



**Universidad Autónoma de Chiriquí
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Escuela de Química**

“ Producción de biogás a partir de la digestión anaerobia de biomasa de la microalga *Chlorella sorokiniana* ”

Presentado por:

Eduardo E. Sáens E.
4-762-1095

Trabajo de graduación para
Optar por el título de
Licenciado en Química

Asesor:

Mgr. Luis Montero
Ariadna Batista. Dr. Rer.nat
PhD. Pedro González

David, Chiriquí, República de Panamá

2022

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se lo dedico principalmente a Dios, por darme fuerzas para lograr este proceso de aprendizaje.

A mi madre, por los sacrificios, amor, valores y principios que me han inculcado.

A mi familia por los consejos, palabras de aliento y oraciones que han hecho de mí una mejor persona.

A mis amigos por ser un punto de apoyo y fortaleza en los momentos de dificultad y debilidad.

A todas las personas que me han apoyado y ayudado a que este trabajo finalice con éxito, en especial a aquellos que me abrieron sus puertas y compartieron sus conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

Primordialmente agradezco a Dios por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas. Doy gracias a mi mamá y mis hermanos por todo el amor y apoyo incondicional que me brindan siempre, los consejos y valores que me ayudan y guían para poder cumplir mis metas propuestas.

Agradecer grandemente también a mi asesora de proyecto de SENACYT y coasesora en proyecto de Tesis la Dra. Ariadna Batista, por su dedicación, su paciencia y motivación al resaltar siempre las habilidades y virtudes de cada persona; también agradezco mucho a mi asesor de tesis el C. M.Sc.. Luis Montero por su dedicación, consejos y apoyo en la realización de esta investigación, gracias profesores por ser como parte mi familia. Al Dr. Pedro González por su asesoría y gran ayuda en el desarrollo y culminación de esta investigación, estoy muy agradecido por compartirme todos los conocimientos y ayuda que requerí en cada momento.

Al Centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) por el espacio, equipos e insumos facilitados para el desarrollo de esta investigación. A mi gran amigo Miguel Vega por la motivación, ayuda y orientación en el laboratorio y en mi vida personal, también a mis amigos Isaac Lissondro, Kyriam Cianca, Diana Sánchez y Eira Sobenis por el cariño y apoyo incondicional. Agradecer hasta el cielo a mi gran amiga Diana Staff porque mientras estuviste conmigo diste lo mejor de tí como amiga y persona, sé que estás feliz y orgullosa por este logro del cual formaste parte.

Mis agradecimientos especiales a SENACYT por el apoyo financiero y por siempre abrir las puertas a este tipo de proyecto que busca el desarrollo profesional del recurso humano y por ende el crecimiento investigativo de Panamá.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN	viii
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 ANTECEDENTES.....	2
1.2 SITUACIÓN ACTUAL DEL PROBLEMA.....	9
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	11
1.4 HIPÓTESIS	11
1.5 OBJETIVOS.....	11
1.5.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
CAPÍTULO 2.....	13
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 BIOENERGÍA.....	14
2.1.1 MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.....	14
2.2 MICROALGAS: CARACTERÍSTICAS Y UTILIDAD.....	15
2.3 BIOMASA DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.....	16
2.4 DIGESTIÓN ANAEROBIA	19
2.4.1 DIGESTIÓN ANAEROBIA DE MICROALGAS	20
2.5 MICROALGA EN ESTUDIO	21
CAPÍTULO 3.....	22
3. MÉTODOS	23
3.1 INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN	23
3.2 DEFINICIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	23
3.3 MICROORGANISMOS	23
3.4 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y BACTERIAS METANOGENICAS.....	24
• Obtención y adaptación de inóculo de bacterias metanogénicas.....	24
• Crecimiento de inóculo de microalga.....	24
• Cultivo de la biomasa de microalgas.....	24
• Crecimiento celular	25

• Cosecha y almacenamiento de la biomasa de microalgas	25
3.5 PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE BIOGÁS	26
• Digestores anaerobios	26
• Pretratamiento térmico de la biomasa	27
• Ensayo de digestión anaerobia.....	27
• Determinación de biodegradabilidad de la biomasa	27
• Análisis de biogás y fabricación de curva de calibración de metano y dióxido de carbono.....	28
3.6 ANÁLISIS DE BIOMASA (Arredondo y otros, 2017).....	30
• Determinación de proteínas totales en la biomasa de microalga.....	30
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
CAPÍTULO 4.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1 CULTIVO DE LA BIOMASA DE MICROALGA.....	33
4.2 ANÁLISIS PROXIMALES DE LA BIOMASA PRODUCIDA	35
4.3 PRETRATAMIENTO TÉRMICO DE LA BIOMASA.....	36
4.4 CONSUMO DE DQO EN LOS REACTORES ANAEROBIOS.....	37
4.5 PRODUCCIÓN DE BIOGÁS EN EL ENSAYO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA Y ANÁLISIS QUÍMICO DEL BIOGÁS	39
CAPITULO 5.....	42
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
5.1 Bibliografía citada.....	44
ANEXOS.....	50
1) CURVA DE CALIBRACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR.....	50
2) CURVA DE CALIBRACIÓN DE METANO (CH ₄) y DIOXIDO DE CARBONO (CO ₂)	50
3) PROTOCOLO PARA ANÁLISIS DE PROTEÍNAS TOTALES	52
4) PROTOCOLO PARA ANÁLISIS DE LÍPIDOS.....	53
6) DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)	55
7) CONFIGURACIÓN DEL CROMATÓGRAFO DE GASES PARA ANÁLISIS DEL BIOGÁS.....	57
8) CROMATOGRAMAS	60
9) FOTOGRAFÍAS TOMADAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características distintivas de cada generación de biocombustibles (Siddiki y otros, 2022).	3
Cuadro 2. Especies típicas de microalgas para la producción de biocombustibles (Peng y otros, 2020).	6
Cuadro 3. Investigaciones realizadas por distintos países respecto a la producción de biogás a partir de biomasa de microalgas.	8
Cuadro 4. Composición de microalgas basados en materia seca. (Um y Kim, 2009; Sydney, 2010; Sing, 2012).	16
Cuadro 5. Producción de biomasa en los reactores anaerobios.	33
Cuadro 6. Análisis proximales de la biomasa de microalgas.	35
Cuadro 7. Resultados del análisis de DQO a la biomasa de microalgas.	37
Cuadro 8. Cambio en las concentraciones de DQO en los reactores anaerobios.	37
Cuadro 9. Producción de biogás en los reactores anaerobios.	39
Cuadro 10. Análisis químico del biogás y evaluación del potencial bioquímico de metano (PBM).	40
Cuadro 11. Concentración de patrones para curva de calibración de carbohidratos.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de la producción de biocombustibles a partir de microalgas. (Razzak, 2013; Costa, 2011).	18
Figura 2. Flujograma básico del proceso de digestión anaerobia. (Zabed y otros, 2020).	20
Figura 3. Chlorella sorokiniana (Chader, Mahmah, Chetehouna, & Mignolet, 2011).	21
Figura 4. Diagrama de crecimiento del inóculo de microalgas.	24
Figura 5. Diagrama de producción de biomasa de microalga.	25
Figura 6. Diagrama del sistema de cosecha de la biomasa de microalga.	26
Figura 7. Diagrama del digestor anaerobio y sistema de recolección de gases.	27
Figura 8. Diagrama del sistema para realizar la curva de calibración de gases.	30
Figura 9. Curva de crecimiento celular en la producción de biomasa de microalgas.	33
Figura 10. Microalgas vistas en el microscopio antes (izquierda) y después (derecha) del pretratamiento térmico.	37
Figura 11. Curva de producción de biogás utilizando biomasa de microalgas.	39
Figura 12. Curva de calibración utilizada para la determinar el crecimiento celular de la microalga.	50
Figura 13. Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de metano en las muestras de biogás.	51
Figura 14. Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de dióxido de carbono en las muestras de biogás.	51
Figura 15. Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de proteínas en la biomasa de microalgas.	52
Figura 16. Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de carbohidratos en la biomasa de microalgas.	55

Figura 17. Finca La Hermosa, Caldera. Sitio de muestreo de estiércol vacuno.	63
Figura 18. Preparación de medio de cultivo para crecimiento de microalgas.	63
Figura 19. Inicio de ensayo de producción de biomasa de microalgas.	64
Figura 20. Finalización del ensayo de producción de biomasa de microalgas.	64
Figura 21. Pasta de microalgas producto de la cosecha de la biomasa.	65
Figura 22. Análisis de biomasa de microalgas.	65
Figura 23. Análisis espectrofotométrico del crecimiento del cultivo de microalgas.	66
Figura 24. Biomasa fresca (izquierda) y biomasa pretratada térmicamente (derecha). .	66
Figura 25. Armado de digestores anaerobios.	67
Figura 26. Ensayo de digestión anaerobia.	68
Figura 27. Sistema de dilución de gases utilizado para construcción de las curvas de calibración de CO ₂ y CH ₄	68

RESUMEN

La demanda en la obtención de energía y biocombustibles a partir de fuentes alternativas y sustentables es apremiante cada día, tanto mundialmente como para Panamá, por ello al adoptar en el 2015 la agenda 2030 y los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), se busca contribuir en la generación de biocombustibles. Se reporta que las microalgas son foco de atención en la obtención de biocombustibles de tercera generación, es por esto que el Centro de Investigaciones en Productos Naturales y Biotecnología CIPNABIOT, con el grupo BIOMI, realiza estudios de microalgas y considera al género de *Chlorella* con este fin. Existen diferentes características que las hacen atractivas como su robustez ante temperatura, pH, capacidad para ser cultivada en concentraciones celulares altas. En este estudio se evaluó el potencial de producción de biogás, empleando biomasa de la microalga *Chlorella sorokiniana* obtenida en cultivos con fotobiorreactores (FBRs). La primera fase de esta investigación consistió en el cultivo de *Chlorella sorokiniana* en sistemas batch, en medio de cultivo M8a bajo condiciones controladas de T:23-27°C, pH: 6-8 y luz: 100-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (fase 24 horas de luz). La cantidad de biomasa obtenida fue para **FB1**: 2.0 g/L, **FB2**: 1.96 g/L, **FB3**: 2.35 g/L y **FB4**: 2.47, g/L obteniéndose para carbohidratos 8.64 \pm 0.33%, lípidos 27.41 \pm 3.33% y proteínas 46.06 \pm 1.14%. La producción de biogás se llevó a cabo utilizando bacterias metanogénicas presentes en estiércol bovino, donde se emplearon tres condiciones distintas, (1) microalgas fresca (EDM), (2) biomasa pretratada térmicamente (EDMP) y (3) control (EDC) sin biomasa, la producción de biogás estuvo entre 362 \pm 12.5 mL (EDM), 489 \pm 32.9 mL (EDMP) y 5 mL (EDC) respectivamente. El contenido total de CO₂ y CH₄ se analizó mediante GC/ FID, encontrándose para el CO₂ <1% en ambos tratamientos (EDM y EDMP), el contenido de CH₄ si fue significativo, dando como resultado una producción en el cultivo EDM de 51.7 \pm 1 mLCH₄/g SV y EDMP de 87.4 \pm 5 mLCH₄/g SV. Queda demostrado el valioso aporte de emplear biomasa microalgal para la producción de biogás; como Panamá cuenta con una alta diversidad microalgal, resulta interesante a futuro estos estudios para la generación de biocombustibles alternativos y amigables al ambiente.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

En la actualidad el crecimiento económico y social de las naciones demanda grandes cantidades de recursos naturales entre los que se encuentran mayormente la energía en forma de combustibles fósiles, ya que son fundamentales para los sistemas de producción. Esta gran necesidad cada vez va en aumento y crea la posibilidad de su agotamiento constituyéndose un problema ambiental de carácter energético.

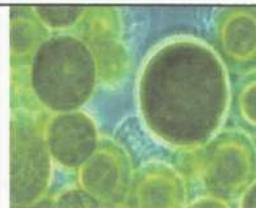
En 1980, el consumo total de energía en el mundo fue de 282,817 cuatrillones de BTU y superó los 500 millones de BTU, en la década del 2010 se estima que para el 2040 el consumo mundial de energía alcance los 815 cuatrillones de BTU lo que representa un aumento del 48% (US Energy Information Administration, 2021).

