidos fueron de 460.8 mL/L de reactor para la fracción soluble y 318 mL CH<sub>4</sub>/L de reactor para la fracción particulada. Para la condición termo-alcálica, se evaluaron 3 diferentes compuestos a diferentes proporciones. Las soluciones alcálicas utilizadas fueron óxido de calcio (CaO) al 10 y 15%, hidróxido de sodio (NaOH) al 2.0 y 5%, y peróxido de hidrógeno alcálico (PHA) al 1.5, 2.0 y 2.5%. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la solubilización de DQO en todos los pretratamientos de 10.54 a 19.54%, resaltando el pretratamiento con CaO en ambas concentraciones (18.06 y 19.54%, respectivamente). Para la producción de metano se obtuvieron valores entre 206.3

y 156.7 mL CH<sub>4</sub>/g SV, resultando que con NaOH 5% se logró el mejor rendimiento: 206.3 mL CH<sub>4</sub>/g SV.

### **1.7.2 Co-digestión de biomasa microalgal**

Entre los principales co-sustratos para la digestión de la biomasa microalgal se encuentran paja de maíz, paja de cebada, lodos residuales, agua residual municipal, suero de leche, papel, entre otros. Se ha observado un aumento notable en la producción de metano con el uso de estos residuos como co-sustratos (Tabla 1.3), en su mayoría en procesos en lote, lo que apunta a que esta tecnología va en la dirección correcta. Es importante mencionar que existen otros factores para garantizar que el proceso se lleve a cabo de forma satisfactoria y se logre la metanización de ambos sustratos por el inóculo presente (Ganesh Saratale et al., 2018). Dentro de estos factores se encuentran la tasa de degradabilidad de las microalgas que se han analizado. *Clamydomonas* es de las especies que se le ha estudiado más, utilizándola en procesos de digestión anaerobia debido a que presenta una pared celular compuesta de glicoproteínas, lo que le confiere menos resistencia en comparación con otras especies, como *Scenedesmus*, debido a la presencia de esporopolenina (Mussgnug et al., 2010).

**Tabla 1.3.** Procesos de co-digestión de biomasa microalgal con diferentes co-sustratos.

<b>Microalga</b>	<b>Co-sustrato</b>	<b>Proceso</b>	<b>Rendimiento co-digestión</b>	<b>Relación C/N</b>	<b>Referencia</b>
<i>Scenedesmus</i> sp y <i>Chlorella</i> sp	Residuos alimenticios	Lote	639.8 mL CH <sub>4</sub> / g VSS	No reportada	(Zhen et al., 2016)
<i>Scenedesmus</i> sp y <i>Chlorella</i> sp	Residuos papelera	Semi-continuo	1170 mL CH <sub>4</sub> / d	18	(Yen y Brune, 2007)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Grasas y aceites	Semi-continuo	0.54 mL CH <sub>4</sub> / gVSS*d	No reportada	(Park y Li, 2012)
<i>Chlorella</i> sp	Residuos alimenticios	Lote	116.1 mL CH <sub>4</sub> / gVSS	No reportada	(Kim y Kang, 2015)
<i>Isochrysis galbana</i>	Lodo aguas residuales	Lote	392 mL CH <sub>4</sub> / gVSS	No reportada	(Caporgno et al., 2015)
<i>Botryococcus braunii</i>	Residuos de lodo activado y glicerol	Lote	355 mLCH <sub>4</sub> / gVSS	No reportada	(Neumann et al., 2015)
<i>Chlorella</i> sp y <i>Monoraphidium</i> sp.	Paja de trigo	Lote	289 mL CH <sub>4</sub> / gVSS	26.4	(Solé-Bundó et al., 2017)
<i>Chlorella</i> sp	Lodos activados	Lote	468 mL CH <sub>4</sub> / gVSS	No reportada	(Wang et al., 2013)
<i>Dunaliella salina</i>	Residuos sólidos de molino de oliva	Lote	285 mL CH <sub>4</sub> / gVSS	22	(Fernández-Rodríguez et al., 2014)

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Planteamiento del problema**

La utilización de biomasa microalgal como sustrato en la digestión anaerobia tiene alto potencial para la producción de biogás, pero presenta algunos inconvenientes en su uso. Uno de los más importantes es la composición global de la misma, ya que durante el proceso de digestión anaerobia el alto contenido de proteínas impacta en la relación C/N, en detrimento de la metanogénesis por el amonio generado al llevar a cabo el proceso a una relación C/N por debajo de la recomendada (20-30, Siddique y Wahid, 2018). Además, el amonio que se genera de la degradación de las proteínas puede resultar tóxico a concentraciones mayores de 4000 mg/L (Sialve et al., 2009). Aunado a la baja relación C/N, en el caso específico de *Scenedesmus* la presencia de compuestos en la pared celular, como por ejemplo la celulosa y esporopolenina, disminuye la degradabilidad anaerobia de las microalgas debido a la baja capacidad de los consorcios anaerobios de metabolizarlas. Los inconvenientes antes mencionados impactan en los valores obtenidos de rendimientos de metano, que son menores a los valores teóricos que se calculan a partir de la composición elemental de las microalgas, y que se encuentran alrededor de 180 mL CH<sub>4</sub>/g SV hasta 480 mL CH<sub>4</sub>/g SV dependiendo de la especie de microalga (Ganesh Saratale et al., 2018)

### **2.2 Justificación**

La implementación de metodologías que permitan el máximo aprovechamiento de la biomasa microalgal puede ayudar a promover su papel como un sustrato ideal para la digestión anaerobia y subsecuente producción de metano. Con base en la composición macromolecular de *Scenedesmus obtusiusculus* (Toledo-Cervantes et al., 2018), y con la ayuda de la interfaz web OBA (Hafner et al., 2018), se puede calcular el potencial de producción de metano teórico, obteniendo 560 mL CH<sub>4</sub>/g VSS, por lo que es necesario optimizar el proceso de digestión. La capacidad de la biomasa microalgal de capturar CO<sub>2</sub>, dada la problemática ambiental actual es un punto a recalcar para la utilización de este sustrato, el cual nos proporciona un

balance de carbono favorable, en comparación con la utilización de recursos fósiles, donde la quema de los mismos libera CO<sub>2</sub> que no se encontraba de manera natural en la atmósfera.

Este trabajo se inserta dentro del Clúster Biocombustibles Gaseosos en donde se ha propuesto un esquema de biorrefinería, en el cual el aprovechamiento de los residuos es un paso fundamental para lograr la sustentabilidad del proceso. Dentro de este esquema, se propone la producción de biomasa microalgal a partir de la purificación del biogás, evitando las emisiones de CO<sub>2</sub> y permitiendo cerrar el ciclo. En este trabajo se plantea la utilización de residuos ricos en carbono, vinazas tequileras y efluente de un reactor de producción de hidrógeno, lo que también permitiría disminuir los residuos producidos dentro de un esquema de biorrefinería. Este proyecto plantea modificar la relación C/N mediante la utilización de desechos ricos en carbono, para aumentar la degradación anaerobia de biomasa microalgal e incrementar la producción de biogás.

### **2.3 Hipótesis**

Dado que la relación C/N es un factor determinante del rendimiento de metano en la digestión anaerobia de materia orgánica y que la relación C/N de la biomasa microalgal es menor a la sugerida para una adecuada digestión (< 20), la adición de un co-sustrato rico en carbono permitirá aumentar la producción de biogás a partir de biomasa microalgal.

### **2.4 Objetivo General**

Llevar a cabo la co-digestión de biomasa microalgal con co-sustratos con alto contenido de carbono tales como las vinazas y el efluente de reactor productor de hidrógeno, para incrementar la producción de biogás.

### 2.4.1 Objetivos particulares

- Determinar el potencial de producción de metano de biomasa microalgal húmeda de *Scenedesmus obtusiusculus* con distintas proporciones de co-sustrato para establecer con cual se logra el mayor rendimiento de biogás.
- Determinar si el co-sustrato con el que se obtuvo mayor rendimiento de metano en co-digestión con la biomasa microalgal húmeda tiene el mismo efecto con biomasa microalgal seca.
- Evaluar el efecto de un pretratamiento termoquímico sobre la biomasa microalgal seca, para determinar si éste tiene un efecto positivo en la producción de metano, comparado con la biomasa microalgal sin tratar.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Biomasa microalgal**

La biomasa microalgal utilizada para esta investigación fue proporcionada por el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa, identificada como *Scenedesmus obtusiusculus*. La biomasa fue cultivada en un estanque tipo *raceway* con gases de combustión en un invernadero y cosechada utilizando poliacrilamida como floculante. La biomasa húmeda se recibió decantada y se mantuvo en congelación hasta su uso; en lo sucesivo esta biomasa se denominará biomasa microalgal húmeda.

La biomasa seca fue producida de la misma manera que la biomasa húmeda, pero esta fue sometida a un proceso de secado en una estufa de secado a 60 °C por 1 semana. Posterior a esto, fue molida y almacenada a temperatura ambiente hasta su uso.

#### **3.2 Caracterización de la biomasa microalgal**

La biomasa microalgal se caracterizó mediante la cuantificación de los siguientes parámetros: demanda química de oxígeno (DQO), sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) de acuerdo a los métodos estándar (APHA, 2005). Además se determinó la composición bioquímica de *Scenedesmus obtusiusculus*, mediante el contenido de carbohidratos por el método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), el contenido de lípidos por el método de lípidos neutros (Anschau et al., 2017), así como el contenido de proteínas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). También se evaluó el contenido de carbono y nitrógeno presente en la microalga mediante un analizador elemental (COSTECH, ECS 4010).

#### **3.3 Inóculo**

Se utilizó lodo granular metanogénico proveniente de una planta de tratamiento anaerobia de vinazas tequileras, el lodo fue amablemente proporcionado por “Casa Herradura” (Jalisco, México). El lodo anaerobio se caracterizó mediante el contenido de SV y ST, además se determinó su actividad metanogénica específica. El lodo se mantuvo en medio mineral sin sustrato a temperatura ambiente hasta su uso.

### **3.4 Co-sustratos**

En este trabajo se emplearon dos co-sustratos para llevar a cabo los ensayos de co-digestión. Los co-sustratos se eligieron con base en el contenido de materia orgánica disuelta fácilmente biodegradable. Uno de los co-sustratos fue el efluente de un reactor productor de hidrógeno (ERPH), el cual fue recolectado de un reactor operado en continuo para producir hidrógeno a partir de la fermentación oscura del hidrolizado de bagazo de agave con una mezcla de enzimas (Valencia-Ojeda, 2019). Antes de su uso, este efluente también fue caracterizado mediante el contenido de DQO, ST y SV, contenido de carbohidratos y ácidos grasos volátiles. Durante el estado estable del reactor a una carga orgánica de 40 g DQO/L\*d, se colectó una muestra puntual (300 mL) de efluente fresco, la muestra se almacenó en recipientes de plástico y se congeló (-20 °C) hasta su uso.

El segundo co-sustrato que se evaluó fueron vinazas tequileras, estas vinazas fueron proporcionadas también por la empresa “Casa Herradura”. Para su caracterización, se determinó el contenido de DQO, SV y ST, así como el contenido de carbohidratos. Una vez caracterizadas las vinazas se envasaron en recipientes de plástico y se mantuvieron en congelación (-20 °C) hasta su uso.

### **3.5 Medio mineral para cuantificar la actividad metanogénica y el potencial de metano.**

Para todos los ensayos en lote, se utilizó el medio mineral reportado por Montiel Corona (2018) que se compone de: 0.250 g/L de  $K_2HPO_4$ ; 0.280 g/L de  $NH_4Cl$ ; 0.83 g/L de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 0.010 g/L de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0.1 g/L de extracto de levadura y 1 mL solución de elementos traza. La solución de elementos traza contiene: 1 g/L de EDTA; 2 g/L de  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ; 0.5 g/L de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ; 0.05 g/L de  $H_3BO_3$ ; 0.05 g/L de  $ZnCl_2$ ; 0.036 g/L de  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 0.09 g/L de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ; 0.093 g/L de  $NiCl_3 \cdot 6H_2O$ ; 2 g/L de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 0.09 g/L de  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0.227 g/L de  $NaSeO_3 \cdot 10H_2O$ ; 1 mL HCl. Se utilizó bicarbonato de sodio para ajustar el pH.

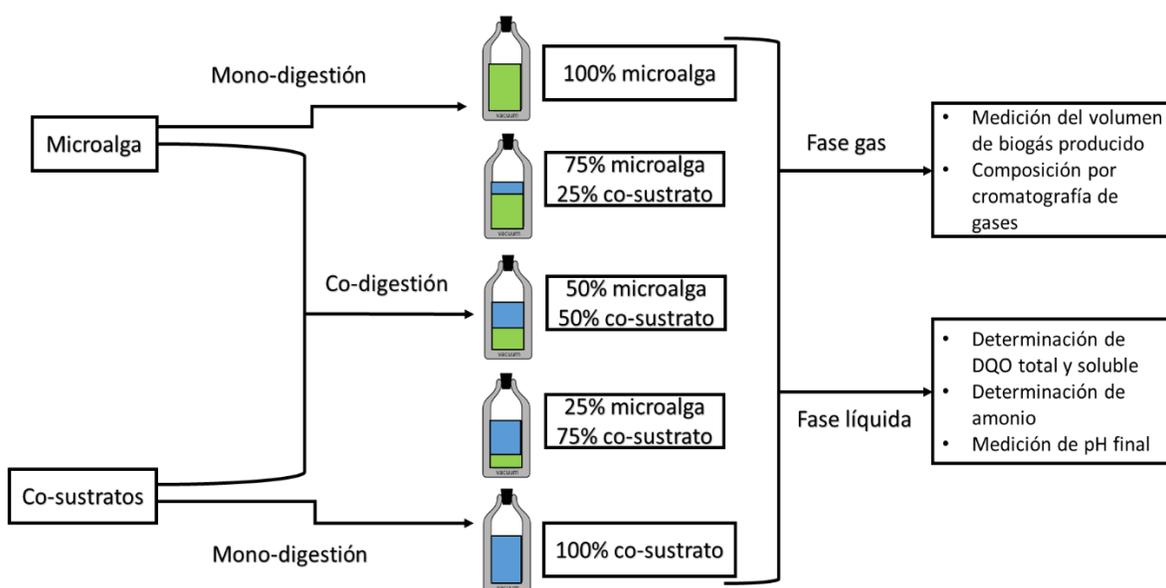
### **3.6 Cuantificación de la actividad metanogénica acetoclástica**

La actividad metanogénica acetoclástica específica del lodo anaerobio se realizó en ensayos en lote. Cada ensayo se hizo en botellas de vidrio de 120 mL, con un volumen de trabajo de 60 mL y 48 mL de espacio de cabeza (fase gaseosa). En cada ensayo se colocaron 54 mL de medio mineral, lodo metanogénico a una concentración de 2 g SV/L, acetato como sustrato a una concentración de 1 g DQO/L y el pH se ajustó a 7-7.5. Los ensayos se llevaron a cabo con una temperatura de 37 °C con agitación de 120 rpm. El volumen de biogás producido se cuantificó mediante el método de desplazamiento de volumen, el cual consiste en la liberación del gas contenido en las botellas a una bureta invertida llenada previamente con agua destilada a pH 2 para evitar la solubilización del CO<sub>2</sub>, esto con la ayuda de una aguja y una manguera impermeable a gases. La composición del biogás se determinó mediante cromatografía de gases. Tanto el volumen como la composición del gas se determinaron en intervalos de 4 horas, hasta que el volumen acumulado de biogás se mantuvo constante. Se incluyó un control sin sustrato (control endógeno), solo con lodo granular para cuantificar la producción endógena de biogás. La diferencia del volumen de biogás producido entre los ensayos con acetato y el control endógeno se consideró como el volumen producido por cada ensayo. La actividad acetoclástica metanogénica se obtuvo de la pendiente al graficar el volumen acumulado de metano contra el tiempo, entre el contenido de sólidos volátiles.

### **3.7 Determinación del potencial de producción de metano mediante co-digestión.**

Para evaluar el potencial de producción de metano mediante co-digestión, se mezclaron distintas proporciones de biomasa microalgal húmeda con cada uno de los co-sustratos propuestos (vinazas y ERPH), en dos proporciones diferentes: 75% microalga-25% co-sustrato y 50% microalga-50% co-sustrato, 25% microalga-75% co-sustrato, con base en la DQO total que el ensayo requiere (5 g DQO/L). El potencial de producción de metano se realizó en botellas serológicas de 120 mL, con un volumen de trabajo de 72 mL, una concentración de DQO total de 5 g DQO/L

y una concentración de inóculo (lodo granular) de 10 g SV/L. Debido a que la microalga húmeda no se lograba dispersar bien en el medio debido a la formación de flóculos, fue necesario agitar con la ayuda de un agitador magnético por al menos 10 minutos, esto se realizó solo con la microalga y el medio mineral. Una vez que se logró homogenizar la microalga en el medio, se adicionó el inóculo necesario a cada botella. Se hicieron varios conjuntos de ensayos en lote de acuerdo con el diseño experimental que se muestra en la Figura 3.1.



**Figura 3.1** Diagrama experimental general para evaluar el potencial de producción de metano de biomasa microalgal en co-digestión; (co-sustratos = vinazas y ERPH).

A la par de los ensayos de co-digestión, también se evaluó el potencial de producción de metano en mono-digestión para cada sustrato (microalga, vinazas, y ERPH). Además, para cada conjunto de ensayos se empleó un control endógeno con lodo anaerobio sin la adición de ningún tipo de sustrato. El biogás producido se cuantificó con el método de desplazamiento de volumen cada 24 horas, así como su composición por cromatografía de gases con el fin de obtener los porcentajes de composición de metano. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Dado que el efluente de reactor contenía amonio residual, los ensayos con este co-sustrato se realizaron con el medio mineral descrito en la sección 3.5, pero sin la adición de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).

### **3.8 Determinación del potencial de producción de metano mediante co-digestión con microalga seca**

Al terminar el ensayo anterior con microalga húmeda y después de elegir el mejor co-sustrato, se procedió a evaluar el potencial de producción de metano con biomasa microalgal seca para determinar con cuál de las dos presentaciones se lograba un mejor desempeño. Se empleó la misma metodología mencionada en el apartado 3.7 y se realizó el cálculo de potencial de producción de metano específico para cada condición.

### **3.9 Pretratamiento termoquímico y co-digestión de la biomasa microalgal seca**

Después de realizar el ensayo con microalga seca, se evaluó la producción de metano utilizando microalga seca, pero esta vez sometida a un pretratamiento termo-químico, para determinar si mediante el proceso de co-digestión se logran obtener resultados aún mayores en comparación con la biomasa seca y húmeda. El pretratamiento termo-químico empleado tuvo como objetivo solubilizar la pared celular microalgal con el fin de aumentar la disponibilidad del contenido celular. Se siguió el procedimiento implementado por Rincón-Pérez et al. (2019), que consiste en digerir biomasa microalgal con una solución de ácido clorhídrico 3% (w/w), a 105 °C, durante 1.5 horas. El hidrolizado que se obtuvo con la biomasa pretratada se neutralizó (pH 7.0) con NaOH y se almacenó en botellas serológicas en refrigeración a 4°C hasta su uso. Una vez obtenido el hidrolizado de la biomasa microalgal, se procedió a realizar los ensayos de co-digestión con base en la metodología utilizada en la sección 3.7.

### **3.10 Cálculos y análisis estadístico**

Para calcular el volumen de metano producido, se utilizaron las siguientes ecuaciones en el siguiente orden. Primero se calcula el número de moles de biogás desplazado en las muestras con la siguiente ecuación:

$$n(CH_4) = Patm SLP * \left( \frac{Vd+VHS}{R*Texp} \right) Y CH_4 \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde:

- $n(\text{CH}_4)$  = moles de metano desplazado en las botellas (mol)
- $P_{\text{atm}_{\text{esp}}}$  = Presión atmosférica específica del lugar donde se realiza el experimento (San Luis Potosí, 0.8 atm)
- $V_d$  = Volumen de biogás desplazado (L)
- $V_{\text{hs}}$  = Volumen del espacio de cabeza de la botella (L)
- $R$  = Constante de los gases ideales ( $\text{atm}\cdot\text{L}/\text{mol}\cdot\text{K}$ )
- $T_{\text{exp}}$  = Temperatura a la que se desarrolla el experimento (K)
- $Y_{\text{CH}_4}$  = Fracción de metano obtenida en la composición del gas por cromatografía (adimensional)

Posterior a este cálculo, se deben obtener los moles que contiene el espacio de cabeza de la botella (head space), el cual se calcula de la siguiente manera:

$$n(\text{head space}) = \left( \frac{P_{\text{atm SLP}} + V_{\text{fg}}}{R \cdot T_{\text{exp}}} \right) Y_{\text{CH}_4} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde:

- $n_{(\text{head space})}$  = Número de moles en el espacio de cabeza de la botella.

A continuación se obtienen los moles efectivamente producidos en la botella ( $\Delta\text{mol CH}_4$ ) con la ecuación 4.3

$$\Delta\text{mol CH}_4 = n(\text{CH}_4) - n(\text{head space}) \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Por último se calcula el volumen de metano obtenido a condiciones estándar.

$$V_{\text{CH}_4 \text{ stp}} = \Delta\text{mol CH}_4 * \left( \frac{R \cdot T_{\text{stp}}}{P_{\text{stp}}} \right) * 1000 \quad \text{Ecuación 3.4}$$

- $V_{\text{CH}_4 \text{ stp}}$  = Volumen de metano a condiciones estándar (mL)
- $T_{\text{stp}}$  = Temperatura a condiciones estándar (273.15 K)
- $P_{\text{stp}}$  = Presión a condiciones estándar (0.9869 atm)

Después de calcular el volumen de metano obtenido, se procedió a calcular el rendimiento de metano en los experimentos. Para fines de esta investigación, todos

los resultados se reportan en mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, utilizando la siguiente fórmula:

$$Y_{CH_4 \text{ esp}} = \frac{\text{Vol } CH_4 \text{ stp}}{\text{g DQO añadida}} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Donde:

- Y CH<sub>4</sub> esp = Rendimiento de metano (mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida)
- g DQO añadida = gramos de DQO que fueron agregados al inicio del experimento a cada botella (g DQO añadida).

### 3.10.1 Ajuste al modelo de Gompertz

Los valores obtenidos de las cinéticas de producción de metano se ajustaron al modelo modificado de Gompertz, el cual es presentado en la ecuación 3.6:

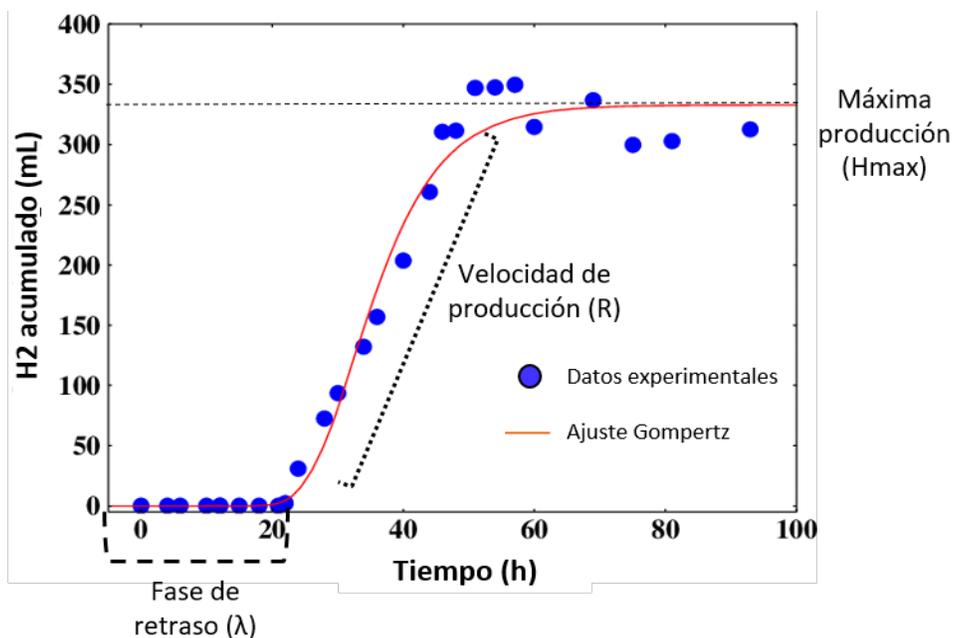
$$H(t) = H_{max} * \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_{max}}{H_{max}}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad \text{(Ecuación 3.6)}$$

Donde:

- H (t): Tiempo posterior al inicio del ensayo en el que se realiza la medición (hora)
- H<sub>max</sub>: Producción máxima acumulada de CH<sub>4</sub> (mL/g DQO añadida)
- R<sub>max</sub>: Velocidad de producción de CH<sub>4</sub> (mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida \*hora)
- λ: Tiempo de retardo (hora)

### 3.10.2 Análisis de sinergismo

Para evaluar si existe sinergismo en los ensayos de co-digestión, se utilizó el método empleado por Zhen y colaboradores (2016) que consiste en obtener los valores de producción de metano considerando la fracción evaluada en cada condición, partiendo de los ensayos de mono-digestión. Para este análisis se utilizó la Ecuación 3.7



**Figura 3.2.** Ejemplo de un ajuste al modelo de Gompertz modificado. Se indican los parámetros calculados con el modelo (modificado de Romão, et al., 2014).

$$B_{est} = (B_{ma} * X1) + (B_{cs} * X2) \quad \text{Ecuación 3.7}$$

Donde:

- B est = Rendimiento estimado de metano (mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida)
- B<sub>ma</sub> = Metano producido en mono-digestión a partir de la microalga (mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida)
- B<sub>cs</sub> = Metano producido en mono digestión a partir del co-sustrato (mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida)
- X1 = Fracción de microalga utilizado en los análisis de co-digestión
- X2 = Fracción de co-sustrato utilizado en los análisis de co-digestión

### 3.10.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis ANOVA con los datos experimentales obtenidos, además de la prueba de Tukey, la cual nos permite evaluar la diferencia entre las medias analizadas. Este análisis se realizó para observar si existe diferencia entre los

volúmenes y las velocidades de producción de metano para cada co-sustrato, así como evaluar los tipos de biomasa evaluados.