El consumo de energía en América Latina y el Caribe ha aumentado constantemente a lo largo del tiempo en una estrecha relación con el aumento en las actividades económicas en la región. Entre el año 1971 y 2013 el consumo de energía en esta región se ha triplicado (Balza, Espinasa y Serebrisky. 2016). El uso de los combustibles fósiles como el petróleo, carbón y el gas natural, representaron en 1971 el 69.9% de la energía utilizada por la región, llegando a aumentar hasta el 74.3% para el año 2013; las energías renovables como la energía hidroeléctrica, solar, eólica y biocombustibles disminuyeron su participación del 31% al 24% (Mahlknecht, 2020). El crecimiento de la población mundial y el aumento en la demanda de combustibles fósiles, ha provocado un mayor interés en las fuentes de energía renovable basado en la transformación de la biomasa para producir biocombustibles (Collet. 2010). Según las fuentes de materia prima y las tecnologías de generación, se han clasificado en cuatro grupos como se muestra en el cuadro 1 (Ruan, 2019).

En la búsqueda de la biomasa más adecuada para producir biocombustibles, el concepto de cultivo y producción de biomasa de microalgas (Chandrasekhar y otros, 2021) apareció en el centro de atención para la fabricación de

biocombustibles, debido a varias perspectivas positivas que posee; una de las más importantes es la aplicabilidad al concepto de biorrefinería.

Cuadro 1. Características distintivas de cada generación de biocombustibles (Siddiki y otros, 2022).

Primera generación	Segunda generación	Tercera generación	Cuarta generación
Fuentes relacionadas con los alimentos	Fuentes no relacionadas a los alimentos	Fuentes de microalgas	Fuentes de microalgas modificadas genéticamente
			
<ul style="list-style-type: none"> • Requiere tierras cultivables para la generación de materias primas. • Por el uso de fertilizantes y pesticidas conllevan a un impacto negativo en el medio ambiente. • Tiene efecto adverso en la seguridad alimentaria. • Alta eficiencia energética debido a la amplia producción comercial. • El agua salobre y salada son inadecuadas para los cultivos. 	<ul style="list-style-type: none"> • No afecta la seguridad alimentaria. • Requiere tierras cultivables. • Depende menos de los fertilizantes. • No conlleva impactos en la biodiversidad. • Existe una alta producción comercial. • El agua salobre y salada son inadecuadas para los cultivos. 	<ul style="list-style-type: none"> • No afecta la seguridad alimentaria. • No conlleva impactos en la biodiversidad. • No se requieren tierras arables para el cultivo de la materia prima. • La materia prima se puede cultivar en aguas de desecho. • La materia prima se puede cultivar en condiciones hostiles. • No existe gran producción comercial; existe una extensiva investigación al respecto 	<ul style="list-style-type: none"> • No afecta la seguridad alimentaria • No se requieren tierras arables para el cultivo de la materia prima. • La materia prima se puede cultivar en aguas de desecho. • La materia prima se puede cultivar en condiciones hostiles. • tecnología en etapas tempranas de desarrollo.

Cherubini y otros (2007) hacen referencia a la **IEA Bioenergy Task 42 on biorefineries** y a su definición de biorrefinería como “El procesamiento sostenible de biomasa en un espectro de productos comercializables y energía”. Además, Cherubini en 2010 explica que el concepto de biorrefinería abarca una amplia gama de tecnologías capaz de separar los recursos de biomasa en sus componentes básicos (carbohidratos, proteínas, triglicéridos, etc.) para convertirlos en productos de valor agregado, biocombustibles y productos

químicos. También se define que la biorrefinería es una instalación (o red de instalaciones) que integra procesos y equipos de conversión de biomasa para producir biocombustibles de transporte, energía y productos químicos.

En las biorrefinerías se han utilizado múltiples tipos de biomásas para llevar a cabo la producción de biocombustibles además, se han utilizado biomásas provenientes de cultivos agrícolas destinados a la alimentación humana (primera generación) tales como frutas (Manhongo y otros, 2021), Maíz (Gandam y otros, 2022), caña de azúcar (Freitas y otros, 2022), café (Atabani y otros, 2022), arroz (Le y otros, 2022), entre otros. La desventaja de esta biomasa para la producción de energía es que causan una competencia indeseable entre alimentos y piensos para cría de animales; además, se han utilizado aceites no comestibles y residuos agrícolas lignocelulósicos (segunda generación) (Malani, Choudhury y Moholkar, 2020; Nitiéma-Yefanova y otros, 2017). Para la producción de estos biocombustibles existen varias dificultades como la baja productividad de la biomasa, la necesidad de tierras arables y grandes cantidades de aguas, además de sistemas de pretratamiento de la biomasa (Hackenberg, 2008).

Las microalgas ofrecen una materia prima prometedora para biocombustibles, ya que tienen un inmenso potencial para contribuir a un futuro de energía y medio ambiente limpio (Cheng y otros, 2022). El biocombustible de microalgas (tercera y cuarta generación) tiende a ser una fuente de energía alternativa viable para sustituir o complementar los combustibles fósiles, basado en las desventajas relacionadas con los biocombustibles de primera y segunda generación tales como las consecuencias perjudiciales que se generan en seguridad alimentaria, disponibilidad de agua, mercados mundiales de alimentos, deforestación y extensión de cobertura terrestre (Siddiki y otros, 2022).

Pessôa y otros (2021), mencionan que la biorrefinería basada en microalgas es un enfoque que ha ganado atención porque la producción de biomasa se puede realizar de manera integrada utilizando el marco de la bioeconomía circular; además que estos microorganismos son candidatos prometedores como materia prima para la biorrefinería debido a su versatilidad. Estos mismos autores hacen

mención que, en comparación con las plantas, las microalgas tienen una eficiencia fotosintética superior, donde no requieren tierra cultivable, cantidades excesivas de agua y dependencia de la estacionalidad. Otra ventaja en comparación con las plantas es que estos microorganismos llevan a cabo captura biológica de CO₂ con una eficiencia diez veces mayor, siendo un proceso con múltiples primacías tales como: ser un método ambientalmente sostenible, utilizar directamente la energía solar y coproducir materiales de alto valor añadido a partir de la biomasa como los biocombustibles (Pires y otros, 2012). Según Javed y otro (2019), las microalgas también pueden producir biomasa útil para biorrefinerías al ser cultivadas en aguas residuales, ya que este medio constituye una gran oportunidad para las microalgas que puede considerarse de bajo costo y como un nuevo mercado potencial. A través de sus diversos modos de nutrición (fototrofia, heterotrofia, mixotrofia), las microalgas pueden eliminar eficazmente una amplia gama de componentes químicos de las matrices acuosas.

Varios estudios han demostrado que el uso de aguas residuales es una necesidad para el desarrollo de la industria de producción de biocombustibles con microalgas, esto debido a que favorece el costo de producción. Además, los nutrientes y el agua deben usarse racionalmente debido a tres hechos principales: (1) los nutrientes tienen un alto impacto en la eficiencia ambiental de la producción de microalgas; (2) la escasez de agua es un problema global bien conocido; y (3) el fósforo es un recurso no renovable. Estos inconvenientes económicos y medioambientales pueden superarse en parte mediante el uso de aguas residuales (industriales, agrícolas o urbanas) como sustrato de crecimiento para la producción de biomasa microalgal (Uggetti, García, Álvarez, & García-Galán, 2018).

Las microalgas autótrofas consumen CO₂ y producen carbohidratos, proteínas y lípidos, que pueden ser utilizado como materia prima de biocombustibles, incluyendo biodiésel, biogás, biohidrógeno, bioetanol, butanol, bioaceite, carbón e incluso energía (Peng y otros, 2020). En el cuadro 2 se pueden observar

especies de microalgas que son típicas para la producción de biocombustibles en biorrefinerías.

Las biorrefinerías pueden convertir la biomasa de microalgas en fuentes de energía aplicando métodos como la conversión bioquímica, reacción química, combustión directa y conversión termoquímica; siendo así las microalgas una fuente de materia prima para la producción de combustibles líquidos y gaseosos renovables tales como el biodiésel, bioetanol, biogás, entre otros.

Cuadro 2. Especies típicas de microalgas para la producción de biocombustibles (Peng y otros, 2020).

Especies	Biocombustibles	Crecimiento de microalgas y/o producción de biocombustibles	Cultivo/ Condiciones de reacción
<i>C. protothecoides</i>	Biodiesel	55% de lípidos	heterotrofia; limitación de nitrógeno
<i>S. obliquus</i>	Biohidrógeno	300 $\mu\text{mol H}_2/(\text{mg Chl}\cdot\text{h})$	proceso indirecto; biofotólisis ligera; (Fe-Fe) enzimas
<i>Nannochloropsis salina</i>	Biogás	0.70 L biogás/g	Fotobiorreactor, gran escala, 35 °C.
<i>Chlorococum sp.</i>	Bioetanol	38 wt%	Fermentación
<i>Spirulina sp.</i>	Biometanol		Gasificación/fermentación anaeróbica
Consorcio de microalgas	Biocarbón	45.0 \pm 5.9% de biocarbón sólido (con densidad de energía 8–10 MJ/kg)	Licuefacción hidrotermal

La energía a partir de biogás es una tecnología que se considera como combustible moderno, el biogás procede de la degradación natural de la materia orgánica por parte de microorganismos en condiciones ausentes de oxígeno. Este producto de la digestión anaerobia puede ser utilizado para generar calor, electricidad o como combustible para vehículos (Scarlat, Dallemand y Fahl, 2018), esta tecnología ha llamado la atención en los últimos años, ya que se ha convertido en una de las vías de energía renovable más atractivas, además de los

beneficios económicos de la generación de energía también brinda beneficios medioambientales como la disminución de la contaminación de fuentes de agua, suelo y aire (Møller, Sommer y Ahring, 2004).

La digestión anaerobia se utilizó principalmente como un proceso para estabilizar y tratar desechos de alto contenido de demanda química de oxígeno (DQO), en lugar de una alternativa para generar energía (biogás) (Abbasi, Tauseef y Abbasi, 2012). El biogás se puede producir a partir de diversos recursos de biomasa, incluidas microalgas, desechos de alimentos, residuos agrícolas, estiércol animal, desechos avícolas, desechos sólidos municipales, desechos industriales, desechos forestales y algunos cultivos energéticos dedicados a este fin; este biocombustible generado por la digestión anaerobia está compuesto por metano principalmente (55-70%), CO₂ (30-45%) y pequeñas cantidades de H₂S, H₂O y H₂ (50-2000ppm)(Braun, 2007). Aunque cada biomasa tiene su propio potencial y factibilidad para generar biogás, las microalgas han mostrado mucho interés en este propósito desde la década de 1950, particularmente por el rápido crecimiento (Ward, Lewis, y Green, 2014) y la alta captación de CO₂ necesaria para su crecimiento (Wang y otros , 2008).

La digestión anaerobia de biomasa de microalgas fue reportada por primera vez en 1957 por Golueke y colaboradores usando *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* que produjo 0.17–0.32 L CH₄/g VS. Son muchos los estudios de producción de biogás aplicando microalgas que se han realizado desde 1957, y hasta la actualidad se siguen realizando estas investigaciones como se muestran en el cuadro 3. El género más utilizado es *Chlorella sp.* como biomasa principal. González-Fernández, Sialve, Bernet y Steyer en 2012, hace referencia a diversos estudios con producción de biometano aplicando biomasa de microalgas del género *Chlorella*, estos estudios son los siguientes: producción de biogás con biomasa de *Chlorella* y *Scenedesmus* (0.17–0.32 L-CH₄/g VS, Golueke., Oswald, & Gotaas (1957)); producción de biogás con biomasa de *Chlorella vulgaris* (0.31–0.35 L-CH₄/g VS, Hernández y Córdoba (1993)); producción de biogás con biomasa *Chlorella* (0.35, 0.44, 0.47 y 0.60 L-CH₄/g VS, De Schamphelaire y

Verstraete (2009)); producción de biogás con biomasa *Chlorella Kessleri* (0.22 L-CH₄/g VS, Mussnug, Klassen, Schlüter, & Kruse (2010)).