### **3.11 Métodos analíticos**

La DQO soluble y total, así como los SV y ST se evaluaron por los métodos estándar APHA 5220, 2540-B y 2450-E, respectivamente (APHA, 2005). El contenido de carbohidratos se determinó con el método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). Para la cuantificación de lípidos se usó el método de la sulfo-fosfo-vainillina que consiste en una hidrólisis ácida, para llevar a cabo una reacción colorimétrica en la muestra y su posterior lectura en el espectrofotómetro (Anschau et al., 2017). El contenido proteico se determinó con el método de Lowry (Lowry et al., 1951). La concentración de amonio final se determinó con un kit comercial basado en el método de salicilato Test 'N Tube AmVer (Catálogo 26069-45, Hach). La composición del biogás se evaluó en un cromatógrafo de gases equipado con un detector de conductividad térmica (GC, 6890N Network GC System, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), y que utiliza nitrógeno como acarreador (Davila-Vazquez et al. 2008). La concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) presentes en el efluente del reactor productor de hidrógeno se realizó con el equipo de electroforesis capilar Agilent 1600A con el método descrito por Dávila-Vázquez et al. (2008).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Actividad metanogénica y caracterización del lodo granular**

El lodo granular utilizado contenía 11.7% de sólidos totales, 10.6% de sólidos volátiles y 1.15% de cenizas, además de una actividad metanogénica de  $0.31 \pm 0.13$  g DQO/g VS-d, utilizando acetato como fuente de carbono, de acuerdo con lo reportado por Visser (1995), quien obtuvo un valor de 0.5 g DQO/gVS-d en condiciones mesofílicas. Este análisis permite conocer la capacidad de los microorganismos presentes en el inóculo para consumir sustrato (acetato específicamente) y generar metano. De acuerdo con el resultado, se puede argumentar que el inóculo tiene una capacidad adecuada de producción de metano.

### **4.2 Caracterización de la biomasa microalgal y co-sustratos**

Los resultados de la caracterización de la biomasa microalgal, así como los co-sustratos empleados se muestran en la Tabla 4.1.

#### **4.2.1 Biomasa microalgal**

La caracterización de la microalga húmeda arrojó un resultado mayor para la DQO, porcentaje de carbohidratos, porcentaje de carbono y porcentaje de nitrógeno, en comparación con los valores obtenidos por Ramos-Suárez & Carreras (2014), quienes caracterizaron biomasa de *Scenedesmus sp* y obtuvieron un valor de 1.1 g DQO/g VSS, 12.3% de carbohidratos, 35% de carbono y 6.8% de nitrógeno. Sin embargo, el porcentaje de lípidos y proteínas obtenido en su investigación es mayor (16.9% y 42.5%, respectivamente) comparado con el obtenido en esta investigación. Estas variaciones se pueden atribuir a lo mencionado por Park & Craggs (2011) quienes apuntan que existen factores específicos que afectan la composición de las microalgas en el proceso de crecimiento, como lo son la temperatura, intensidad de luz y nutrientes añadidos. Las variaciones de temperatura e intensidad de luz están fuertemente relacionadas con las épocas del año donde son cultivadas y cosechados estos organismos autótrofos.

**Tabla 4.1.** Caracterización de sustratos empleados.

<b>Analito</b>	<b>Microalga húmeda</b>	<b>Vinazas</b>	<b>Efluente</b>
DQO (g DQO/g SV ó g DQO/L)*	1.64 ± 0.05	59.35 ± 1.3	11.75 ± 0.5
Carbohidratos	13.34 ± 2.12 (%)	3.2 ± 0.85 g/L	677 ± 2.35 mg/L
Proteínas (%)	24.88 ± 0.15	NA	NA
Lípidos (%)	14.66 ± 1.2	NA	NA
Sólidos totales	0.1985 g ST/g MA	26.25 ± 0.22 g/L	2.78 ± 0.31
Sólidos volátiles	0.1849 g SV/g MA	23.49 ± 0.35 g/L	1.95 ± 0.20
Ácidos grasos volátiles (g/L)	NA	NA	Acetato = 0.962 Butirato = 0.656
COT	NA	19.506 g/L	2.67 g/L
Nitrógeno soluble	NA	52.52 mg/L	194.3 mg/L
Porcentaje de C	50.1%	40.0%	35.5%
Porcentaje de N	9.1%	0.8%	4.7%

\*Para la microalga es g DQO/g SV y para vinazas y efluente es g DQO/L; NA = No aplica.

#### 4.2.2 Efluente de reactor productor de hidrógeno (ERPH)

El residuo líquido de un reactor productor de hidrógeno que fue alimentado con hidrolizado de agave, a una carga de 40 g DQO/L-d (Valencia-Ojeda et al, 2019) fue empleado en esta investigación, caracterizado y los resultados se muestran en la Tabla 4.1. El valor de DQO total obtenido es ligeramente mayor al reportado por Montiel-Corona y Razo-Flores (2018), quienes operando un reactor utilizando hidrolizado de bagazo de agave a cargas orgánicas entre 40 y 52 g DQO/L-d, obtuvieron un efluente acidogénico con una DQO total de 10.2 ± 0.9, en contraste con el obtenido en esta investigación que fue de 11.75 ± 0.5. Esto se puede atribuir a la capacidad de remoción de DQO de ambos reactores. El reactor del que fue recolectado el efluente para esta investigación alcanzó una remoción limitada de DQO (37.1%), mientras que en el reactor operado por Montiel-Corona y Razo-Flores, obtuvieron una remoción del 95%. Lo cual se ve reflejado en el contenido de DQO residual en el efluente.

Los sólidos totales y la concentración de carbohidratos obtenidos en esta investigación, mostraron una mayor diferencia con lo reportado por Montiel-Corona y Razo-Flores ( $0.9 \pm 0.2$  g ST/L y  $320 \pm 3.0$  g/L, respectivamente). La diferencia en la concentración de carbohidratos se puede atribuir a los porcentajes de remoción de azúcares de cada reactor, siendo de 88% para el reactor productor del efluente incluido en esta investigación y de 95% para el evaluado por Montiel-Corona y Razo-Flores. Para el análisis de ácidos grasos volátiles, se obtuvo un total de 1.618 g AGV/L, valor muy inferior al reportado por Montiel-Corona y Razo-Flores, quienes obtuvieron  $5.4 \pm 0.5$  g AGV/L. La diferencia en la producción de ácidos grasos volátiles puede ser en gran medida a lo reportado por Valencia-Ojeda (2019), quien reportó que durante la operación de un reactor alimentado con hidrolizado de bagazo de agave, presentó una disminución en la producción de ácidos grasos volátiles debido a posibles cambios en las rutas metabólicas diferentes a la ruta fermentativa acetato-butirato, resaltando la ruta para la formación de lactato o alcoholes.

#### **4.2.3 Vinazas tequileras**

Las vinazas son un desecho de la industria tequilera producto de la destilación del etanol en el proceso de fermentación de azúcares. Se producen alrededor de 10 litros de vinazas por litro de tequila y la normativa actual no contempla la correcta disposición de este residuo (Buitrón et al., 2014). Los resultados de la caracterización de las vinazas tequileras se muestran en la Tabla 4.1. El análisis de pH arrojó un valor de 3.75, valor que concuerda con Buitrón y Carvajal (2010), quienes establecen que el valor de pH que suelen tener las vinazas es entre 3 y 4. La determinación de DQO total obtenida fue de casi el doble de lo determinado por Buitrón (2014), quienes obtuvieron un valor de 30 g DQO/L para vinazas tequileras y un 50% mayor de lo reportado por Carvajal-Zarrabal y colaboradores (2012), quienes reportaron una DQO total de 40. A pesar de existir gran diferencia entre estos valores, de acuerdo con Nandy y colaboradores (2002), los valores se encuentran dentro del rango normal que suelen tener los residuos de la

fermentación alcohólica, que suele ser de 30 a 60 g DQO/L, lo que se atribuye a la gran cantidad de sólidos que poseen.

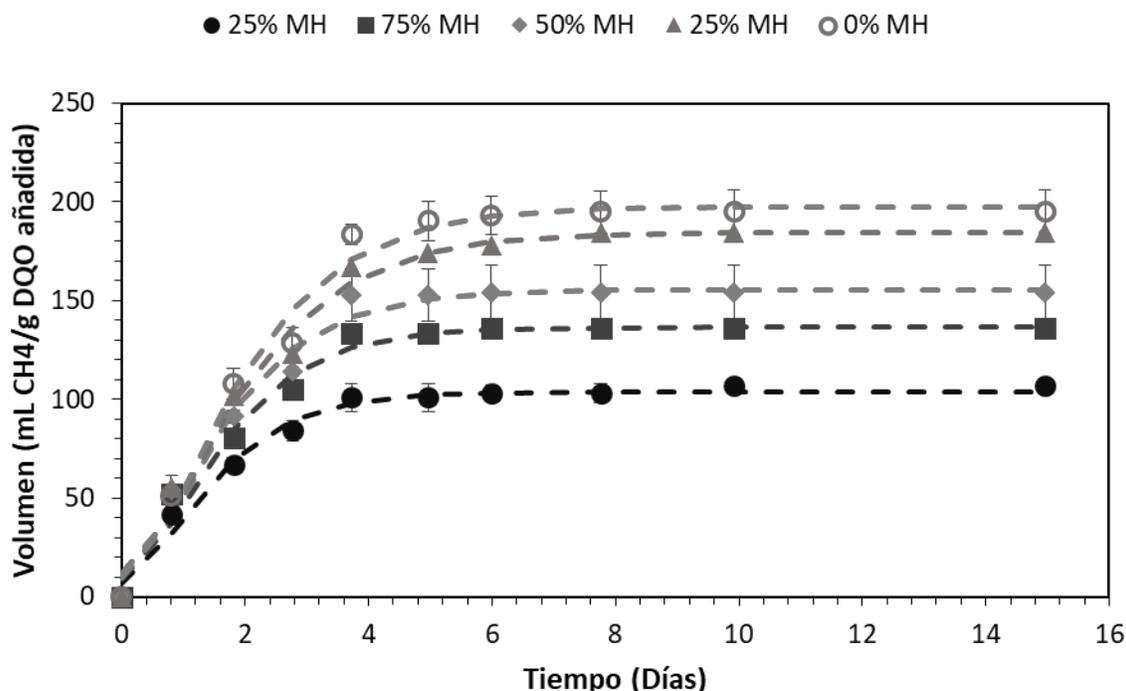
El valor de carbono orgánico total (COT) obtenido para las vinazas es similar al obtenido por Siles y colaboradores (2011), quienes reportan un valor de  $20.16 \pm 0.05$  g/L para vinazas producidas a partir de caña de azúcar. El parámetro COT nos indica la fracción de carbono que se encuentra disuelto en la muestra (Crittenden, 2005), de esta manera podemos advertir que una fracción de carbono se encuentra disponible en solución.

### **4.3 Análisis de potencial de producción de metano en mono y co-digestión**

#### **4.3.1 Co-digestión de microalga húmeda con ERPH**

En la Figura 4.1 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de potencial bioquímico de metano de la microalga húmeda en co-digestión con ERPH. Se aprecia que alrededor del día 10 la producción de metano alcanzó la asíntota en casi todos los ensayos. Sin embargo, los ensayos se dieron por finalizados hasta el día 15. En el ensayo de mono-digestión de ERPH se obtuvo un valor máximo de volumen de metano producido de 194.91 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida. De acuerdo con los valores de DQO alimentados en cada botella, la producción máxima de metano es de 360 mL de metano, obteniendo un 54.14% de conversión de DQO total a metano, resultando un valor muy por debajo del valor teórico de, que representa el 100%.

Para la mono-digestión de microalga húmeda, se obtuvo un valor de 107.05 mL CH<sub>4</sub>/g DQO, lo que se traduce como un 29.7% de conversión de DQO total a metano. En los ensayos de co-digestión con efluente de reactor en la proporción 75% de microalga húmeda y 25% co-sustrato, se obtuvo 37.7% de conversión a metano, lo que equivale a 154.01 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, mientras que para la condición con 50% de DQO total aportada por la microalga húmeda se obtuvo un 184.47 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida (42.8%).



**Figura 4.1.** Cinética de producción de metano utilizando microalga húmeda y ERPH. Microalga húmeda (100% MH) y ERPH (0% MH), así como en co-digestión (75% MH y 50% MH). En líneas punteadas se observa el ajuste al modelo de Gompertz modificado. (MH= microalga húmeda).

Como se observa, en ninguno de los ensayos con microalga se obtuvo un porcentaje de conversión de DQO a metano mayor a 50%. Esto se puede atribuir a la presencia de azúcares no asimilables para la comunidad microbiana, presentes en el efluente del reactor productor de hidrógeno, ya que como fue señalado por Valencia-Ojeda (2019) los hidrolizados pudieron contener azúcares que no podían ser degradados fácilmente para obtener metano. Otro factor importante a considerar es que este tipo de sustratos ricos en ácidos grasos son convertidos rápidamente en metano por las arqueas metanogénicas, fundamento básico de la co-digestión ya que la presencia de sustratos con alta tasa de degradabilidad permiten la activación de las enzimas metabólicas y así puedan llevar a cabo su trabajo con sustratos más complejos.

Los valores de ácidos grasos volátiles en nuestra muestra (0.985 y 0.656 g/L para acetato y butirato, respectivamente) están muy lejos de las concentraciones

inhibitorias (6 g AGV/L), por lo que se descarta la inhibición por acumulación de ácidos grasos volátiles (Wang et al., 1999).

Al terminar la cinética de producción de metano, se procedió a evaluar la concentración de amonio presente al final de cada uno de los ensayos de co-digestión, los resultados se presentan en la Tabla 4.2. Los valores obtenidos en la determinación de amonio se encuentran muy por debajo de los reportados por Sialve y colaboradores (2009), quienes aseguran que la toxicidad por amonio comienza en concentraciones mayores a 4000 mg/L, permitiendo descartar la inhibición por amonio en este proceso. Las concentraciones finales de amonio fueron similares en los distintos ensayos, recordemos que en el caso del efluente, no se adicionó amonio al medio para no disminuir la relación C/N, ya que el efluente contenía 4.71% de nitrógeno (Tabla 4.1).

**Tabla 4.2.** Concentración de amonio residual en los ensayos con microalga húmeda y ERPH. Ensayos de mono-digestión empleando microalga húmeda (100%) y ERPH (0%), así como la co-digestión a las diferentes concentraciones de DQO para cada sustrato (75, 50 y 25%).

Condición (base microalga)	Concentración de amonio (mg/L)
100%	300.20 ± 25.24
75%	266.47 ± 11.05
50%	300.86 ± 20.07
25%	302.54 ± 14.82
0%	306.15 ± 30.73

Los valores del ajuste al modelo modificado de Gompertz se muestran en la Tabla 4.3, en todos los casos los datos experimentales se ajustaron satisfactoriamente ( $R^2 > 0.97$ ), por lo que el modelo puede utilizarse para validar los valores obtenidos. De acuerdo a los valores de  $R_{max}$  obtenidos en el ajuste, podemos ver que existe un aumento en la velocidad máxima de producción de metano, conforme aumenta la concentración de efluente en los ensayos. Esto se puede atribuir a los ácidos grasos volátiles presentes en el efluente. Wang y colaboradores (1999),

determinaron las velocidades de degradación de los ácidos grasos volátiles en la digestión anaerobia, obteniendo  $0.161 \text{ h}^{-1}$  para butirato,  $0.062 \text{ h}^{-1}$  para acetato,  $0.045 \text{ h}^{-1}$  para valérico y  $0.029 \text{ h}^{-1}$  para propiónico. En el co-sustrato empleado, los ácidos grasos volátiles presentes fueron acetato ( $0.962 \text{ g/L}$ ) y butirato ( $0.656 \text{ g/L}$ ), ambos con la menor velocidad de degradación de los tres ácidos grasos analizados, por lo que claramente podemos atribuir el aumento en la velocidad de producción de metano al incremento de concentración de efluente.

**Tabla 4.3** Ajuste al modelo de Gompertz para la co-digestión de microalga húmeda y ERPH. Se muestran los resultados para microalga húmeda (100%), así como las distintas proporciones de microalga (75%, 50% y 25%) en co-digestión con ERPH. También se muestran los valores de mono-digestión de ERPH (0%).

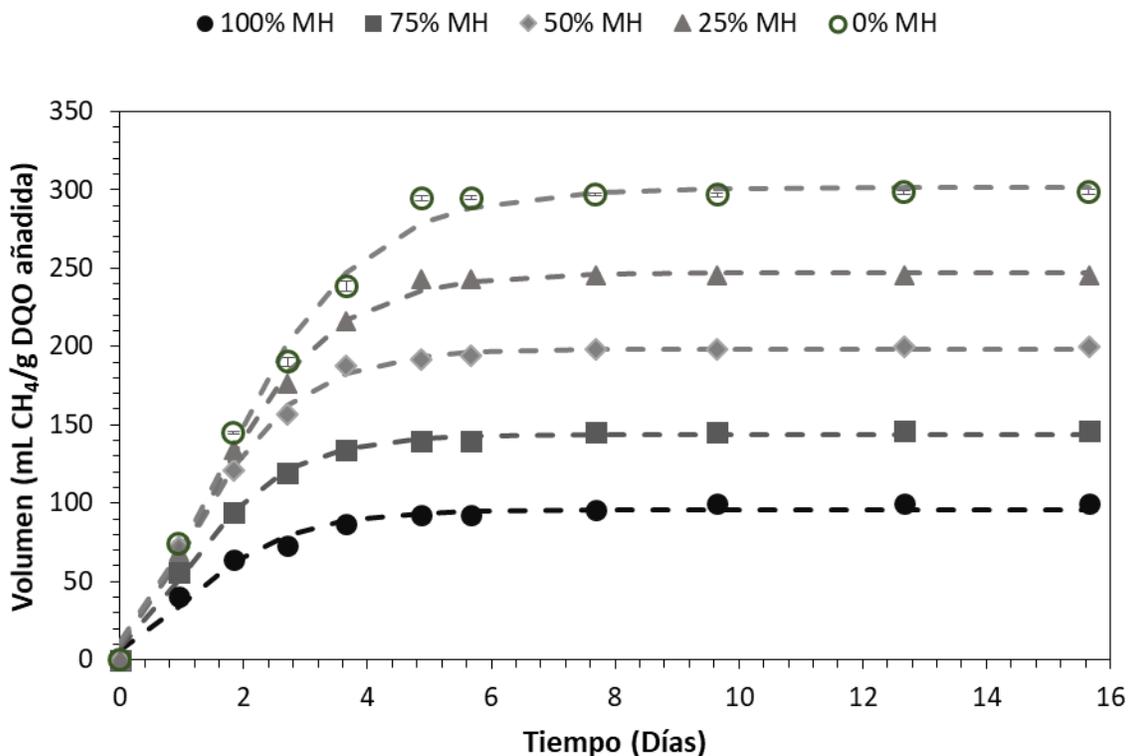
Condición	Hmax (mL CH <sub>4</sub> /g DQO añadida)	Lambda (h)	Rmax (mL CH <sub>4</sub> /g DQO añadida*h)	R <sup>2</sup>
100%	103.71	0	1.675	0.980
75%	136.49	0	1.992	0.985
50%	155.76	0	2.199	0.988
25%	184.58	0	2.189	0.991
0%	197.81	0	2.368	0.993

#### 4.3.2 Co-digestión de microalga húmeda con vinazas

Los resultados obtenidos para la cinética de producción en mono-digestión y co-digestión con vinazas se muestran en la Figura 4.2. Para la mono-digestión de vinazas se obtuvo un valor de  $298.45 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}$  añadida, valor que corresponde al 82.9% del valor teórico obtenido. El valor obtenido en este trabajo es mayor al obtenido por López y colaboradores (2017), quienes evaluaron la producción de metano a partir de vinazas, obteniendo un valor de  $248 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}$  añadida.

El alto porcentaje de conversión a metano obtenido por las vinazas se puede atribuir a lo establecido por Syaichurrozi y colaboradores (2016), quienes mencionan que las vinazas contienen una gran cantidad de micronutrientes que pueden tener una repercusión positiva en la producción de metano, como lo son el sodio, potasio, calcio y magnesio, además de una gran cantidad de azúcares fácilmente

aprovechables. Esto permite señalar a las vinazas como un co-sustrato de fácil degradación.



**Figura 4.2.** Cinética de producción de metano utilizando microalga húmeda y vinazas tequileras. Microalga húmeda (100% MH) y vinazas tequileras (0% MH), así como en co-digestión (75% MH, 50% y 25% MH). MH= microalga húmeda.

Para la condición de 75% microalga húmeda en co-digestión con vinazas (25%) se obtuvo un valor de 146.45 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, que equivale a un 40.7% del valor teórico de producción de metano. Para la condición 50% de aporte de vinazas a la DQO total, obtuvimos un 55.49% de conversión a metano, lo que se traduce como 199.79 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida.

Se determinó la concentración de amonio en solución para el ensayo de biomasa húmeda con vinazas y los resultados se muestran en la Tabla 4.4. En este caso, el valor más elevado se obtuvo para la condición de mono-digestión de microalga, lo que significa que existen pero éste se encuentra muy alejado de los reportados como inhibitorios.

**Tabla 4.4.** Determinación de las concentraciones de amonio en ensayos con microalga húmeda y vinazas. Se muestran los resultados obtenidos para microalga húmeda (100%), así como las distintas proporciones de microalga (75% y 50%) en co-digestión con vinazas, así como los de mono-digestión de vinazas tequileras (0%).

Condición (base microalga)	Concentración de amonio (mg/L)
100%	410.98 ± 13.33
75%	369.18 ± 18.48
50%	352.84 ± 13.00
25%	362.34 ± 19.00
0%	371.29 ± 25.38

Los valores obtenidos después de ajustar los datos experimentales al modelo de Gompertz arrojaron los resultados mostrados en la Tabla 4.5. El ajuste de los datos con respecto al modelo ( $R^2$ ) fue mayor a 0.97, valor que expresa un muy buen ajuste con respecto a Gompertz, por lo que el modelo aplicado es el correcto.

**Tabla 4.5** Ajuste de los datos al modelo de Gompertz empleando biomasa húmeda en co-digestión con vinazas. Se muestran los valores en mono-digestión de microalgas (100%) y con distintas proporciones de microalga (75% y 50%) en co-digestión con vinazas tequileras. También se muestran los datos con solo vinazas (0%).

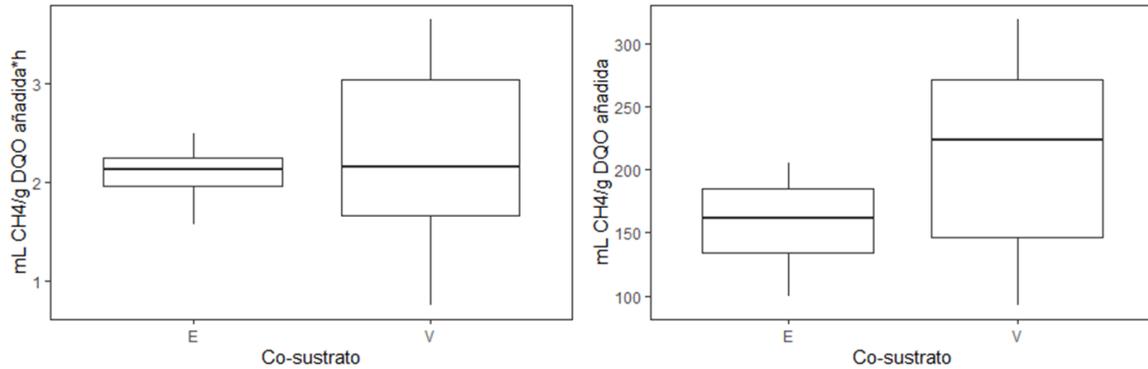
Condición	Hmax (mL CH <sub>4</sub> /g DQO añadida)	Lambda (h)	Rmax (mL CH <sub>4</sub> /g DQO añadida*h)	R2
100%	96.588	0	1.462	0.977
75%	143.978	0	2.344	0.993
50%	198.383	0	2.984	0.994
25%	246.731	0	3.289	0.996
0%	301.184	0	3.465	0.992

Al igual que en la cinética anterior, podemos ver que existe un aumento significativo con respecto a los valores de producción de metano máxima (Hmax) y velocidad máxima de producción (Rmax) entre cada una de las condiciones. Los valores obtenidos para la velocidad de producción de metano en co-digestión y sin

microalga son mayores a lo reportado por López y colaboradores (2017), quienes emplearon lodo de prensa de caña en co-digestión con vinazas y obtuvieron valores de 1.91 y 1.931 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida\*h para las co-digestiones 75% y 50% lodo de prensa de caña respectivamente, y 2.98 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida\*h para la mono-digestión de vinazas. Esta diferencia en la velocidad de producción de metano se puede atribuir a la afinidad del lodo con respecto al sustrato, ya que el lodo que se usó como inóculo proviene de un reactor que trata vinazas, mientras que el lodo empleado en la investigación antes mencionada es utilizado para el tratamiento de desechos orgánicos de una granja. Por otra parte, existen diferencias con respecto a los valores de Hmax en los ensayos de co-digestión, ya que los resultados obtenidos en esta investigación fueron menores para ambas condiciones de co-digestión (75% y 50%) en comparación con los obtenidos por López y colaboradores (2017) (231 y 248 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, respectivamente). Esta diferencia se puede atribuir al sustrato principal empleado en cada investigación, debido a que los lodos de prensa de caña de azúcar poseen una relación C/N mucho mayor (26) en comparación con las microalgas (5.5) (López, et al. 2017). Recordemos que el valor ideal de la relación C/N para una correcta digestión anaerobia es de 20-30 (Ganesh Saratale et al., 2018).

#### **4.4 Selección del mejor co-sustrato.**

Una vez analizados los dos co-sustratos propuestos se realizó un ANOVA para conocer las diferencias entre las medias y una prueba de Tukey para determinar si existía diferencia entre los grupos de estudio. Para evaluar cuál de los dos co-sustratos tiene un efecto positivo mayor en el proceso, se consideró la producción máxima de metano, así como la velocidad de producción. En la Figura 4.3 se muestra un diagrama de cajas donde se compara el efecto en la velocidad de producción de metano respecto a la utilización de ambos co-sustratos de acuerdo a los valores obtenidos para ambos experimentos.