En un estudio Feroso y otros (2016) evaluaron el potencial de producción de biometano de distintas microalgas dominantes, entre estas microalgas se encontraba *Chlorella sorokiniana* la cual presentó una producción de 211 ± 2 mL-CH₄/g VS. Córdova, Passos, y Chamy 2019 en un estudio aplicaron pretratamientos enzimáticos para inducir el daño/lisis celular y la solubilización de la materia orgánica de *Chlorella sorokiniana* y así aumentar la producción de biogás. Los cultivos de *Chlorella sorokiniana* se sometieron a tres pretratamientos enzimáticos diferentes, cada uno bajo cuatro condiciones diferentes de relación enzima/sustrato, pH y tiempo de aplicación. Los resultados mostraron aumentos superiores al 21 % en la producción de biogás para todos los pretratamientos enzimáticos.

Cuadro 3. Investigaciones realizadas por distintos países respecto a la producción de biogás a partir de biomasa de microalgas.

Microalga	País	Investigadores	Año
<i>Chlorella sp., Scenedesmus</i>	Estados Unidos	Golueke C., Oswald W., Gotaas H.	1957
<i>Chlorella sp., Scenedesmus, Euglena y Oscillatoria</i>	Estados Unidos	Golueke C. G. y Oswald W.J	1959
<i>Spirulina maxima</i>	Canada	RSamsona R. Leduy	1983
<i>Macroystis pyrifera and Durvillea antarctica</i>	Chile	Vergara-Fernández A.; Vargas G. y otros	2008
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Francia	González Fernández C.; Bernet N.; 2012 Steyer J.; Sialve B.	2012
<i>Arthrospira maxima</i>	Reino Unido	Inglesbya A., Fisher A.	2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	China	Zhao, Baisuo; Ma, Jingwei; Zhao, Quanbao; Y Otros	2014
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Chile	Capson-Tojo, G., Torres, A., Muñoz, R., Bartacek, J., & Jeison,	2017
Mezcla	España/Bélgica	Arashiro, L. T., Ferrer, I., Pániker, C. C., Gómez-Pinchetti, otros.	2020

Hamidian y Zamani (2021) llevaron a cabo un estudio de obtención de biomasa de *Chlorella sorokiniana* cultivada en aguas residuales de productos lácteos para luego producir biogás, dando resultados de productividad teórica de biometano que oscilaron entre 0,353 y 0,644 L-CH₄/g VS.

En Panamá ya se han realizado estudios sobre producción de biogás en los que se utilizan diferentes tipos de biomasa como lodos orgánicos de la planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Juan Diaz, Panamá (Chen, Arias, y Deago, 2021), biosólidos de aguas residuales de una planta avícola (Ramírez, Deago, y Tejedor, 2020), aguas residuales domesticas (Ramírez, Isaza, 2019), el ministerio de ambiente también desarrolla programas de producción sostenible en donde fomenta la instalación de sistema de aprovechamiento de desechos como es el caso de una planta porcina a la que se le instaló un sistema de digestión anaerobia para producir biogás a partir de las aguas residuales (Mi Ambiente 2021).

A la fecha en Panamá no se registran estudios de producción de biogás utilizando biomasa de microalgas, en el centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT-UNACHI) se propuso esta investigación donde se buscó producir biometano a partir de la biomasa microalgal de *Chlorella sorokiniana*, con el propósito futuro de dar apoyo y alternativas para contrarrestar los problemas medioambientales, energéticos y también colaborar con el cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible.

1.2 SITUACIÓN ACTUAL DEL PROBLEMA

Panamá proyecta un crecimiento económico del 8.2% para el año 2022 según informe de la CEPAL (Comisión Económica para América Latina y El Caribe). La demanda de energía en una sociedad guarda relación con el grado de desarrollo económico del país, por lo que, si un país aumenta su economía mayor es la demanda de energía. Según el informe nacional de monitoreo de la eficiencia energética de Panamá 2020 la generación de energía en el país estuvo compuesta por un 70.2% proveniente del sector hidroeléctrico, eólico 5.3%, solar 2.1% y biogás 0.2%, dentro de las no renovables está el bunker C 11.8%, diésel

liviano 0.6%, carbón 4.3% y gas natural 5.6%. El total renovable fue de 77.7% y no renovable 22.3% (CEPAL, 2020).

La problemática no es solo la demanda energética existente y cada vez en aumento, también es el impacto y la contaminación en el medio ambiente que se genera al suplir la energía requerida; la contaminación suele medirse en términos de la concentración de CO₂ en la atmósfera en partes por millón (ppm) y las formas en que las actividades humanas aportan más CO₂ a la atmósfera es la quema de combustibles fósiles y la deforestación. El incremento en las concentraciones atmosféricas de CO₂ está estrechamente relacionado con el aumento en la temperatura media del planeta, debido a que es un gas de efecto invernadero lo que provoca el cambio climático.

En septiembre de 2015, Panamá adoptó mediante Decreto Ejecutivo la Agenda 2030 y los ODS (objetivos de desarrollo sostenible) como parte de su agenda de desarrollo nacional; el ODS 7 (energía asequible y no contaminante) tiene entre sus metas aumentar considerablemente la proporción de energía renovable en el conjunto de fuentes energéticas. En el informe nacional de monitoreo de Panamá 2020 de la CEPAL se sugiere mejorar la utilización de biomasa para generación de energía y aumentar el esfuerzo en la utilización de fuentes de energía renovable y disminución de los gases de efecto invernadero.

Para lograr cumplir las metas de las ODS 7 y las sugerencias de la CEPAL existen investigaciones que buscan tratar esos mismos objetivos empleando microalgas como biomasa para generar biocombustible sumando el beneficio que en su crecimiento, las microalgas fijan grandes cantidades de CO₂. De momento en Panamá no se han registrado investigaciones utilizando esta tecnología. Por ello planteamos la siguiente pregunta de investigación: **¿Cuál es el potencial que tiene la biomasa de *Chlorella sorokiniana* para producir biogás?**

1.3 JUSTIFICACIÓN

El biogás es considerado una de las fuentes de energía renovable que presenta un alto potencial para sustituir las energías convencionales y no renovables. Se produce durante la biodegradación de materia orgánica y puede utilizarse como fuente de energía para diversos fines, tales como generación eléctrica, producción de calor, alternativa al gas natural.

Las microalgas despiertan un creciente interés, ya que su composición las hace aptas para ser una buena fuente de biomasa y bioenergía. Ahora bien, para convertir las microalgas en biogás, y así en energía, es necesario realizar un proceso conocido como digestión anaerobia, que si bien nació como un procedimiento de estabilización de residuos, hoy es considerada como una tecnología de recuperación de recursos, con especial énfasis en la recuperación de energía mediante la producción de biogás como biocombustible renovable.

En Panamá se ha avanzado en la búsqueda de biomasa óptimas para su conversión en biocombustibles utilizando la tecnología de la digestión anaerobia, El Centro De Investigaciones De Productos Naturales Y Biotecnología (CIPNABIOT) se planteó el uso de biomasa de microalgas para producir bioenergía por las características positivas que poseen estos microorganismos; entre las que más resaltan están su fácil adaptación al entorno, crecimiento celular rápido y la gran captación de CO₂ necesaria para su rápido crecimiento celular.

1.4 HIPÓTESIS

Ho: La biomasa de microalga *Chlorella sorokiniana* no tiene potencial como sustrato para la producción de biogás.

Ha: La biomasa de microalga *Chlorella sorokiniana* tiene potencial como sustrato para la producción de biogás.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la producción de biogás a partir de la digestión de biomasa de la microalga *Chlorella sorokiniana* con cultivos biotecnológicos.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la composición química de la biomasa de microalga *Chlorella sorokiniana*.
- Emplear estiércol vacuno para generar inóculo de bacterias metanogénicas.
- Generar biogás a partir de biomasa de la microalga *Chlorella sorokiniana* empleando bacterias anaerobias de estiércol vacuno.
- Comparar el rendimiento de producción de biogás en la digestión de biomasa de microalgas, según tratamientos: biomasa tratada térmicamente y biomasa no tratada térmicamente.
- Caracterizar químicamente el perfil de gases contenidos en el biogás producido (porcentaje de metano contenido en el biogás).

CAPÍTULO 2

2 MARCO TEÓRICO

2.1 BIOENERGÍA

La bioenergía es la energía que proviene de materia orgánica, de diferentes fuentes, ya sea producida por organismos fotosintéticos que captan la energía solar, dióxido de carbono y agua para producir biomasa; la energía queda almacenada en los enlaces químicos de la biomasa y puede ser liberada en múltiples procesos como la combustión, fermentación, descomposición, hidrólisis o la digestión. Otras fuentes de materia orgánica para la producción de bioenergía son los residuos biológicos de animales o humanos y la basura orgánica residual de las sociedades humanas (Sampeiro y Jiménez, 2010).

La bioenergía ha estado con las civilizaciones humanas desde el principio, al utilizar la leña como biocombustible para producir calor y cocinar los alimentos (Ruan y otros, 2019). En la actualidad los biocombustibles pueden ser producidos bajo criterios de sustentabilidad teniendo las siguientes ventajas: son renovables (Zhang y Ghaly, 2013), son neutros en CO₂ y gases de efecto invernadero (Zhang y Ghaly, 2012), generan pocas o nulas emisiones de SO_x (Zhang y otros 2016), son biodegradables (Chew y Bhatia, 2008) y generan menos emisiones de NO_x (Zhang y otros, 2018). Si se aprovecha la capacidad de regeneración de la biomasa utilizada para fabricar biocombustibles se puede obtener energía útil y factible desde el punto de vista económico y ambiental.

2.1. 1. MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

- **Biomasa lignocelulósica:** esta biomasa está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina; en este tipo de biomasa se han utilizado mayormente los residuos agrícolas como paja de arroz (Sharma, Singh y Arya, 2020), paja de trigo (Qureshi, Cotta y Singh, 2013), paja de sorgo (Stamenković y otros, 2020), Rastrojo de maíz (Qureshi y otros, 2010), bagazo de caña de azúcar (Ojeda, Ávila, Suárez y Kafarov, 2011). Los residuos forestales más utilizados son la madera, aserrín, ramas,

astillas de madera, (Ragauskas y otros, 2006). Entre los cultivos energéticos los que más se utilizan como sustratos son pasto varilla (McLaughlin, 1992), miscanthus (Heaton, Dohleman y Long, 2008), pasto (Slewinski, 2012).

- **Desechos sólidos:** las principales biomásas utilizadas para producir energía de desechos sólidos son los lodos de aguas residuales (Bharathiraja y otros, 2014), desechos sólidos municipales (Shi, Koh y Tan, 2009), desechos alimenticios (Karmee, 2016), estiércol animal (Harper, Flesch, Weaver y Wilson, 2010).
- **Cultivos oleaginosos:** esta biomasa como el nombre lo dice tiene un alto contenido en aceites, los cultivos más estudiados para la producción de energía son: el girasol (Requena y otros, 2011), maíz (Patzek, 2004), coco (Suryanto, 2015), maní (Russo y Webber, 2012), canola (Baroi, Mahto, Niu, y Dalai, 2014).
- **Algas:** son organismos fotosintéticos acuáticos que se dividen en dos clasificaciones, macro y microalgas; las algas son una materia prima muy atractiva para la producción de biocombustibles por los siguientes atributos que las caracterizan: no son recursos alimentarios; no son tóxicos; se pueden cultivar en aguas de desecho como las aguas residuales; utilizan CO₂ como fuente de carbono; son altamente biodegradables y tienen un rápido crecimiento (Suganya, Varman, Masjuki, y Renganathan, 2016).

2.2 MICROALGAS: CARACTERÍSTICAS Y UTILIDAD

Las microalgas son organismos microscópicos que típicamente crecen suspendidos en el agua y son impulsados por el mismo proceso fotosintético de las plantas superiores (Hanelt, 2007). Son los organismos de más rápido crecimiento y necesitan aproximadamente 2 toneladas de CO₂ para producir 1 tonelada de biomasa (Haag, 2007).

Estos microorganismos fueron los responsables del cambio en la composición de la atmósfera primitiva hace unos 3500 millones de años, aumentando el nivel de

oxígeno, originando una atmósfera rica en este gas, que ha permitido el desarrollo de la vida tal como la conocemos (Demirbas y Demirbas, 2010).

Las células (microalgas) son fábricas impulsadas por la luz del sol que pueden convertir el dióxido de carbono (CO₂) en materias primas para producir biocombustibles (biohidrógeno, biodiesel, bioetanol, biogás y otros), alimentos de origen químico para animales y compuestos bioactivos de alto valor (Spolaore, 2006, Milledge, 2011, Razzak et al., 2013). La biomasa de microalgas contiene tres componentes principales: proteínas, carbohidratos y lípidos, su composición de la biomasa varía según la microalga (cuadro 4).

Cuadro 4. Composición de microalgas basados en materia seca. (Um y Kim, 2009; Sydney, 2010; Sing, 2012).

Especie	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26
<i>Chlorella Vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	4-9	8-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17

2.3 BIOMASA DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.

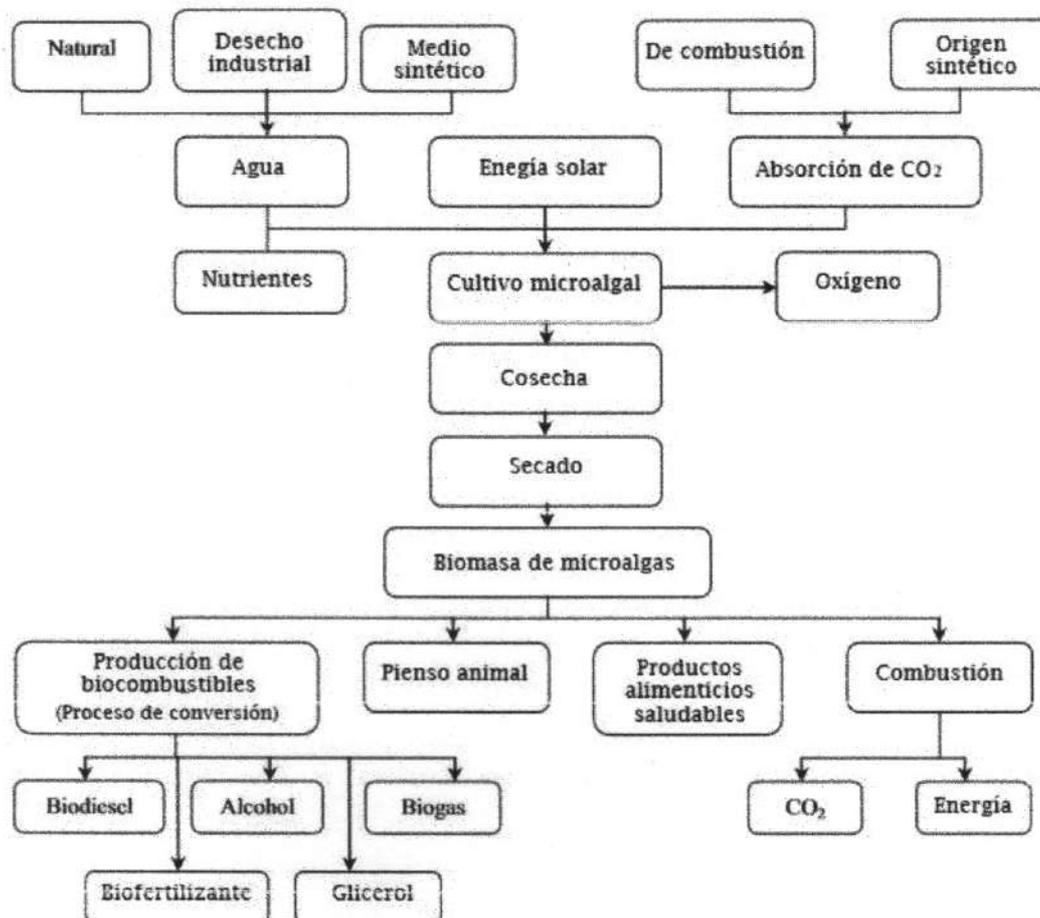
Las microalgas generan un uso mucho más eficiente de la energía solar que la agricultura convencional, por lo tanto, tienen un mayor potencial para la producción de biomasa con menos necesidad de tierra (Benemann 2007).

La investigación más extensa sobre el desarrollo de biocombustibles a partir de microalgas fue realizada por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL) de 1978 a 1996 (Sheehan, 1998), concluyó que un enfoque más práctico

para la producción a corto plazo de biocombustibles de microalgas es utilizar el tratamiento de aguas residuales para su propagación, una tecnología ya bien desarrollada (Sheehan, 1998; Oswald 2003). En la figura 1 se muestra un flujograma para la obtención de biocombustibles.

El alto potencial de las microalgas les convirtió en un sustrato deseable para varias aplicaciones comerciales: en la alimentación del ganado, cría de peces, cerdos y aves de corral (Sukias, Craggs. 2007); la clorofila con fines cosméticos (Spolaore, 2006); los compuestos bioactivos como antioxidantes, antibióticos, toxinas para la industria farmacéutica (García-Casal, 2009) y en la industria de la salud para el control del peso (Bumbak, 2011), también, debido a los altos contenidos de vitaminas, polisacáridos y proteínas son utilizadas como suplemento nutricional para el consumo humano. Además, se utilizan como fertilizantes o incluso pigmentos (Borowitzka, 1988).

Figura 1. Diagrama de flujo de la producción de biocombustibles a partir de microalgas. (Razzak, 2013; Costa, 2011)



Para producir biocombustibles a partir de microalgas, la biomasa necesita ser transformada por procesos de conversión bioquímica o termoquímica (Brennan, Owende, 2010; Demirbas, 2009). A través, de los métodos termoquímicos como la gasificación, la pirólisis, la hidrogenación y la licuefacción, se podrían generar biocombustibles líquidos o gaseosos (McKendry, 2002; Miao, Wu, 2004). El enfoque bioquímico consiste en los procesos de fermentación y digestión anaeróbica. Mediante la transformación bioquímica, las microalgas podrían convertirse en etanol, metano, hidrógeno, gas natural sintético (SNG), alcoholes y alcanos (Pittman, 2011).

2.4 DIGESTIÓN ANAEROBIA

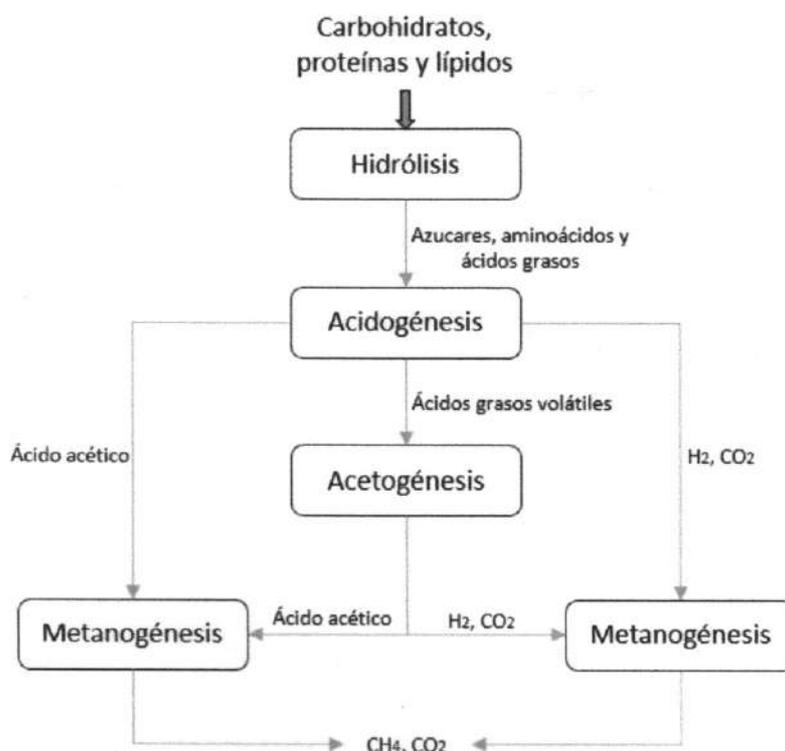
La digestión anaerobia es un proceso natural que ocurre en ausencia de oxígeno que usualmente ocurre en cursos de agua, suelos húmedos y sedimentos, dando como resultado una mezcla de gases llamada biogás (Kythreotou, Florides y Tassou, 2014). La digestión anaerobia ha existido como tecnología desde hace mucho tiempo atrás.

En el mundo industrializado, la digestión anaerobia ha sido mayormente empleada para tratar aguas residuales y residuos húmedos. Las principales aplicaciones tecnológicas de la digestión anaerobia han sido el tratamiento de los lodos derivados de las aguas residuales, viéndose desde los años 80 el uso más frecuente de aguas residuales provenientes de industrias (Van Lier y Lubberding 2002). Otras aplicaciones de la tecnología son la estabilización de residuos y lodos (semi) sólidos, residuos de cultivos y residuos sólidos urbanos (Mata-Alvarez, 2000).

La digestión anaerobia permite el tratamiento de residuos de alta carga orgánica para reducir su volumen y su carga y a la vez recuperar biogás, que es útil como biocombustible (Awe y otros, 2017). Según este mismo autor en la digestión anaerobia la materia orgánica se transforma en CH_4 (55-70%), CO_2 (30-45%) y trazas de otros gases como H_2S , H_2 y N_2 ; además, puede variar según los microorganismos y las condiciones del proceso.

Durante el proceso de digestión anaerobia se consideran relevantes cuatro grupos de bacterias: (1) las hidrolíticas que descomponen los carbohidratos, lípidos y proteínas en moléculas simples: azúcares, ácidos grasos de cadena larga y aminoácidos respectivamente. (2) acidogénicas que convierten esas moléculas en ácidos grasos de cadena larga, alcoholes, CO_2 y H_2 . (3) acetogénicas que convierten los ácidos de cadena larga alcoholes en ácido acético, H_2 y CO_2 . (4) metanogénicas que transforman todos estos productos intermediarios en CH_4 y CO_2 (Kwietniewska y Tys, 2014). En la figura 2 se muestra un flujograma de las cuatro etapas básicas del proceso de digestión anaerobia.

Figura 2. Flujograma básico del proceso de digestión anaerobia. (Zabed y otros, 2020).



2.4.1 DIGESTIÓN ANAEROBIA DE MICROALGAS

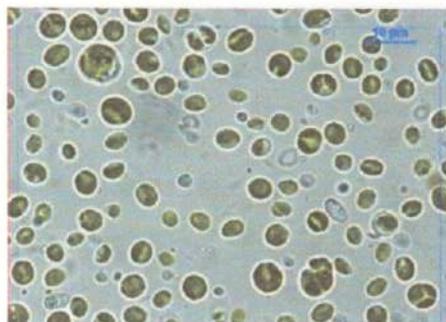
La degradación anaeróbica de las microalgas es un proceso que ocurre naturalmente en los ambientes acuáticos después que las células de las microalgas se van al fondo de los cuerpos acuáticos en las zonas anóxicas y afóticas donde finalmente mueren y se rompen. La remineralización de los nutrientes en estas capas anóxicas de los ambientes acuáticos es responsable de la liberación de amonio y fosfato, por tanto, el reciclaje de estos elementos nutritivos importantes, pueden eventualmente sostener el crecimiento de las comunidades fitoplanctónicas (Vandenbroucke y Largeau 2007). Las características que hacen más atractivas a las microalgas en cuanto a la generación de biocombustibles, son que tienen una mayor capacidad de absorción de nutrientes y CO₂ en comparación con las plantas terrestres, alta tasa de crecimiento y capacidad de utilizar el CO₂ atmosférico para la producción de biomasa (Kumar y otros, 2016).

La biomasa de microalgas tiene gran cantidad de lípidos que va desde un 7-23%, proteínas 6-71% y carbohidratos 5-64%, donde estas cantidades dependen de las condiciones del cultivo durante el crecimiento y la especie de microalga (Becker, 2007; Elser, 2000). La estructura de la pared celular es importante por la vulnerabilidad de las microalgas a la digestión. Según Takeda (1996) en su investigación sobre las paredes celulares de algunas especies de *Scenedesmus* dice que la estructura de la pared celular de las microalgas consiste en glucosa, manosa y galactosa. Esos compuestos pueden formar celulosa y hemicelulosa, que provocan una alta resistencia de las paredes celulares a la hidrólisis enzimática y limitan su disponibilidad para la digestión anaeróbica.