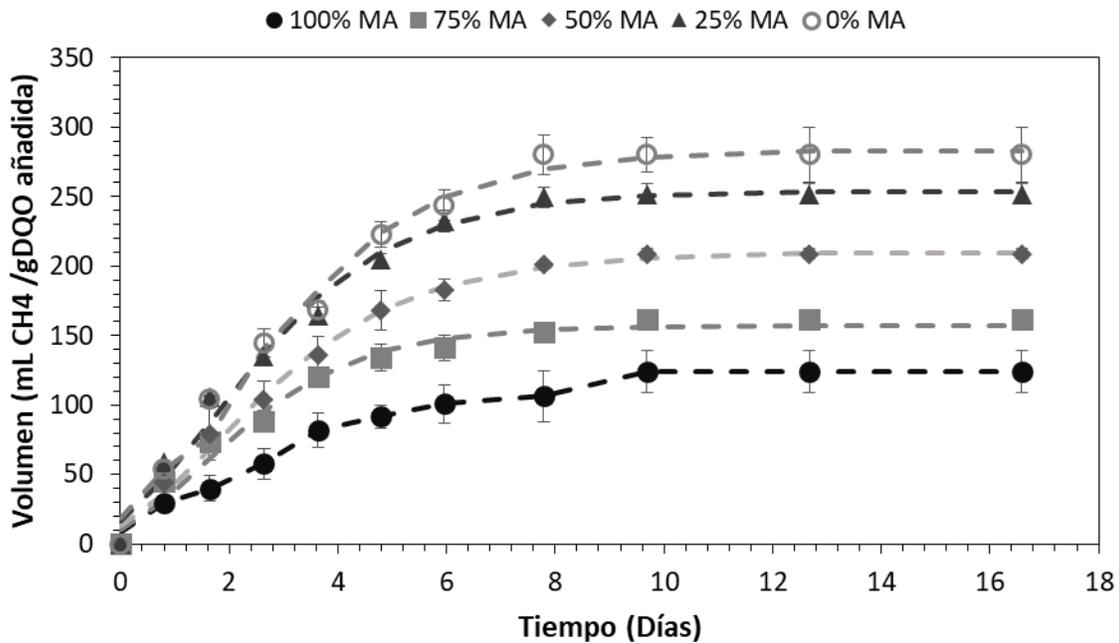


**Figura 4.3** Diagramas de distribución de los co-sustratos utilizados (E=ERPH, V= Vinazas). A) Velocidad de producción de metano; B) Producción máxima de metano.

Se puede observar en la Figura 4.3B que existen diferencias entre ambos co-sustratos, obteniendo un valor de 214.88 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida para las vinazas y 155.66 para el efluente. De acuerdo a la prueba de Tukey, estos se clasifican en dos grupos diferentes al obtener diferencias significativas entre co-sustratos ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, en la Figura 5.3A se muestran las velocidades de producción de metano, donde podemos concluir que no se observaron diferencias significativas, por lo que la utilización de cualquier co-sustrato no tiene impacto importante en la velocidad de producción. Analizando ambos criterios, podemos concluir que el mejor co-sustrato son las vinazas, por lo que para los siguientes análisis nos enfocaremos en este co-sustrato.

#### **4.5 Potencial bioquímico de metano de microalga seca en co-digestión con vinazas**

Los resultados obtenidos para los ensayos de mono y co-digestión con microalga seca se muestran en la Figura 4.4. Para la mono-digestión de microalga seca se obtuvo un valor de 123.96 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, mientras que en co-digestión con vinazas y en la proporción de 75% DQO de microalga seca y 25% DQO de vinazas, se obtuvo un valor de 173.51 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, obteniendo un 30.4% más que el obtenido por la microalga seca de forma individual. Para la concentración 50% DQO microalga seca y 50% DQO de vinazas, se produjo 217.08 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, un valor 68.5% mayor al obtenido sin añadir co-sustrato.



**Figura 4.4.** Cinética de producción de metano utilizando microalga seca y vinazas tequileras. (100% MA) y vinazas tequileras (0% MA) y a partir del proceso de co-digestión con proporciones de 75% y 50% biomasa seca con vinazas (MA=Microalga seca).

El valor obtenido para la mono-digestión de biomasa microalgal es mayor a lo determinado por Cortés-Carmona y colaboradores (2018), quienes evaluaron la producción de metano utilizando *Scenedesmus obtusiusculus* como sustrato, obteniendo un valor de 161.4 mL CH<sub>4</sub>/gVSS añadido, que equivale a 113.66 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida considerando una equivalencia de 1.42 gDQO/gVSS (Rittmann & McCarty, 2012). Esta diferencia puede deberse principalmente a la composición de la microalga que, a pesar de ser el mismo género y especie, de acuerdo a Park & Craggs (2011), existen factores durante el cultivo y crecimiento de las microalgas que generan diferencias en la composición, como lo son la temperatura, intensidad de luz y nutrientes añadidos.

Para las condiciones en co-digestión con 75% y 50% de microalga seca con vinazas, se obtuvieron 208.89 y 161.69 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, respectivamente. Estos valores corresponden a un aumento de 30.44% y 68.51% respectivamente en comparación con la microalga de manera individual, lo que se debe en gran parte a

lo mencionado por Solé-Bundó y colaboradores (2019), que el utilizar un co-sustrato con rico en carbono y fácilmente biodegradable, podría contribuir a mejorar la degradabilidad del sustrato principal.

Los resultados para la determinación de amonio se muestran en la Tabla 4.6. Se puede observar que el máximo valor obtenido fue de 478.77, que es valor menor al reportado por Sialve y colaboradores (2009), que es de 4000 mg/L, por lo que se descarta la inhibición por amonio.

**Tabla 4.6** Determinación de amonio en ensayos de co-digestión de microalga seca y vinazas.

Condición (base microalga)	Concentración de amonio (mg/L)
100%	478.77 ± 15.24
75%	347.82 ± 11.31
50%	367.66 ± 10.23
25%	332.49 ± 12.29
0%	325.99 ± 16.3

En la Tabla 4.7 se muestran los valores para el ajuste al modelo de Gompertz con nuestros datos experimentales. De acuerdo a los datos obtenidos, se observa un aumento en la producción de metano en la microalga seca, obteniendo un 25% más en comparación con la microalga húmeda (96.58 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida). Esto coincide con lo reportado por Barreiro-Vescovo y colaboradores (2018), quienes evaluaron la producción de biogás utilizando microalga seca y húmeda y encontraron que el proceso de secado funge como un pretratamiento ya que daña la pared celular y facilita la liberación del material intracelular. Lo que es de llamar la atención es que todos los valores de velocidad de producción de metano disminuyeron respecto a los valores obtenidos con biomasa húmeda, a pesar de utilizar el mismo co-sustrato.

Esto se puede atribuir a una variación en el pH ya que, de acuerdo a Mao y colaboradores (2017), quienes observaron una disminución en la velocidad de producción de metano conforme el pH era menor en los experimentos con las

mismas condiciones. Es importante mencionar que las arqueas metanogénicas son muy sensibles a las variaciones en el pH, afectando principalmente el valor de Rmax.

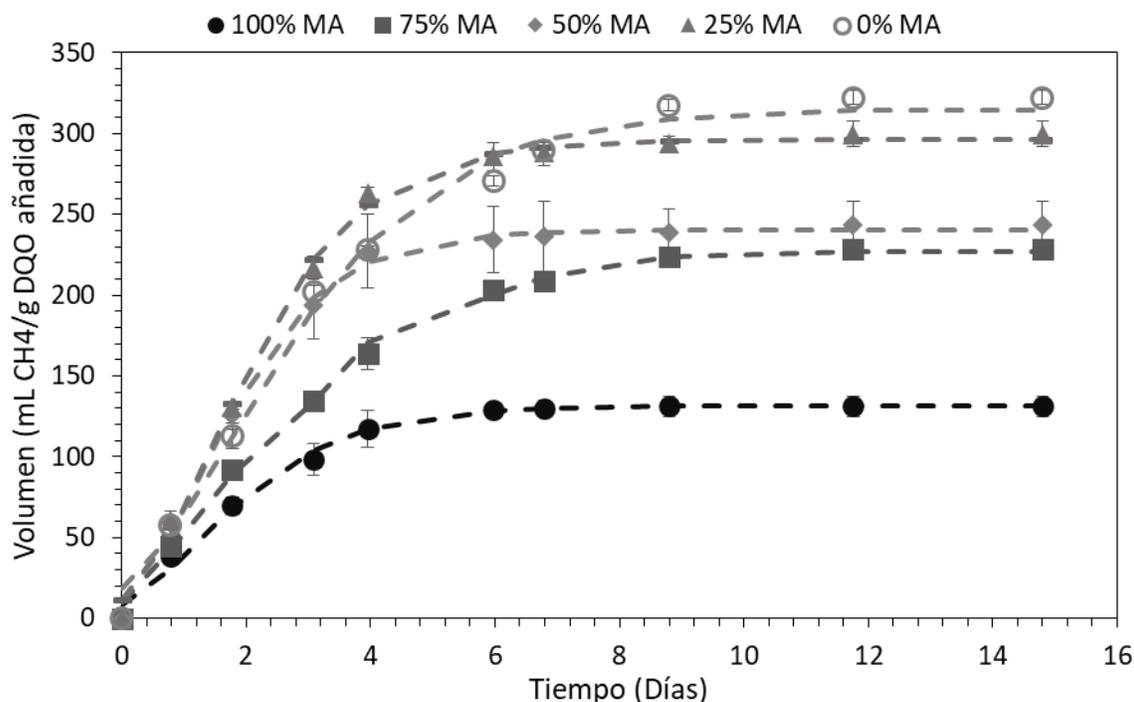
**Tabla 4.7.** Ajuste al modelo de Gompertz modificado para los ensayos con microalga seca pretratada con vinazas. Biomasa seca (100%) y con distintas proporciones de vinazas tequileras (75, 50 y 25%). También se muestran los datos con solo vinazas (0%).

Condición	Hmax (mL CH <sub>4</sub> /g DQO añadida)	Lambda (h)	Rmax (mL CH <sub>4</sub> /gDQO añadida*h)	R2
100%	123.964	0	0.928	0.997
75%	157.116	0	1.543	0.998
50%	209.118	0	1.720	0.998
25%	253.266	0	2.137	0.998
0%	282.670	0	2.358	0.999

#### **4.6 Pretratamiento termo-químico y evaluación del potencial bioquímico de metano de microalga seca pretratada en co-digestión con vinazas**

Después de llevar a cabo el pretratamiento termo-químico con ácido a la microalga seca, se logró un aumento en la DQO soluble de 42%, lo cual es mayor a lo obtenido por González-Fernández y colaboradores (2012) y por Alzate y colaboradores (2012), quienes obtuvieron 11% y 32% de solubilización de DQO respectivamente, aplicando un pretratamiento térmico a la biomasa identificada como *Scenedesmus*. Esto nos indica que el pretratamiento elegido fue la opción adecuada para aumentar la solubilización de la microalga estudiada.

Una vez obtenido el hidrolizado, se evaluó la cinética de producción de metano utilizando la biomasa microalgal pretratada en diferentes proporciones (Fig. 4.5). Para el ensayo de mono-digestión de microalga pretratada termo-químicamente se obtuvo un rendimiento de metano de 131.28 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadido.



**Figura 4.5.** Cinética de producción de metano utilizando biomasa seca pretratada termo-químicamente y vinazas tequileras. Se anexan los ajustes de Gompertz para cada condición.

En la condición 75% DQO microalga seca pretratada y 25% DQO de vinazas, se obtuvo un valor de 228.4 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, un valor que representa un 73.98% mayor, comparado con los ensayos individuales de digestión anaerobia utilizando microalga seca pretratada. En la condición 50% DQO de microalga seca pretratada y 50% DQO de vinazas, se obtuvieron 243.71 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida, lo que representa un 85.6% más que el ensayo individual de esta misma.

Los porcentajes de aumento de producción de metano en las condiciones de co-digestión, que se obtuvieron en el presente trabajo, son mayores a lo reportado por Yen & Brune (2007) quienes co-digirieron desechos de papel con biomasa integrada por *Chlorella sp* y *Scenedesmus*, quienes obtuvieron un 50% de aumento en la producción de metano. Esto se puede atribuir a la homogeneidad del co-sustrato empleado (vinazas), ya que al tratarse de un líquido la disponibilidad y composición del co-sustrato permitió tener una mayor disponibilidad de materia orgánica disuelta y fácilmente biodegradable. Además, la vinaza empleada en el presente estudio

contenía mayor cantidad de nutrientes (micronutrientes como el sodio, potasio, calcio y magnesio) en comparación con los desechos de papel empleados por Yen & Brune, (2007).

Este aumento en la producción de metano en co-digestión se puede atribuir a lo establecido por Passos & Ferrer (2014), quienes argumentan que pre-tratamientos a temperaturas mayores a 80 °C logran una disrupción celular y liberan el contenido intracelular a la fase soluble, favoreciendo la metanización de estos productos. Además de aumentar la disponibilidad, el hecho de añadir un co-sustrato de fácil degradación tiene un impacto positivo en la producción de metano.