2.5 MICROALGA EN ESTUDIO

Las microalgas verdes del género *Chlorella* son atractivas porque pueden crecer tanto fototrófica como heterotróficamente con una alta concentración de biomasa, recientemente el cultivo de esta microalga se ha visto prometedora para la producción de biocombustibles por su elevada tasa de crecimiento (Liu y otros, 2010). Es un alga termotolerante con temperaturas soportadas de hasta 42°C y crecimiento óptimo a 37°C (Li, Zheng, Yu, y Chen, 2013). Esta microalga (figura 3) es una especie robusta, pequeña (diámetro 2-4.5 µm), capaz de crecer en varias fuentes de carbono y nitrógeno, lo que la hace ideal para el cultivo en materias primas de desecho (Ramanna y otros, 2014; Bohutskyi y otros 2016) y tiempos de duplicación de entre 4 y 6 horas.

Figura 3. *Chlorella sorokiniana* (Chader, Mahmah, Chetehouna, & Mignolet, 2011).



CAPÍTULO 3

3 MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

Dentro de la instrumentación utilizada para esta experiencia se emplearon vasos de 100 a 1000 mL (KIMAX-KIMBLE), matraces Erlenmeyer de 250 a 2000 mL, pipetas de 5 y 10 mL, sistema de filtración al vacío (KIMAX), filtros de membrana de microfibras (Grado F, 4.7cm-Thomas Scientific), micropipetas de 1000µL a 10000 µL (Eppendorf). Para la circulación de los medios de cultivo se utilizan bombas Whisper 20 (Tetra, china), la temperatura y el pH fueron medidos con un medidor OAKTON 700 (OAKTON, USA). La intensidad de la luz PAR se registró usando un medidor de luz LI-250A (LI-COR Biosciences, Alemania). El horno utilizado fue un P-SELECTA (J.P. SELECTA, España), una centrifuga (Hettich MIKRO 220R, Alemania), una autoclave (Yamato SE-510). El espectrofotómetro utilizado para el análisis de DQO y proximales de biomasa es un HACH DR3900 (HACH Company, Alemania) y para el análisis del biogás se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llamas (VARIAN 450-GC). Los sólidos totales y volátiles se realizaron utilizando la mufla Thermo Scientific, modelo F6010.

3.2 DEFINICIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Esta investigación se centró en el uso de biomasa de microalgas como sustrato para la producción de biogás, una sustancia en cuya composición predominó el metano que es útil como combustible o para la generación de energía eléctrica o calórica aportando al uso de nuevas fuentes de energía.

El estudio consistió cultivar biomasa de la microalga *Chlorella sorokiniana*, su cosecha y posterior aplicación como sustrato para que bacterias metanogénicas procedentes de excremento vacuno lo transformen y produzcan biogás; por último para conocer la concentración de metano en el gas producido se llevó a cabo el análisis del biogás.

3.3 MICROORGANISMOS

- Bacterias metanogénicas: Se utilizaron bacterias procedentes del excremento bovino muestreado en la finca La Hermosa en el corregimiento de Caldera en el distrito de Boquete.

- Microalga: Se utilizó *Chlorella sorokiniana* (CCAP211/8K) la cual reposa en el banco de cepas del CIPNABIOT, la misma fue donada por el Dr. Carlos Vílchez del grupo BITAL-Universidad de Huelva, España.

3.4 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y BACTERIAS METANOGENICAS

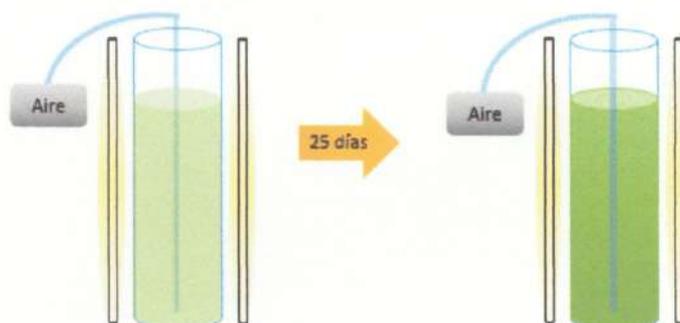
- **Obtención y adaptación de inóculo de bacterias metanogénicas**

La muestra de excremento vacuno se diluyó 1:10 con agua destilada, se filtró y se ajustó a pH neutro con bicarbonato de sodio. El caldo obtenido se constituyó de bacterias metanogénicas y nutrientes, colocado en oscuridad a temperatura de 35°C hasta la no generación de biogás (20 días). Acabado los nutrientes, se enriqueció el caldo con sustrato a base de microalgas (biomasa) hasta lograr su adaptación (aproximadamente 25 días).

- **Crecimiento de inóculo de microalga**

La microalga *Chlorella sorokiniana* se cultivó empleando un sistema estático con un volumen de 2 litros (figura 4) utilizando medio de cultivo M8a con agitación constante y burbujeo de aire, a temperatura de 27 a 30°C e iluminación PAR durante 25 días para aumentar su concentración celular.

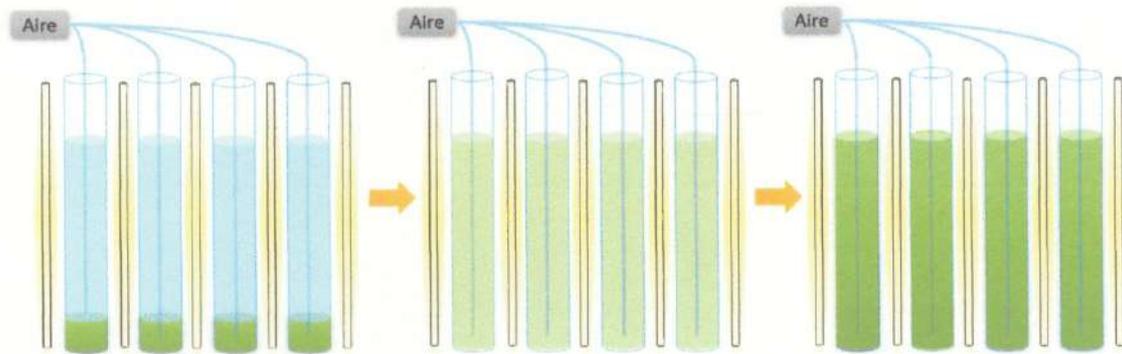
Figura 4. Diagrama de crecimiento del inóculo de microalgas.



- **Cultivo de la biomasa de microalgas**

0.5 litros del inóculo de microalgas se colocaron en cuatro fotobiorreactores estáticos de 10 litros y se le añadió medio de cultivo M8 fresco hasta un volumen de cultivo de 6 litros (figura 5); las condiciones del cultivo en los fotobiorreactores fueron iguales a las utilizadas para el crecimiento del inóculo.

Figura 5. Diagrama de producción de biomasa de microalga.



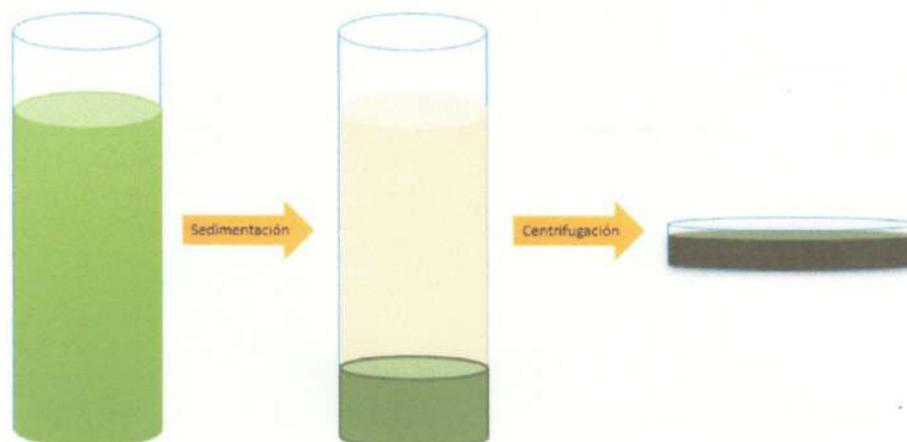
- **Crecimiento celular**

La evaluación de la cinética de crecimiento se realizó por técnicas espectrofotométricas, evaluándose la cantidad de biomasa (Cuaresma y otros, 2009). El crecimiento fue evaluado diariamente, en un periodo de 30 días. Las mediciones de crecimiento se realizan utilizando 1 mL de cultivo y dependiendo de la concentración se agrega la cantidad de agua para la dilución (Factor de dilución). Esta técnica se realizó con el espectrofotómetro HACH DR3900 a una longitud de onda de 680 nm.

- **Cosecha y almacenamiento de la biomasa de microalgas**

Cada 30 días se realizó cosecha de la biomasa, se recolectó de cada fotobiorreactor 4 litros de cultivo bajo sedimentación (Por medio del peso de las células en el medio, estas van al fondo durante un periodo entre 24-48 horas) a temperatura de 27 °C. La biomasa recolectada se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos, la pasta recolectada se llevó a refrigeración (5-8 °C) (ver Figura 6). Esta operación se repitió (n=5), hasta obtener suficiente biomasa para los ensayos de digestión y los análisis de la biomasa.

Figura 6. Diagrama del sistema de cosecha de la biomasa de microalga.



3.5 PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE BIOGÁS

- **Digestores anaerobios**

- ✓ Ensayo de digestión control (**EDC**): se colocaron 220 mililitros de inóculo bacteriano y se le añadió 275 mililitros de agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 500 mL.
- ✓ Ensayo de digestión de microalgas sin pretratamiento térmico de la biomasa (**EDM**): se colocan 220 mililitros de inóculo bacteriano + 35 mililitros de concentrado de microalgas (sustrato) + 245 mililitros de agua destilada (Volumen total: 500 mL)
- ✓ Ensayo de digestión de microalgas con pretratamiento térmico (ver descripción en siguiente apartado) de la biomasa (**EDMP**): se constituyó de 220 mililitros de inóculo bacteriano, más 35 mililitros de concentrado de microalgas (sustrato) con pretratamiento térmico más 245 mililitros de agua destilada para un volumen total de 500 mL.

Todos los digestores se mantuvieron en agitación constante durante todo el ensayo, utilizando agitadores magnéticos y gas nitrógeno para crear una atmósfera inerte. (burbuja de 60mL aproximadamente). El ensayo se realizó en 35 días, utilizando 3 réplicas en cada ensayo.

- **Pretratamiento térmico de la biomasa**

Se realizó un pretratamiento, empleando 125 mL de biomasa concentrada, se colocó en un matraz de 2L en una autoclave a 120°C durante 90 minutos a 18 psi. La eficiencia del tratamiento térmico se analizó midiendo la demanda química de oxígeno soluble (DQOs) utilizando el método HACH rango alto-bajo (20-1500 mg/L), Las muestras de la biomasa con pretratamiento y sin pretratamiento se centrifugaron a 3500rpm por 5 minutos para cuantificar el aumento en la materia orgánica oxidable disuelta.

- **Ensayo de digestión anaerobia**

Se colocaron 3 muestras en Erlenmeyer en oscuridad, sometidos a agitación constante y temperatura controlada de 35°C ±1, durante 35 días. El volumen fue medido a través del agua desplazada en una probeta, tal como lo muestra la figura 7.

Figura 7. Diagrama del digestor anaerobio y sistema de recolección de gases.



- **Determinación de biodegradabilidad de la biomasa**

Al inicio y final del ensayo se analizó la DQO, tanto a la biomasa, inóculo bacteriano y a la mezcla de biomasa e inóculo de bacterias en el digestor anaerobio. La determinación de este parámetro se realizó utilizando el

espectrofotómetro HACH DR3900 y el Digestor HACH DR200, viales DQO-HACH 20-1500 mg/L-Rango alto bajo, por medio del método colorimétrico por reducción del ion dicromato a ion crómico de color verde. Para este método se toman 2 mL de la muestra y se agregan al vial de reacción, se agita y se colocan en el reactor HACH DR200 por un tiempo de 2 horas a una temperatura de 150 °C, pasado el tiempo reposar hasta temperatura ambiente y medir en el equipo HACH DR3900.

- **Análisis de biogás y fabricación de curva de calibración de metano y dióxido de carbono**

El análisis de biogás se realizó mediante cromatografía de gases utilizando detector de ionización de llama (FID) y helio como gas de arrastre. El CO₂ de las muestras fue convertido en metano y analizado como metano, empleando un metanizador acoplado al cromatógrafo.

Para la curva de calibración de metano y CO₂ se utilizó el sistema descrito en la figura 8 que consiste en una técnica de diluciones seriadas del gas metano y dióxido de carbono con nitrógeno de la siguiente forma:

- 1) Se retira la jeringa del sistema y se abren las llaves **A** y **B**; **C** permanece cerrada en todo momento.
- 2) Se lava el sistema con una corriente de nitrógeno que se hace pasar desde el conducto que se conecta al cromatógrafo y sale por el conducto donde estaba la jeringa.
- 3) Una vez el sistema estaba bien lavado con nitrógeno durante algunos minutos se colocó la jeringa en su lugar, se cerró la llave **B** y luego la **A** para que el bulbo quedara lleno de nitrógeno. Si el medidor de presión detectó presión dentro del bulbo se abrió la llave **A** para igualar la presión interna del bulbo y la externa y se volvió a cerrar.
- 4) La bolsa se relleno con el gas (CH₄ o CO₂ según fue el caso), se abrió la llave **C**, se llenó la jeringa con el gas contenido en la bolsa y se cerró la llave **C**.
- 5) Se abrió la llave **B** y se inyectó en el bulbo el gas contenido en la jeringa, se cerró la llave **B**.

- 6) Se repitió una vez más el paso 4 y 5.
- 7) Se anotó la presión (P1) dentro luego de la segunda inyección de gas en el bulbo.
- 8) Se abrió la llave **A** para que se liberara la presión y se inyectó el gas automáticamente en el cromatógrafo y se cerró inmediatamente se igualó la presión interna y externa del bulbo.
- 9) Una vez se realizó la primera inyección se repitieron los pasos del 4 al 8 pero sustituyendo el gas de la bolsa (metano) por nitrógeno. Esto para diluir con nitrógeno el gas metano de la primera mezcla que se hizo en el bulbo. La presión de cada una de las siguientes diluciones se rotula como P2, P3, P4...
- 10) Las concentraciones del gas para crear la curva se determinaron calculando las fracciones de cada gas con las presiones parciales.

Para calcular las fracciones del gas (CH₄ o CO₂) en la mezcla se utilizaron las siguientes formulas:

Cálculo de fracciones (X):

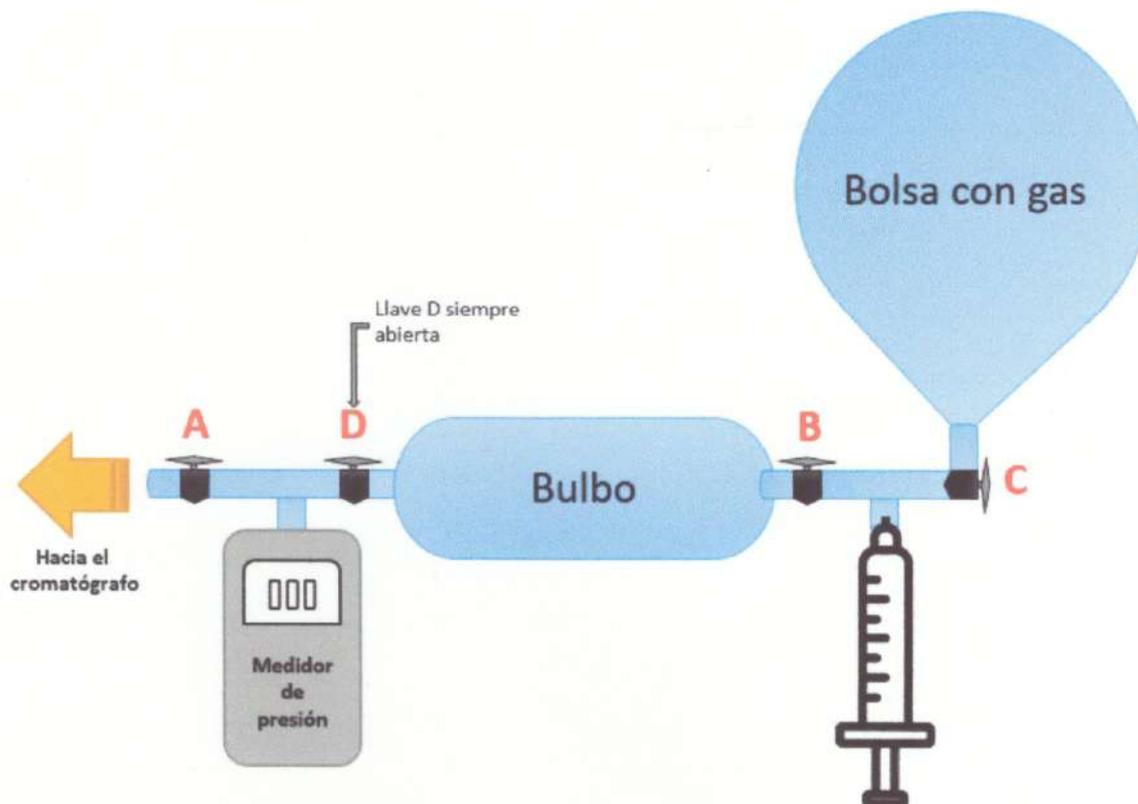
$$X1 = \frac{P1}{P1+PA}; \quad X2 = \frac{P2}{P1+PA} * X1; \quad X3 = \frac{P3}{P3+PA} * X2; \quad X4 = \frac{P4}{P4+PA} * X3; \text{ Etc..}$$

PA= presión atmosférica.

Cálculo del porcentaje de gas (CH₄ o CO₂) en la mezcla

$$Conc (\%) = X * 100$$

Figura 8. Diagrama del sistema para realizar la curva de calibración de gases.



3.6 ANÁLISIS DE BIOMASA (Arredondo y otros, 2017).

- **Sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV)**

El análisis de sólidos totales se realizó por triplicado filtrando 10 mL de biomasa líquida de microalgas, secada a 70°C hasta obtener masa constante. La determinación de sólidos volátiles se realizó calcinando la biomasa seca producto del análisis de sólidos totales a 600°C durante dos horas en una mufla (Thermo Scientific, modelo F6010).

ST= masa de microalga seca y papel filtro – masa de papel filtro

SV= ST – masa de las cenizas.

- **Determinación de proteínas totales en la biomasa de microalga (Arredondo y otros, 2017).**

El análisis de proteínas se realizó por triplicado aplicando el método de Lowry utilizando BSA como patrón (ver anexo 3).

- **Determinación de lípidos totales en la biomasa de microalga (Arredondo y otros, 2017).**

La determinación de lípidos se hizo por método gravimétrico realizando extracciones por triplicado con una mezcla de cloroformo:metanol 1:2 volumen/volumen (ver anexo 4).

- **Determinación de carbohidratos totales en la biomasa de microalga (Arredondo y otros, 2017).**

El análisis de carbohidratos se realizó por triplicados aplicando un método colorimétrico con curva de calibración de glucosa (ver anexo 5)

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentaron como valores medios \pm desviación estándar de la media y las diferencias significativas se evaluaron mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) y prueba de Tuckey. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de p fue inferior a 0,05.

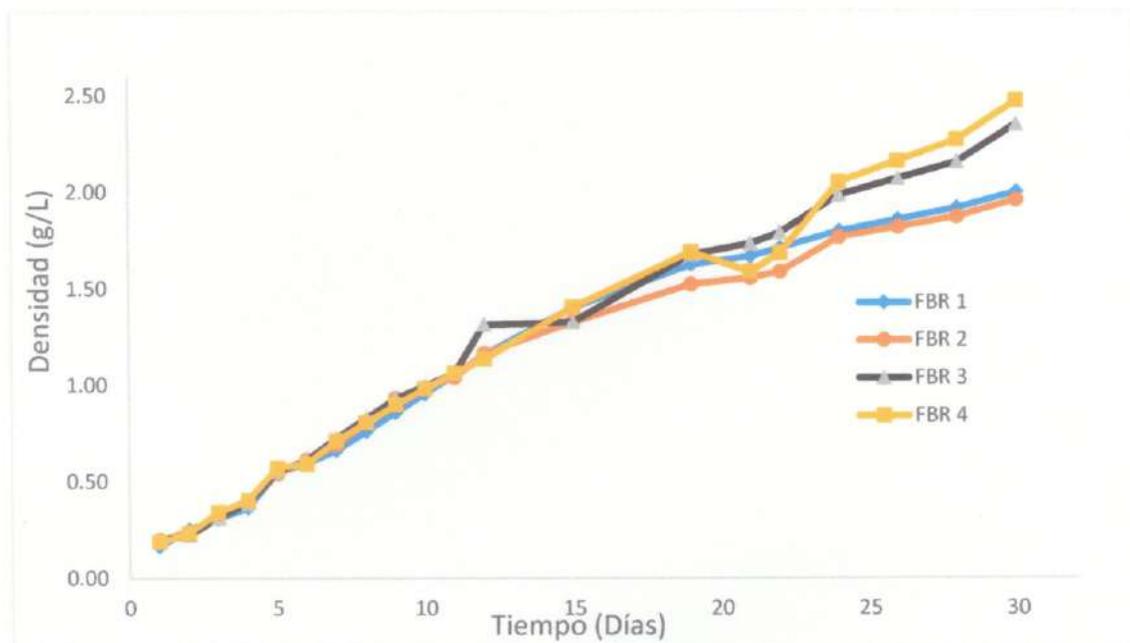
CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CULTIVO DE LA BIOMASA DE MICROALGA

La biomasa fue cultivada en 4 fotobiorreactores (**FBR 1, FBR 2, FBR3 y FBR 4**) de 10 litros utilizando medio de cultivo M8, controlando parámetros fisicoquímicos (pH, OD, TDS, Temperatura e intensidad de luz) durante 30 días. Al finalizar el tiempo la producción máxima de biomasa fue de 2.47g/L de cultivo, que se obtuvo en el **FBR 4** como se observa en el cuadro 5 y obteniendo un promedio de producción de biomasa de 2.19 g/L.

Figura 9. Curva de crecimiento celular en la producción de biomasa de microalgas.



Cuadro 5. Producción de biomasa en los reactores anaerobios.

Reactor	FBR 1	FBR 2	FBR 3	FBR 4	Promedio
Producción de biomasa (g/L)	2.00	1.96	2.35	2.47	2.19

Se presentó una curva de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* que evidencia una rápida adaptación a este medio de cultivo. Para crecer y funcionar, las microalgas requieren tres nutrientes principales: C, N y P. Mohsenpour y otros (2021)

mencionan que la asimilación de estos nutrientes se ve fuertemente afectada por la composición general de nutrientes que están disponibles en el medio de cultivo, muchas veces las tasas de utilización de nutrientes por parte de las microalgas están estrechamente relacionadas con su crecimiento, y un suministro limitado de un nutriente primario puede reducir significativamente su tasa de crecimiento. En este contexto, para garantizar una eficiencia óptima de eliminación de nutrientes del medio de cultivo, debe estar presente una proporción óptima de nutrientes que refleje las necesidades estequiométricas elementales de las microalgas (Li y otros, 2019)

Se utilizó el medio M8 de Mandalam y Palsson (1998) para llevar a cabo el crecimiento del inóculo de *Chlorella sorokiniana*. Debido a la alta demanda de biomasa necesitada se eligió este medio, el cual es un medio que aporta grandes concentraciones de macronutrientes (N y P), micronutrientes (Ca, Mg, B, Cl, S, Zn, Cu, Fe), y otros componentes. Los macronutrientes presentes en este medio son esenciales para un buen desarrollo de *Chlorella sorokiniana*, el nitrógeno juega un papel importante en la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos. En general, la concentración de nitrógeno influye significativamente en el crecimiento de las microalgas y sus composiciones bioquímicas; al mismo tiempo, el agotamiento del nitrógeno en el medio de cultivo provoca una disminución en el crecimiento con aumentos en la productividad de los lípidos. Las microalgas pueden asimilar nitrógeno en la forma de nitrato, nitrito, urea y amonio; sin embargo, el nitrato es ampliamente utilizado para el cultivo de microalgas en comparación con las sales de amonio, ya que es más estable con menos probabilidad de cambio de pH (Yaakob y otros, 2021). Yaakob y otros (2021) también hacen mención que el fósforo es otro compuesto esencial que juega un papel importante en el crecimiento de las algas, producción de lípidos, rendimiento de ácidos grasos y procesos metabólicos como la transferencia de energía y fotosíntesis. El fósforo es un nutriente esencial que constituye un poco menos del 1% de la biomasa total de algas y se requiere aproximadamente 0.03-0.06% en el medio para sostener el crecimiento de algas. El fósforo es esencial para las células de microalgas para la producción de componentes celulares como

fosfolípidos, ADN, ARN y ATP para las rutas metabólicas que implican la transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos. Por su parte los micronutrientes como el Ca, Mg, B, Cl, S, Zn, Cu, Fe presentes en el medio utilizado ayudan a la construcción de la pared celular, pigmentos, ácidos nucleicos y otras proteínas importantes (Kumar y otros, 2014). Gracias a los nutrientes presente en el medio de cultivo utilizado se obtuvo una producción de biomasa de *Chlorella sorokiniana* por **FBR1**: 2.00 g/L, **FBR2**: 1.96 g/L, **FBR3**: 2.35 g/L y **FBR4**: 2.47 g/L. Estos resultados son interesantes y comparables con los resultados presentados por Córdova, Ruiz-Filippi, Feroso y Chamy (2018) donde se obtuvo una producción de biomasa de *Chlorella sorokiniana* por 2.02 g/L en 15 días, cabe destacar que esta biomasa fue utilizada con el mismo fin de nuestro proyecto, el cual fue para la obtención de biogás. Además, el medio utilizado por estos investigadores (medio de cultivo Sueoka) es un medio con concentraciones de nutrientes muy similares al medio M8 de Mandalam y Palsson (1998).