Al igual que en los otros ensayos, la determinación de amonio se realizó al finalizar la cinética de producción de metano, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 4.8. Se observa que ninguna condición sobrepasó los valores de toxicidad por amonio. Al igual que en los experimentos anteriores con vinazas como co-sustrato, se observa una mayor concentración de amonio en el ensayo con 100% de microalga. Este aumento comparado con el ensayo sin microalga solo es un indicador de que la biomasa se degradó. Cabe destacar que el objetivo de cuantificar la concentración final de amonio era asegurar que no existiera inhibición por este metabolito.

**Tabla 4.8** Determinación de amonio para los ensayos con biomasa seca pretratada con vinazas.

Condición (base microalga)	Concentración de amonio (mg/L)
100%	500.45 ± 11.24
75%	447.19 ± 19.42
50%	429.13 ± 13.32
25%	415.12 ± 23.21
0%	420.12 ± 13.43

El ajuste de los resultados al modelo de Gompertz se muestra en la Tabla 4.9. El valor máximo de producción de metano en la condición de mono-digestión de

microalga pretratada fue de 131.82 ml CH<sub>4</sub>/g DQO añadido, mostrando un aumento de 5.91% en comparación con el metano producido a partir de microalga seca sin pretratar. Este aumento es ligeramente menor en comparación con el reportado por González-Fernández y colaboradores (2012), quienes obtuvieron un valor de 9% de aumento en la producción de metano en comparación con la microalga sin pretratar, además de ser un valor mucho menor al reportado por Rincón-Pérez et al. (2019), quien obtuvo un valor de 247.75 mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida al evaluar un pretratamiento termo-químico con biomasa seca de *Scenedesmus obtusiusculus*. Esta diferencia se puede deber a la composición de la microalga de estudio, principalmente al considerarse lotes de producción diferentes, recordando lo mencionado por Park & Crags (2011) y presentado anteriormente, quienes argumentan que existen muchos factores que afectan el desarrollo de la microalga durante su cultivo.

**Tabla 4.9** Ajuste al modelo de Gompertz modificado para los ensayos de mono y co-digestión de microalga pretratada con vinazas como co-sustrato.

Condición	Hmax (mL CH <sub>4</sub> /g DQO añadida)	Lambda (h)	Rmax (mL CH <sub>4</sub> /g DQO añadida*h)	R <sup>2</sup>
100%	131.82	0	1.611	0.986
75%	226.173	0	1.931	0.994
50%	240.566	0	3.317	0.993
25%	296.345	0	3.534	0.996
0%	316.108	0	2.687	0.995

A pesar de lo anterior, se observó que en las condiciones de co-digestión evaluadas, considerando las diferentes presentaciones de microalga en este estudio, el valor de Rmax fue mejorado sustancialmente al ser comparado con la velocidad de producción de metano en mono-digestión de la microalga. En este estudio corroboramos que agregar un co-sustrato de fácil degradación permite una mayor formación de precursores del metano, con los cuales la velocidad de producción de metano aumenta. Esto podría atribuirse a la presencia de micronutrientes y elementos traza en las vinazas, los cuales tienen un efecto positivo en la producción

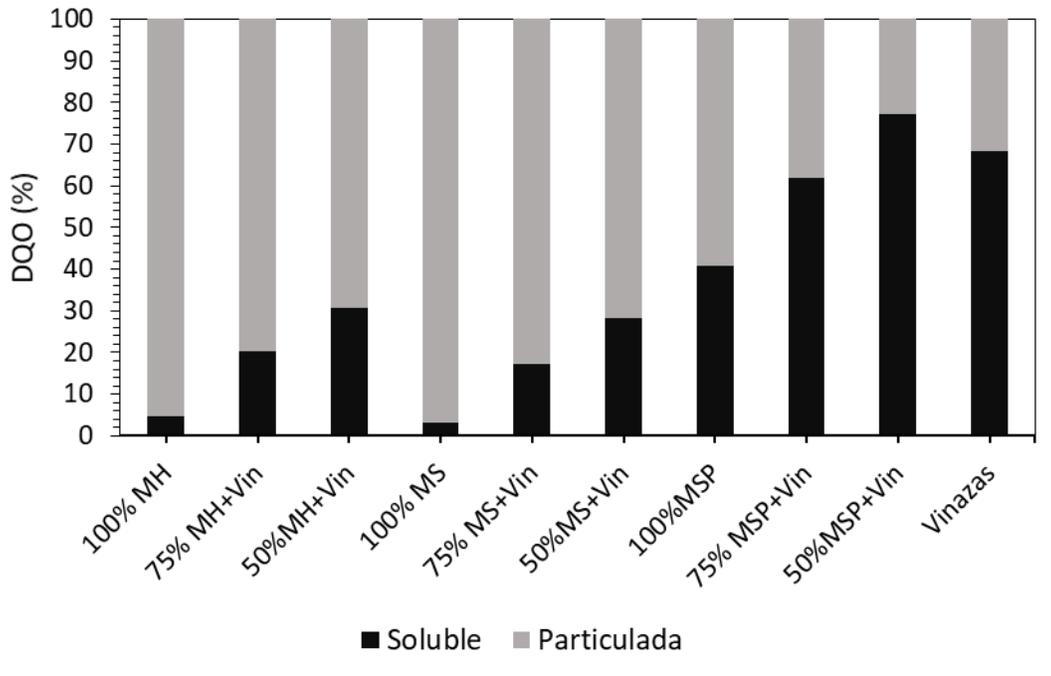
de metano, aumentando la velocidad tal como se ha observado anteriormente (Xu, et al., 2018).

#### **4.7 Análisis de DQO consumida en los ensayos.**

Una vez finalizadas las cinéticas, se procedió a evaluar los valores de DQO residual de cada condición con el fin de verificar si existió una mayor degradabilidad de la fracción sólida presente. Este análisis se hizo para aquellos ensayos con vinazas. La cuantificación de DQO total, soluble y particulada (por diferencia entre la total y soluble) se realizó al inicio y al final de los ensayos. En la Figura 4.6 se muestran las fracciones de DQO soluble y particulada iniciales para cada condición, recordando que la DQO total adicionada en cada ensayo fue de 5 g DQO/L. Como se puede observar, es evidente el aporte a la DQO soluble del co-sustrato ya que conforme se agrega una mayor fracción de vinazas, el porcentaje de la DQO soluble aumenta. Los valores de DQO soluble de la microalga ya sea húmeda o seca es menor a 10%, esto indica que prácticamente toda la DQO se encuentra en la fracción particulada. En cambio, cuando la microalga seca se somete a un pretratamiento, la fracción soluble de DQO resultó ser de 40%, comprobando la efectividad del pretratamiento en ayudar a solubilizar la DQO.

Al término de las cinéticas, se evaluó la DQO residual en cada botella, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 4.7. Se obtuvo alrededor de 56% de degradación en las tres condiciones de mono-digestión de microalga, incluida la condición de pretratamiento, lo que concuerda con lo mencionado por González-Fernández (2012) quien menciona que la pared celular del género *Scenedesmus* es muy rígida debido a que está constituida por elementos que limitan la digestión anaerobia, como la manosa y la galactosa, además de la presencia de los biopolímeros como la esporopolenina

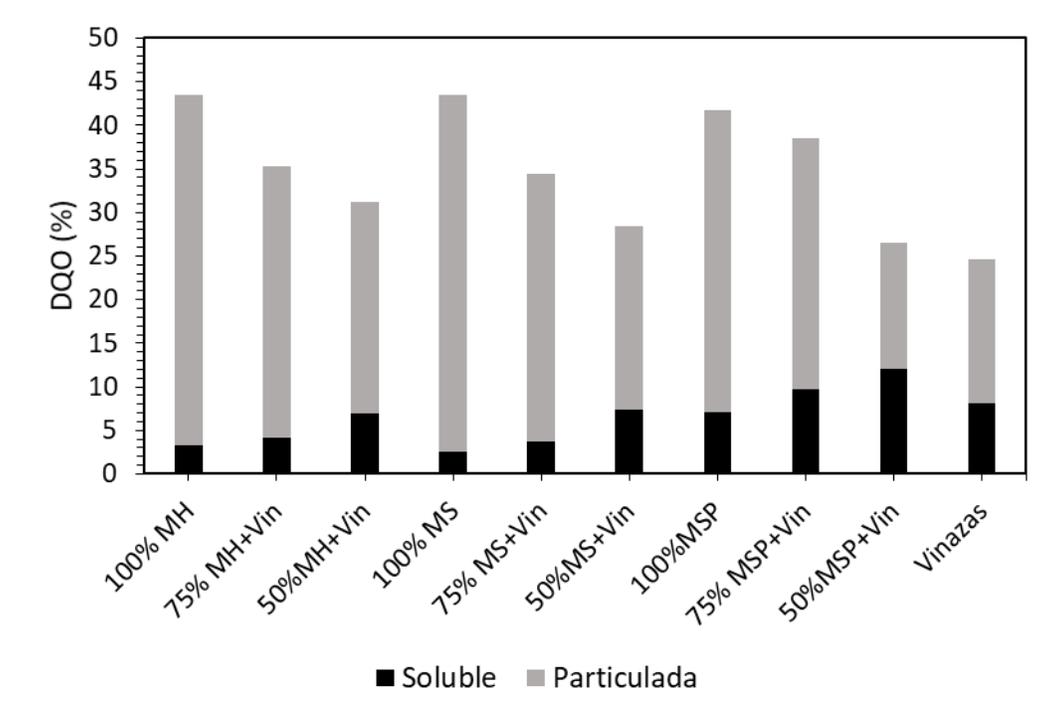
A pesar de que en la microalga pretratada se aumentó la DQO soluble por el pretratamiento, la presencia de estos compuestos de difícil degradación (esporopolenina y politerpenos principalmente), no permitió un mayor aprovechamiento y conversión de estas moléculas en metano, lo que impactó el rendimiento de metano.



**Figura 4.6.** Fracción soluble y particulada inicial en cada ensayo. Microalga húmeda (MH), microalga seca (MS) y microalga seca pretratada (MSP) y vinazas, en monodigestión (100%) y con distintas fracciones de vinazas (Vin).

La degradación de la fracción soluble para la condición con microalga húmeda en co-digestión disminuyó un 10% en comparación con el 100% de microalga. La condición que incluye 50% de microalga pretratada más vinazas fue la condición que menos fracción de sólidos tiene, lo cual se debe al aumento en la fracción soluble de nuestra microalga debido al pretratamiento.

También resulta interesante analizar qué es lo que sucede con la fracción soluble y particulada en la vinaza, que a pesar de tener una DQO soluble inicial de 68%, al final de los ensayos todavía queda DQO soluble (8%) que no se pudo degradar por completo. Lo cual habla de que aún con un sustrato de fácil degradación, como las vinazas, existe una parte recalcitrante, posiblemente como producto de la degradación de la DQO particulada.



**Figura 4.7.** Fracción soluble y particulada final en cada ensayo. Microalga húmeda (MH), microalga seca (MS) y microalga seca pretratada (MSP) y vinazas (0%), en mono-digestión (100%) y con distintas fracciones de vinazas (Vin).

#### 4.8. Evaluación del sinergismo entre sustratos

De acuerdo con los valores obtenidos en cada uno de los ensayos, podemos evaluar si existe sinergismo en los ensayos de co-digestión utilizando la Ecuación 3.7. Si los valores obtenidos experimentalmente son mayores que la suma de los valores correspondientes al porcentaje de cada sustrato, podremos hablar de un efecto sinérgico. En caso de que el valor esté muy por debajo del previsto, se puede asumir que existe un efecto antagónico en el ensayo (Ramos-Suarez & Carreras, 2014). Los valores obtenidos para la evaluación de sinergismo se muestran en la Tabla 4.10.

De acuerdo con el análisis, podemos ver que los valores obtenidos utilizando microalga húmeda y microalga seca son prácticamente iguales a los teóricos en cada condición, considerando la degradabilidad que presenta cada sustrato. Esto puede atribuirse a la presencia de compuestos que no pueden ser degradables

como las estructuras de celulosa, esporopolenina, entre otros, pero no representa un efecto antagónico ya que no se obtiene un valor muy diferente al teórico (El Mashad, 2013).

**Tabla 4.10.** Análisis de sinergismo en los ensayos de co-digestión con vinazas a partir de los datos de rendimiento de metano (mL CH<sub>4</sub>/g DQO añadida).