4.2 ANÁLISIS PROXIMALES DE LA BIOMASA PRODUCIDA

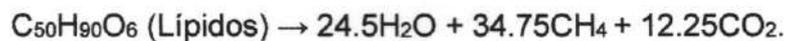
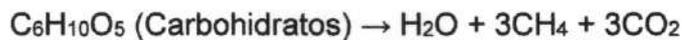
Los análisis proximales a la biomasa almacenada se realizaron anterior al montaje del ensayo de digestión anaerobia. En el cuadro 6 se muestran los valores obtenidos en los análisis de la biomasa.

Cuadro 6. Análisis proximales de la biomasa (húmeda) de microalgas.

Carbohidratos (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)	ST (g/mL)	SV (g/mL)
8.64 ± 0.33	27.41 ± 3.33	46.06 ± 1.14	0.0644 ± 0.0011	0.0620 ± 0.0005

Kannah y otros (2021) mencionan que en la producción biogás de microalgas o de cualquier otra biomasa, los constituyentes bioquímicos de la biomasa son muy importantes, ya que éstos son bioconvertidos a través de reacciones secuenciales debidas al metabolismo llevado a cabo por una variedad de microbios en el digestor. En el primer paso (hidrólisis), se biodegradan los componentes poliméricos (carbohidratos, proteínas y lípidos) de la biomasa de microalgas por un grupo particular de microbios, que producen principalmente el monomérico o

pequeñas cantidades de componentes oligoméricos de las macromoléculas presentes en la biomasa. Eventualmente, los carbohidratos se convierten en glucosa y fructosa, proteínas en aminoácidos y lípidos en ácidos grasos de cadena larga. Bose, O'Shea, Lin, y Murphy (2020) mencionan que la presencia de una amplia gama de carbohidratos (7 a 69%), lípidos (1 a 63%) y proteínas (15 a 84%) hacen a las microalgas un sustrato atractivo para la digestión anaerobia. La biomasa de *Chlorella sorokiniana* obtenida en esta investigación presentó un porcentaje de carbohidratos por 8.64 ± 0.33 , lípidos por 27.41 ± 3.33 y proteínas por 46.06 ± 1.14 , estos resultados son eficientes para la producción de biogás, Zbed y otros (2020) mencionan que tanto los lípidos, carbohidratos y proteínas contribuyen a la producción de biometano. Además, hacen referencia que el rendimiento final de biogás depende en cierta medida de la composición bioquímica y biodegradabilidad de la biomasa, porque existe una relación estequiométrica entre el rendimiento de biogás y los componentes biodegradables de la biomasa, como se muestra en las siguientes ecuaciones



La biomasa de *Chlorella sorokiniana* es prometedora para la producción de biometano, Jankowska, Zieliński, Dębowski y Oleśkiewicz-Popiel (2019) hacen referencia a estudios de Frigon y otros (2013) y Polakovičová y otros (2012) donde se utiliza biomasa de *Chlorella sorokiniana* como sustrato, los mismos presentan producción de biogás por 283 ± 4 CH₄ mL/gSV y 212 CH₄ mL/gSV respectivamente.

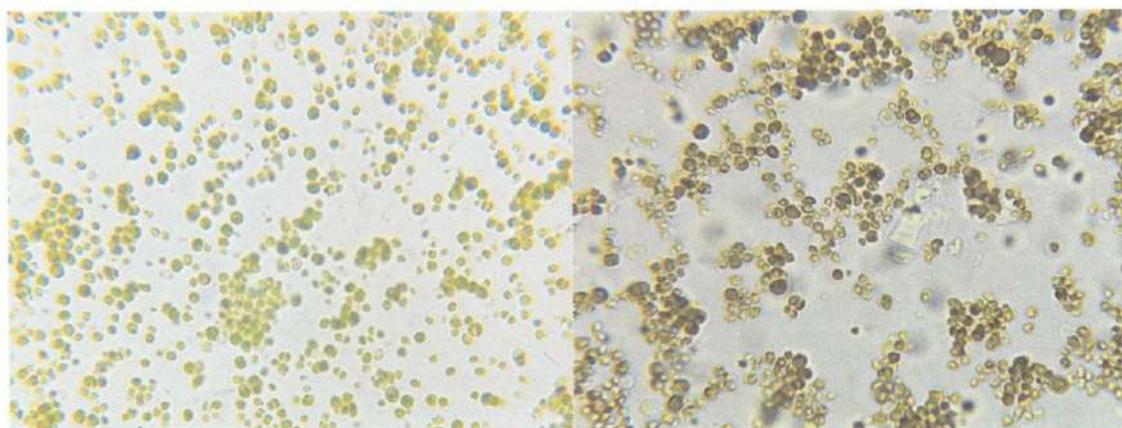
4.3 PRETRATAMIENTO TÉRMICO DE LA BIOMASA

El análisis de DQO es una medida indirecta de la materia orgánica y con los resultados mostrados en el cuadro 7 se observa que aumenta la concentración de compuestos oxidables solubles en la muestra de biomasa pretratada térmicamente, lo que también se evidencia en la figura 10 en donde se puede apreciar células de microalgas destruidas por acción del pretratamiento.

Cuadro 7. Resultados del análisis de DQO a la biomasa de microalgas.

Muestra de biomasa	Demanda química de oxígeno		
	DQO total (g/L)	DQO soluble (g/L)	% DQO soluble
Sin pretratamiento	78.4	7.4	9.44
Con pretratamiento	75.9	12	15.81

Figura 10. Microalgas vistas en el microscopio antes (izquierda) y después (derecha) del pretratamiento térmico.



4.4 CONSUMO DE DQO EN LOS REACTORES ANAEROBIOS

En el cuadro 8 se muestran las concentraciones iniciales y finales de DQO en los reactores, en donde se observa una reducción en el DQO producto de la bioconversión de estos compuestos oxidables a biogás.

Cuadro 8. Cambio en las concentraciones de DQO en los reactores anaerobios.

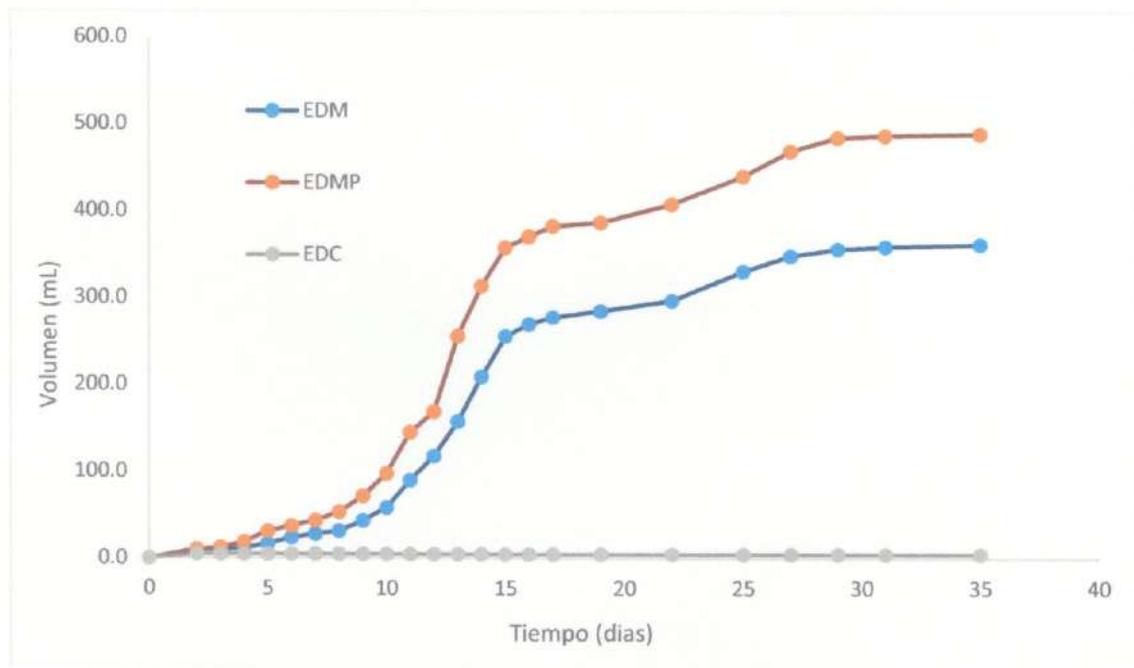
Muestra	DQO g/L		
	Inicial	Final	Consumo
EDM	7.08 ±0.05	6.23 ±0.18	0.85
EDMP	8.13 ±0.02	5.9 ±0.07	2.23
EDC	1.61 ±0.04	1.52 ±0.07	0.09

Gracias las pruebas estadísticas de ANOVA de un factor y prueba de Tuckey se pudo observar que todos los ensayos de digestión (Cuadro 9) presentaron producción en volumen de biogás, pero con diferencias significativas **EDMP>EDM>EDC** ($P<0.05$). La diferencia entre los ensayos EDMP-EDM radica principalmente en el pretratamiento que se le da al sustrato de las microalgas. Nuestra investigación evaluó el efecto de un pretratamiento en la biomasa de *Chlorella sorokiniana* y su impacto en la cantidad de compuestos oxidables liberados del interior de la microalga producto de la ruptura de la pared celular, por lo tanto, favorece el proceso de digestión y la producción de biogás. El análisis de DQO soluble (Cuadro 7) y las imágenes de las células (Figura 10) mostraron dos acciones principales de degradación asociadas al pretratamiento térmico: (1) daño de la pared celular (2) degradación de los constituyentes (biopolímeros) de la pared celular con la liberación de materia orgánica intracelular. Ometto y otros (2014) mencionan que la digestión anaeróbica de las microalgas se inhibe principalmente por la composición química de sus paredes celulares que contienen biopolímeros capaces de resistir la degradación bacteriana. La adopción de tratamientos previos como la hidrólisis térmica, ultrasónica e hidrólisis enzimática tiene el potencial de eliminar estos compuestos inhibidores y mejorar los rendimientos de biogás al degradar la pared celular y liberar la materia orgánica intracelular. El cuadro 8 hace referencia a lo mencionado anteriormente, donde las bacterias en el ensayo **EDMP** utilizan mucha más materia orgánica disponible (DQO) en comparación con el ensayo **EDM**, se puede observar que en el ensayo **EDMP** la concentración de DQO disminuyó de 8.13 ± 0.02 g/L a 5.89 ± 0.07 g/L y en el ensayo **EDM** disminuyó de 7.08 ± 0.05 g/L a 6.23 ± 0.18 g/L. Cabe destacar que las diferencias significativas ($P<0.05$) del ensayo **EDC** con respecto a los ensayos **EDMP** y **EDM** radica principalmente en que este ensayo no cuenta con sustrato de microalgas para que las bacterias puedan realizar la producción de biogás.