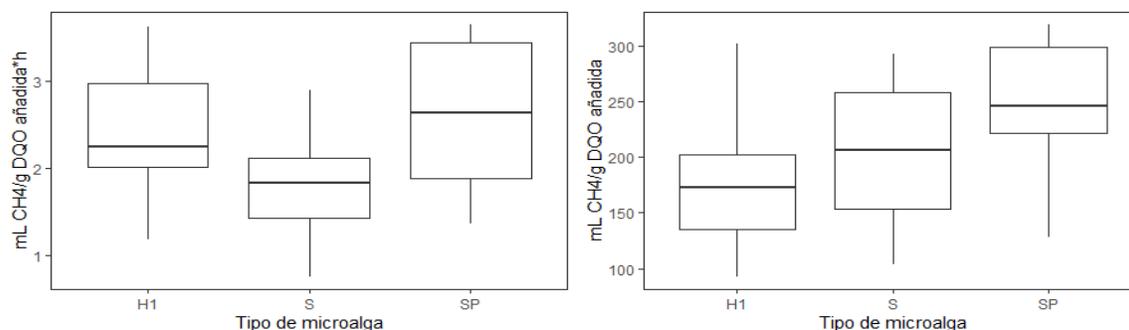
Condición	Volumen de metano (mL CH <sub>4</sub> /g DQO añadida)					
	Microalga húmeda		Microalga seca		Microalga seca pretratada	
	Estimado	Obtenido	Estimado	Obtenido	Estimado	Obtenido
75%	150.18	146.36	168.27	161.70	173.75	228.40
50%	200.52	199.80	212.57	208.89	216.23	243.71
25%	250.84	246.73	258.71	253.90	258.71	296.34

En contraste, para la condición con microalga pretratada, obtuvimos un aumento considerable que se traduce como un sinergismo entre los sustratos empleados. En la condición correspondiente al 75% de microalga, se obtuvo un aumento del 31.5% de metano con respecto al valor teórico, el cual es mayor al obtenido por Du y colaboradores (2019) quien obtuvo un incremento del 25% al co-digerir biomasa microalgal identificada como *Spirulina platensis* y lodos residuales. En la condición 50% microalga-50%co-sustrato aumentó el volumen de metano producido en un 12.7% y en la condición 25% microalga-75% efluente, hubo un aumento del 14.5%, estos valor son menores al obtenido en la condición de 75% microalga, pero aún se considera como sinergismo. Este aumento sinérgico se puede atribuir al proceso de pretratamiento previo, el cual permitió la liberación del material intracelular de las microalgas, aumentando la disponibilidad de los compuestos aprovechables.

#### 4.9 Selección de la mejor tipo de biomasa

En la Figura 4.8 se observa el resultado del análisis con la Prueba de Tukey de los datos de R<sub>max</sub> y H<sub>max</sub> con vinazas como sustrato en tres distintas condiciones, microalga húmeda, microalga seca y microalga seca pretratada. De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 4.11, se encontraron diferencias significativas en la velocidad de producción de metano entre la microalga húmeda y la microalga

seca, pero no entre la microalga húmeda y la microalga seca pretratada. Como se mencionó anteriormente, esto se puede atribuir a una variación en el pH durante el ensayo con microalga seca.



**Figura 4.8** Diagramas de cajas para el análisis de medias de acuerdo al tipo de microalga analizado. (H1=microalga húmeda; S=microalga seca; SP=microalga seca pretratada).

Por otra parte, para el análisis de Hmax se obtuvieron diferencias significativas entre la microalga húmeda y la microalga seca pretratada, pero no hubo diferencia entre éstas y la microalga seca, tal como se observa en la Tabla 4.11.

**Tabla 4.11.** Resultados de la prueba de Tukey para los valores de Rmax y Hmax obtenidos con los distintos tipos de microalga.

Tipo de microalga	Rmax (mL CH <sub>4</sub> /hora)	Grupos	Hmax (mL CH <sub>4</sub> /g DQO añadida)	Grupos
Microalga pretratada	2.62	A	242.20	A
Microalga seca	1.73	A	205.19	AB
Microalga húmeda	2.39	B	176.52	B

Analizando los resultados obtenidos, podemos decir que la microalga seca pretratada es una muy buena opción para obtener mejores rendimientos de metano y buenas velocidades de producción, pero debemos analizar si la diferencia entre la producción de metano con respecto a las otras dos biomásas es suficientemente grande para justificar el uso de un pretratamiento, esto considerando que estos rendimientos pueden ser llevados a un escalamiento, donde se priorizará el valor económico y que permita la sustentabilidad del proceso.

Por otra parte, los ensayos que utilizaron microalga húmeda y seca como sustrato, no mostraron un aumento en la producción de metano respecto a aquellas que utilizaron la microalga seca pretratada. Lo anterior puede ser atribuido a que durante la digestión de la microalga húmeda no se logró la ruptura total de la pared celular (Ganesh Saratale et al., 2018)

#### 4.10 Análisis de costos y energía

Para complementar el trabajo realizado, se procedió con un análisis de costos y energía a partir de los valores de producción de metano obtenidos, la energía invertida en el proceso de secado y el tiempo de duración de las cinéticas, así como algunos datos que fueron proporcionados (reactivos, gastos de agua, entre otros), pero sin considerar los gastos de producción y cosecha de las microalgas.

Para los ensayos de 100%, 75% y 50% de microalga, se obtuvieron los resultados de energía generada y los costos de producción por litro de metano, mismos que se muestran en las tablas 4.12 y 4.13.

**Tabla 4.12.** Valores de producción de energía para las distintas presentaciones de biomasa microalgal.

	Microalga húmeda	Microalga seca	Microalga seca pretratada
Producción a 100% microalga (L CH <sub>4</sub> /Lr)	0.535	0.620	0.656
Energía producida a 100% microalga (kJ/Lr)	19.05	22.06	23.37
Producción a 75% microalga (L CH <sub>4</sub> /Lr)	0.732	0.868	1.142
Energía producida a 75% microalga (kJ/Lr)	26.05	30.88	40.66
Producción a 50% microalga (L CH <sub>4</sub> /Lr)	0.999	1.085	1.219
Energía producida a 50% microalga (kJ/Lr)	35.56	38.64	43.38

Se puede observar que existe un aumento considerable al agregar las vinazas en la condición de 75% para la microalga seca pretratada, logrando un aumento de

producción de energía de casi el doble respecto al valor obtenido al digerir 100% de microalga. En el Anexo 1 se muestra el balance energético para el proceso que resultó negativo, debido a que se invirtió más energía que la que se obtuvo como metano. A nivel laboratorio, este balance energético no es realista, ya que la eficiencia energética de los equipos de laboratorio es distinta a la de un equipo a escala industrial.

Con respecto a los costos calculados con los tres tipos de microalga usados, podemos observar en la Tabla 4.13 que el co-sustrato tuvo un impacto positivo en la disminución del costo de producción, dicho costo fue 25 y 29% menor cuando se llevó a cabo la co-digestión de microalga húmeda y microalga seca, respectivamente, y 57% menor cuando se usó microalga seca pretratada.

**Tabla 4.13.** Costos de producción por litro de metano. Se muestran los valores para cada tipo de microalga en co-digestión con vinazas.

<b>Porcentaje de microalga</b>	<b>Microalga húmeda cruda</b>	<b>Microalga seca cruda</b>	<b>Microalga seca pretratada</b>
100%	\$13.94	\$12.08	\$11.42
75%	\$10.19	\$8.62	\$6.56
50%	\$7.47	\$6.89	\$6.14

Este tipo de análisis puede ser de gran ayuda para decidir con qué presentación de microalga podría ser adecuado explorar la producción en continuo o en semi-continuo de biogás mediante co-digestión. Posteriormente, se podría proceder a evaluar dicha condición a escala piloto. De acuerdo con los resultados, podemos concluir que a pesar de que el costo del pretratamiento, *a priori*, podría añadir una limitante. Después del análisis de costos, resultó que la condición en la que se llevó a cabo el pretratamiento resultó ser la mejor opción (co-digestión 75% microalga-25% vinazas) al tener una mayor producción de biogás, por lo cual se obtuvo el costo más bajo por litro de metano.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se evaluó el efecto de agregar un co-sustrato rico en carbono al proceso de digestión anaerobia de microalgas. La utilización de un co-sustrato aumentó considerablemente las velocidades de producción de metano en todos los ensayos de co-digestión, siendo un aumento gradual conforme se agrega una mayor concentración de co-sustrato. De los dos co-sustratos analizados, las vinazas tequileras resultaron ser el co-sustrato con mejor comportamiento durante los ensayos ya que se obtuvo 82.9% de degradación de la DQO total comparado con el efluente del reactor productor de hidrógeno que presentó una eficiencia de sólo 54.1%.

En los ensayos con biomasa microalgal húmeda y biomasa seca, se obtuvo una mayor velocidad de producción de metano para el primer tipo de biomasa, pero una mayor producción de metano para el segundo tipo. Con ambos tipos de biomasa se observó que la utilización de un co-sustrato aumentó la producción de biogás. Sin embargo, a partir de un análisis de sinergismo se pudo identificar que esa mayor producción de biogás en realidad fue consecuencia de la metanización del co-sustrato y no de la microalga, ya que no se presentó sinergismo en dichos ensayos.

En el caso de la microalga sometida a pretratamiento termoquímico, se logró solubilizar 42% de la DQO total. Esta mayor solubilidad no reflejó un aumento significativo en la producción de metano en la condición de 100% microalga, dado que solo se obtuvo entre 5 y 10% más de metano en comparación con los ensayos con 100% de biomasa seca y húmeda, respectivamente. En cambio, cuando la biomasa microalgal pretratada se co-digirió con vinazas en una proporción 75-25%, respectivamente, se logró un efecto sinérgico importante al obtener 31.45% más metano con respecto al valor estimado para dicha proporción. Con esta proporción se logró un efecto sinérgico mayor comparado con el sinergismo que se observó (12.7 y 15.31%) cuando la proporción fue de 50-50% y de 25-75% biomasa seca pretratada-vinazas, respectivamente.

Sin lugar a dudas, la condición 75% biomasa seca pretratada en co-digestión con 25% de vinazas resultó ser la mejor opción al obtener los mejores rendimientos de

metano tanto en volumen como en velocidad, lo que se traduce en menores costos de producción, así como una velocidad de producción de metano mayor con respecto a los demás ensayos en lote analizados en esta investigación.

Cabe aclarar que el análisis de costos propuesto en esta investigación fue a escala laboratorio y podría cambiar para una escala industrial. En cuanto al balance energético, la escala a la cual se realizaron los experimentos impidió obtener una estimación real debido a la baja eficiencia energética de los equipos utilizados, por lo que resultaría adecuado poder realizar los experimentos a una escala mayor.

Un punto que podría explotarse a partir de esta investigación, es evaluar en un proceso en continuo la condición que resultó con el mejor rendimiento (75% microalga seca pretratada-25% vinazas), con el fin de determinar si la velocidad y el rendimiento de metano mostrado en los ensayos en lote se mantiene o mejora, con vistas a un subsecuente escalamiento piloto.

Se recomienda que en futuras investigaciones se evalúe la integridad celular de la microalga residual para verificar si el pretratamiento o la co-digestión presentan un efecto positivo al romper la pared celular de la microalga.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abo-Shady, A.M., Mohamed, Y.A., Lasheen, T., 1993. Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biol. Plant.* 35, 629–632. <https://doi.org/10.1007/BF02928041>
- Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A., Brooks, M.S.L., 2019. Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1560-9>
- Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I., 2012. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresour. Technol.* 123, 488–494. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.06.113>
- American Public Health Association. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater: selected analytical methods approved and cited by the United States Environmental Protection Agency.
- Anschau, A., Caruso, C.S., Kuhn, R.C., Franco, T.T., 2017. Validation of the sulfo-phosphovanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Brazilian J. Chem. Eng.* 34, 19–27. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170341s20140222>
- Barreiro-Vescovo, S., De Godos, I., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., González-Fernández, C., s/f. Effect of microalgae storage conditions on methane yields. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1643-9>
- Bastviken, D. (2009). Methane. *Encyclopedia of Inland Waters*, Academic Press. Pags 783-805. <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00117-4>.
- Beltrán, C., Jeison, D., Feroso, F.G., Borja, R., Beltr An, C., 2016. Batch anaerobic co-digestion of waste activated sludge and microalgae (*Chlorella sorokiniana*) at mesophilic temperature. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1181456>
- Blanco, G., Santalla, E., Córdoba, V., & Levy, A. (2017). Generación de electricidad a partir de biogás capturado de residuos sólidos urbanos: Un análisis teórico-práctico. Inter-American Development Bank.
- Blumreisinger, M., Meindl, D., Loos, E., 1983. Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry* 22, 1603–1604. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80096-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80096-X)
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557–577. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2009.10.009>
- Buitrón, G., Prato-Garcia, D., & Zhang, A. (2014). Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Science and Technology*, 70(12), 1919-1925.

- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 19, 360–369. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2012.11.030>
- Candia Lomelí Mariana. (2018) Microalgas como fuente de biomasa para la producción de biogás Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí, México.
- Caporgno, M.P., Trobajo, R., Caiola, N., Ibáñez, C., Fabregat, A., Bengoa, C., 2015. Biogas production from sewage sludge and microalgae co-digestion under mesophilic and thermophilic conditions. *Renew. Energy* 75, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.10.019>
- Carvajal-Zarrabal, O., Nolasco-Hipólito, C., Barradas-Dermitz, D.M., Hayward-Jones, P.M., Aguilar-Uscanga, M.G., Bujang, K., 2012. Treatment of vinasse from tequila production using polyglutamic acid. *J. Environ. Manage.* 95. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.05.001>
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.01.057>
- Cortés-Carmona, M., Tapia-Rodríguez, A., Morales, M., Celis, L.B., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2018. Methane production from thermally pretreated *Scenedesmus obtusiusculus* biomass in semi-batch reactors at low reaction times. *Biochem. Eng. J.* 136, 61–68. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2018.05.006>
- Crittenden, J. C., Trussell, R. R., Hand, D. W., Howe, K. J., & Tchobanoglous, G. (2012). *MWH's water treatment: principles and design*. John Wiley & Sons.
- Davila-Vazquez, G., Alatríste-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. Hydrogen Energy* 33, 4989–4997. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065>
- Domozych, D.S., Stewart, K.D., Mattox, K.R., 1980. The comparative aspects of cell wall chemistry in the green algae (chlorophyta). *J. Mol. Evol.* 15, 1–12. <https://doi.org/10.1007/BF01732578>
- Du, X., Tao, Y., Li, H., Liu, Y., Feng, K., 2019. Synergistic methane production from the anaerobic co-digestion of *Spirulina platensis* with food waste and sewage sludge at high solid concentrations. *Renew. Energy* 142, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.062>
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.
- El-Mashad, H.M., 2013. Kinetics of methane production from the codigestion of switchgrass and *Spirulina platensis* algae. *Bioresour. Technol.* 132, 305–312.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.183>

- Etioppe, G., Sherwood Lollar, B., 2013. Abiotic methane on earth. *Rev. Geophys.* 51, 276–299. <https://doi.org/10.1002/rog.20011>
- Fernández-Rodríguez, M.J., Rincón, B., Feroso, F.G., Jiménez, A.M., Borja, R., 2014. Assessment of two-phase olive mill solid waste and microalgae co-digestion to improve methane production and process kinetics. *Bioresour. Technol.* 157, 263–269. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.01.096>
- Ganesh Saratale, R., Kumar, G., Banu, R., Xia, A., Periyasamy, S., Dattatraya Saratale, G., 2018. A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. *Bioresour. Technol.* 262, 319–332. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.03.030>
- Gonzalez-Fernandez, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B., 2015. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresour. Technol.* 198, 896–906. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.09.095>
- González Hoyos, A. (2017). Estudio del empleo de metano como combustible de sustitución en hibridación de motores diesel. (Tesis de Licenciatura). Universidad Politécnica de Madrid.
- Gould, M.C., 2015. Bioenergy and Anaerobic Digestion. *Bioenergy* 297–317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407909-0.00018-3>
- Hadiyanto, H., Kumoro, A., Cahyo Kumoro, A., 2012. Potency of Microalgae as Biodiesel Source in Indonesia ZnO based Photocatalyst View project biodiesel production View project Potency of Microalgae as Biodiesel Source in Indonesia Article history. *J. Renew. Energy Dev.* 1, 23–27. <https://doi.org/10.14710/ijred.1.1.23-27>
- Houweling, S., van der Werf, G.R., Klein Goldewijk, K., Röckmann, T., Aben, I., 2008. Early anthropogenic CH<sub>4</sub> emissions and the variation of CH<sub>4</sub> and <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> over the last millennium. *Global Biogeochem. Cycles* 22, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2007GB002961>
- Jankowska, E., Sahu, A.K., Oleskiewicz-Popiel, P., 2017. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 75, 692–709. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.11.045>
- Jason, T. Z. N. (2015). Co-Digestion of Food Waste and Microalgae (Doctoral dissertation).
- Kaspar, H.F., Wuhrmann, K., 1978. Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 1–7.
- Khan, M.I., Shin, J.H., Kim, J.D., 2018. The promising future of microalgae: Current

- status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact.* <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kim, J., Kang, C.-M., 2015. Increased anaerobic production of methane by co-digestion of sludge with microalgal biomass and food waste leachate. *Bioresour. Technol.* 189, 409–412. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.04.028>
- López González, L.M., Pereda Reyes, I., Romero Romero, O., 2017. Anaerobic co-digestion of sugarcane press mud with vinasse on methane yield. *Waste Manag.* 68, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.016>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT\*.
- Ma, J., Frear, C., Wang, Z., Yu, L., Zhao, Q., Li, X., Chen, S., 2013. A simple methodology for rate-limiting step determination for anaerobic digestion of complex substrates and effect of microbial community ratio. *Bioresour. Technol.* 134, 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.014>
- Mallick, N., Bagchi, S.K., Koley, S., Singh, A.K., 2016. Progress and challenges in microalgal biodiesel production. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01019>
- Mao, C., Zhang, T., Wang, X., Feng, Y., Ren, G., Yang, G., 2017. Process performance and methane production optimizing of anaerobic co-digestion of swine manure and corn straw OPEN. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09977-6>
- Medipally, S.R., Yusoff, F.M., Banerjee, S., Shariff, M., 2015. Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. *Biomed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2015/519513>
- Metcalf, L., Eddy, H.P., 2013. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse.* McGraw-Hill.
- Metting, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17, 477–489. <https://doi.org/10.1007/BF01574779>
- Minhas, A.K., Hodgson, P., Barrow, C.J., Adholeya, A., 2016. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
- Montiel Corona, V., Razo-Flores, E., 2018. Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresour. Technol.* 249, 334–341. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.10.032>
- Moreno, A., Tutor, M., Xavier, Ripoll, F., 2014. Modelización de la dinámica de los microorganismos anaerobios sintróficos oxidantes del ácido acético (SAO).
- Murphy, J.D., Drosig, B., Allen, E., Jerney, J., Xia, A., Herrmann, C., Herrmann

- Edited, C., Baxter, D., 2015. A perspective on algal biogas A perspective on algal biogas IEA Bioenergy A perspective on algal biogas.
- Murto, M., Björnsson, L., Mattiasson, B., 2004. Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *J. Environ. Manage.* 70, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2003.11.001>
- Mussgnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150, 51–56. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2010.07.030>
- Nandy, T., Shastry, S., Kaul, S.N., 2002. Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresource recovery. *J. Environ. Manage.* 65, 25–38. <https://doi.org/10.1006/jema.2001.0505>
- Neumann, P., Torres, A., Feroso, F.G., Borja, R., Jeison, D., 2015. Anaerobic co-digestion of lipid-spent microalgae with waste activated sludge and glycerol in batch mode. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 100, 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.020>
- Olaizola, M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* 20, 459–66. [https://doi.org/10.1016/s1389-0344\(03\)00076-5](https://doi.org/10.1016/s1389-0344(03)00076-5)
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., 2011. Algal production in wastewater treatment high rate algal ponds for potential biofuel use. *Water Sci. Technol.* 63, 2403–2410. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.200>
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., Ferrer, I., 2014. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresour. Technol.* 172, 403–412. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.08.114>
- Ramos-Suárez, J.L., Carreras, N., 2014. Use of microalgae residues for biogas production. *Chem. Eng. J.* 242, 86–95. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2013.12.053>
- Richmond, A., Hu, Q. (Eds.), 2013. *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK. <https://doi.org/10.1002/9781118567166>
- Rincón-Pérez, J., Razo-Flores, E., Morales, M., Alatriste-Mondragón, F., Celis, L.B., 2019. Improving the Biodegradability of *Scenedesmus obtusiusculus* by Thermochemical Pretreatment to Produce Hydrogen and Methane. *BioEnergy Res.* <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10067-w>
- Rittmann, B.E., McCarty, P.L., 2012. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw-Hill Education.
- Salinas, E., & Gasca, V. (2009). Los biocombustibles. *El cotidiano*, 157(10).
- Shah, F.A., Mahmood, Q., Rashid, N., Pervez, A., Raja, I.A., Shah, M.M., 2015. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 42, 627–642.

<https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.10.053>

- 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. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2009.03.001>
- Siddique, M.N.I., Wahid, Z.A., 2018. Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. *J. Clean. Prod.* 194, 359–371. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.05.155>
- Solé-Bundó, M., Carrère, H., Garfí, M., Ferrer, I., 2017. Enhancement of microalgae anaerobic digestion by thermo-alkaline pretreatment with lime (CaO). *Algal Res.* 24, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.025>
- Solé-Bundó, M., Garfí, M., Matamoros, V., Ferrer, I., 2019. Co-digestion of microalgae and primary sludge: Effect on biogas production and microcontaminants removal. *Sci. Total Environ.* 660, 974–981. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.011>
- Syaichurrozi, I., Rusdi, R., Dwicahyanto, S., & Toron, Y. S. (2016). Biogas production from co-digestion vinasse waste and tofu-processing waste water and kinetics. *International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)*, 6(3), 1057-1070.
- Toledo-Cervantes, A., Garduño Solórzano, G., Campos, J.E., Martínez-García, M., Morales, M., 2018. Characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for high-energy molecules accumulation: deeper insight into biotechnological potential of strains of the same species. *Biotechnol. Reports* 17, 16–23. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2017.11.009>
- Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., Revah, S., 2013. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour. Technol.* 130, 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.081>
- Torres, Ivaro, G., F., Rincón, B., Bartacek, J., Borja, R., Jeiso, D., 2013. Challenges for Cost-Effective Microalgae Anaerobic Digestion, en: *Biodegradation - Engineering and Technology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55975>
- Valcke, D., Verstraete, W., 1983. A practical method to estimate the acetoclastic methanogenic biomass in anaerobic sludges. *J. Water Pollut. Control Fed.* 55, 1191–1195.
- Visser A. (1995) The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Tesis Doctoral. Wagening University
- Valencia Ojeda C. (2019) Producción de hidrógeno en continuo a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos con la enzima nacional Cellulase 50 XL. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí, México.
- Wang, M., Park, C., 2015. Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge. *Biomass and Bioenergy* 80, 30–37.

<https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2015.04.028>

- Wang, M., Sahu, A.K., Rusten, B., Park, C., 2013. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* 142, 585–590. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.05.096>
- Wang, Q., Kuninobu, M., Ogawa, H.I., Kato, Y., 1999. Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy* 16, 407–416. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00016-1)
- Xie, S., Hai, F.I., Zhan, X., Guo, W., Ngo, H.H., Price, W.E., Nghiem, L.D., 2016. Anaerobic co-digestion: A critical review of mathematical modelling for performance optimization. *Bioresour. Technol.* 222, 498–512. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.015>
- Xu, R., Zhang, K., Liu, P., Khan, A., Xiong, J., Tian, F., Li, X., 2018. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Bioresour. Technol.* 247, 1119–1127. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.09.095>
- Yen, H.-W., Brune, D.E., 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* 98, 130–134. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2005.11.010>
- Zabed, H.M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Awad, F.N., Qi, X., Sahu, J.N., 2019. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 105, 105–128. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2019.01.048>
- Zhang, Y., Kang, X., Wang, Z., Kong, X., Li, L., Sun, Y., Zhu, S., Feng, S., Luo, X., Lv, P., 2018. Enhancement of the energy yield from microalgae via enzymatic pretreatment and anaerobic co-digestion. *Energy* 164, 400–407. <https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2018.08.124>
- Zhen, G., Lu, X., Kobayashi, T., Kumar, G., Xu, K., 2016. Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. *Chem. Eng. J.* 299, 332–341. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2016.04.118>
- Zhou, W., Min, M., Li, Y., Hu, B., Ma, X., Cheng, Y., Liu, Y., Chen, P., Ruan, R., 2012. A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. *Bioresour. Technol.* 110, 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.063>

## ANEXOS

### Anexo 1

Balance de energía para las presentaciones de microalga en cada condición.

<b>100%</b>	<b>Microalga húmeda cruda</b>	<b>Microalga seca cruda</b>	<b>Microalga seca pretratada</b>
<b>Energía Secado (kWh/Lr)</b>	-	0.43	0.46
<b>Energía para Pretratamiento (kWh/Lr)</b>	-	-	0.24
<b>Energía para Producción de CH<sub>4</sub> (kWh/Lr)</b>	7.63	7.63	7.63
<b>Consumo de Energía Total (kWh/Lr)</b>	7.63	8.06	8.33
<b>Consumo de Energía Total (kJ/Lr)</b>	27450	29009	29979

<b>Producción a 100% microalga (L CH<sub>4</sub>/Lr)</b>	0.535	0.620	0.656
<b>Energía producida a 100% microalga (kJ/Lr)</b>	<b>19.05</b>	<b>22.06</b>	<b>23.37</b>

<b>75%</b>	<b>Microalga húmeda cruda</b>	<b>Microalga seca cruda</b>	<b>Microalga seca pretratada</b>
<b>Energía Secado (kWh/Lr)</b>	-	0.32	0.35
<b>Energía para Pretratamiento (kWh/Lr)</b>	-	-	0.18
<b>Energía para Producción de CH<sub>4</sub> (kWh/Lr)</b>	7.63	7.63	7.63
<b>Consumo de Energía Total (kWh/Lr)</b>	7.63	7.95	8.15
<b>Consumo de Energía Total (kJ/Lr)</b>	27450	28619	29345

<b>Producción a 75% microalga (L CH<sub>4</sub>/Lr)</b>	0.732	0.868	1.142
<b>Energía producida a 75% microalga (kJ/Lr)</b>	<b>26.05</b>	<b>30.88</b>	<b>40.66</b>

<b>50%</b>	<b>Microalga húmeda cruda</b>	<b>Microalga seca cruda</b>	<b>Microalga seca pretratada</b>
<b>Energía Secado (kWh/Lr)</b>	-	0.22	0.23
<b>Energía para Pretratamiento (kWh/Lr)</b>	-	-	0.12
<b>Energía para Producción de CH<sub>4</sub> (kWh/Lr)</b>	7.63	7.63	7.63
<b>Consumo de Energía Total (kWh/Lr)</b>	7.63	7.84	7.98
<b>Consumo de Energía Total (kJ/Lr)</b>	27450	28236	28715

<b>Producción a 50% microalga (L CH<sub>4</sub>/Lr)</b>	0.999	1.085	1.219
<b>Energía producida a 50% microalga (kJ/Lr)</b>	<b>35.56</b>	<b>38.64</b>	<b>43.38</b>