4.5 PRODUCCIÓN DE BIOGÁS EN EL ENSAYO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA Y ANÁLISIS QUÍMICO DEL BIOGÁS

En la digestión anaerobia se realizaron tres pruebas por triplicado: Ensayo de digestión de microalgas sin pretratamiento (**EDM**) con una producción máxima de 362 mL, ensayo de digestión de microalgas con pretratamiento (**EDMP**) con una producción máxima de 489 mL y ensayo de digestión control (**EDC**) con una producción máxima de 5 mL. Estos volúmenes son los promedios de las tres réplicas de cada ensayo y fueron medidos a una temperatura de 35°C en un tiempo máximo de 35 días.

Figura 11. Curva de producción de biogás utilizando biomasa de microalgas.



Cuadro 9. Producción de biogás en los reactores anaerobios.

Digestor	EDC	EDM	EDMP
Producción de biogás (mL)	5 ± 0	362 ± 12.5	489 ± 32.9

Cuadro 10. Análisis químico del biogás y evaluación del potencial bioquímico de metano (PBM).

Digestor	V _{max} de biogás (mL)	[CH ₄] (%)	[CO ₂] (%)	[CH ₄] _{Promedio} (%)	PBM (mL _{CH₄} /g SV)
EDM 1	372	35.19	< 1		
EDM 2	366	34.10	< 1	35.5	51.7 ±1
EDM 3	348	37.36	< 1		
EDMP 1	471	44.67	< 1		
EDMP 2	469	49.56	< 1	44.67	87.4 ±5
EDMP 3	527	39.79	< 1		

En las pruebas estadísticas de ANOVA de un factor y la prueba de Tuckey se pudo observar diferencias significativas entre ensayos con respecto a la producción de metano ($P < 0.05$). En el ensayo **EDM** se obtuvo una producción por 52 ± 1 mL_{CH₄}/gSV, en el ensayo **EDMP** se obtuvo una producción por 87 ± 5 mL_{CH₄}/gSV y para el ensayo **EDC** no se obtuvo producción, nuestros resultados pueden ser comparados con los publicados por Córdova y otros (2018) donde obtienen una producción final de metano por 242 mL_{CH₄}/g SV, cabe destacar que estos investigadores utilizaron biomasa de *Chlorella sorokiniana* como sustrato microalgal. Otro estudio comparable es el de Ayala-Parra, Liu, Field y Sierra-Alvarez en 2017 donde se llevó a cabo un pretratamiento de biomasa de *Chlorella sorokiniana* (célula completa, sonicación y extracción de lípidos) con resultados de producción de biogás por 298, 388 y 253 mL_{CH₄}/gSV respectivamente. Dinnebier y otros en 2021 publicaron un estudio donde reemplazan los medios de cultivos convencionales por aguas residuales porcinas para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*, gracias a las aguas residuales obtuvieron una buena producción de biomasa (198 mg ST/Litros días) y producción de biogás por 292 ± 10 mL_{CH₄}/gSV. El estudio llevado a cabo por Hamidian y Zamani (2021) utilizó aguas residuales de productos lácteos sin tratar para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*, los resultados son llamativos al momento de sustituir los medios de cultivos por las aguas residuales, Hamidian y Zamani (2021) obtuvieron resultados de producción de biometano por 353 y 644

mLCH₄/gVS. Las aguas residuales están tomando fuerza en este tipo de estudios debido a su gran contenido de nutriente (Amonio, nitratos, fosfatos, materia orgánica, etc.) que favorecen el crecimiento algal y por consiguiente la producción de compuestos de interés (proteínas, lípidos, carbohidratos) que son favorable a la hora de producción de un biocombustible (Chen, Zhao y Qi, 2015). El biogás de microalgas es producto de la digestión de los componentes bioquímicos de la biomasa, que son degradados en reacciones secuenciales por el metabolismo de una variedad de microbios en el digestor; el inóculo de estos microbios utilizados en esta investigación fue procedente de estiércol vacuno fresco. Según Rastogi y otros 2008, en un estudio de secuenciación molecular de la diversidad de microbios metanogénicos en el estiércol de ganado fresco y seco, llegaron a la conclusión que en el estiércol fresco predominan bacterias de la familia *Methanomicrobiales* entre las que predominaban las del género *Methanocorpusculum*. Estas son bacterias que utilizan H₂ y alcoholes secundarios como donantes de electrones, tienen rápida adaptación y trabajan a temperatura mesófila (Simankova y otros, 2003).

CAPITULO 5

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✓ El medio de cultivo M8 utilizado para el crecimiento de las microalgas tiene los nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de la *microalga Chlorella sorokiniana*, por consiguiente, se observó una biomasa rica en carbohidratos, lípidos y proteínas.
- ✓ Las bacterias metanogénicas presentes en el estiércol vacuno presentaron una buena adaptación al sustrato de microalgas, permitiendo la producción de biogás.
- ✓ La aplicación del pretratamiento térmico a la biomasa de microalgas favoreció la producción de biogás, con respecto al tratamiento no tratado térmicamente
- ✓ El pretratamiento térmico de la biomasa no aumentó en gran medida la concentración de compuestos oxidables solubles (DQOs) en la biomasa de microalgas, sin embargo, provocó el debilitamiento de la membrana celular de la microalga y la muerte de las células, favoreciendo la producción de biogás.
- ✓ La concentración de metano en el biogás fue relativamente baja, esto pudo ser causado por la dificultad de extracción y almacenaje del biogás sin que surjan contaminaciones con aire.
- ✓ Se recomienda sustituir el medio de cultivo sintético para producir la biomasa de microalgas por aguas residuales, ya que esta microalga en otros estudios presenta resultados prometedores de crecimiento y depuración en estas aguas de desecho.
- ✓ Otra recomendación sería la utilización de microalgas nativas de la zona, por ejemplo las que crecen de manera natural en las tinajas de oxidación de aguas residuales de la localidad.

5.1 Bibliografía citada

- Abbasi, T., Tauseef, S. M., & Abbasi, S. A. (2012). A brief history of anaerobic digestion and "biogas". In *Biogas energy* (pp. 11-23). Springer, New York, NY.
- Arashiro, L. T., Ferrer, I., Pániker, C. C., Gómez-Pinchetti, J. L., Rousseau, D. P., Van Hulle, S. W., & Garfi, M. (2020). Natural pigments and biogas recovery from microalgae grown in wastewater. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 8(29), 10691-10701.
- Atabani, A. E., Ali, I., Naqvi, S. R., Badruddin, I. A., Aslam, M., Mahmoud, E., & Khan, T. Y. (2022). A state-of-the-art review on spent coffee ground (SCG) pyrolysis for future biorefinery. *Chemosphere*, 286, 131730.
- Awe, O. W., Zhao, Y., Nzihou, A., Minh, D. P., & Lyczko, N. (2017). A review of biogas utilisation, purification and upgrading technologies. *Waste and Biomass Valorization*, 8(2), 267-283
- Ayala-Parra, P., Liu, Y., Field, J. A., y Sierra-Alvarez, R. (2017). Nutrient recovery and biogas generation from the anaerobic digestion of waste biomass from algal biofuel production. *Renewable Energy*, 108, 410-416.
- Balza, L. H., Espinasa, R., & Serebrisky, T. (2016). Lights on: energy needs in latin america and the caribbean to 2040. Inter-American Development Bank, 1-39.
- Baroi, C., Mahto, S., Niu, C., & Dalai, A. K. (2014). Biofuel production from green seed canola oil using zeolites. *Applied Catalysis A: General*, 469, 18-32.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.
- Benemann JR (2007) "Biofuel, peak oil, and global warming 1977– 2037" Presentation at California Polytechnic State University, San Luis Obispo, 1–18-07
- Bharathiraja, B., Yogendran, D., Ranjith Kumar, R., Chakravarthy, M., & Palani, S. (2014). Biofuels from sewage sludge-A review. *International Journal of ChemTech Research*, 6(9), 4417-4427.
- Bohutskiy, P., Klígerman, D. C., Byers, N., Nasr, L. K., Cua, C., Chow, S., ... & Bouwer, E. J. (2016). Effects of inoculum size, light intensity, and dose of anaerobic digestion centrate on growth and productivity of *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae and their poly-culture in primary and secondary wastewater. *Algal research*, 19, 278-290.
- Borowitzka MA, (1988) Vitamins and fine chemicals from micro-algae. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1988. p. 153–96.
- Bose, A., O'Shea, R., Lin, R., y Murphy, J. D. (2020). A perspective on novel cascading algal biomethane biorefinery systems. *Bioresource Technology*, 304, 123027.
- Braun, R. (2007). Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. In *Improvement of crop plants for industrial end uses* (pp. 335-416). Springer, Dordrecht.
- Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae (2010) – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energy Rev*;14(2):557–77.
- Bumbak F, Cook S, Zachleder V, Hauser S, Kovar K. (2011) Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal process: achievements, potential and possible limitations. *Appl Microbiol Biotechnol*;91:31–46.
- Capson-Tojo, G., Torres, A., Muñoz, R., Bartacek, J., & Jeison, D. (2017). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of lipid-extracted microalgae *N. gaditana* for methane production. *Renewable Energy*, 105, 539-546.
- Cárdenas-Cleves, L. M., Parra-Orobio, B. A., Torres-Lozada, P., & Vásquez-Franco, C. H. (2016). Perspectives of biochemical methane potential-BMP test for control the anaerobic digestion process of wastes. *Revista Ion*, 29(1), 95-108.
- CEPAL, N. (2020). Informe nacional de monitoreo de la eficiencia energética de Panamá, 2020.
- Chader, S., Mahmah, B., Chetehouna, K., & Mignolet, E. (2011). Biodiesel production using *Chlorella sorokiniana* a green microalga. *Journal of Renewable Energies*, 14(1), 21-26.
- Chandrasekhar, K., Raj, T., Ramanaiah, S. V., Kumar, G., Banu, J. R., Varjani, S., & Kim, S. H. (2021). Algae biorefinery: a promising approach to promote microalgae industry and waste utilization. *Journal of Biotechnology*.c
- Chen, A., Arias, J., & Deago, E. (2021, June). Digestividad anaeróbica en reactores batch de lodos orgánicos de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Juan Díaz. In *Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología-APANAC* (pp. 484-491).

- Chen, G., Zhao, L., y Qi, Y. (2015). Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: a critical review. *Applied Energy*, 137, 282-291.
- Cheng, P., Li, Y., Wang, C., Guo, J., Zhou, C., Zhang, R., & Ruan, R. (2022). Integrated marine microalgae biorefineries for improved bioactive compounds: A review. *Science of The Total Environment*, 152895.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy conversion and management*, 51(7), 1412-1421.
- Cherubini, F., Jungmeier, G., Mandl, M., Philips, C., Wellisch, M., Jrgensen, H., & Walsh, P. (2007). IEA bioenergy Task 42 on biorefineries: co-production of fuels, chemicals, power and materials from biomass. In IEA bioenergy task (pp. 1-37). Copenhagen, Denmark: IEA Bioenergy.
- Chew, T. L., & Bhatia, S. (2008). Catalytic processes towards the production of biofuels in a palm oil and oil palm biomass-based biorefinery. *Bioresource technology*, 99(17), 7911-7922
- Collet P., et al., (2010) Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production, *Bioresour. Technol.* 102 207–214.
- Córdova, O., Passos, F., y Chamy, R. (2019). Enzymatic pretreatment of microalgae: cell wall disruption, biomass solubilisation and methane yield increase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 189(3), 787-797.
- Córdova, O., Ruiz-Filippi, G., Feroso, F. G., y Chamy, R. (2018). Influence of growth kinetics of microalgal cultures on biogas production. *Renewable Energy*, 122, 455-459.
- Costa JA, de Morais MG. (2011) The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresour Technol*;102(1):2-9.
- De Schampelaire, L., y Verstraete, W. (2009). Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system. *Biotechnology and bioengineering*, 103(2), 296-304.
- Demirbas A. (2009) Production of biodiesel from algae oils. *Energy Source Part A*;31:163–8.
- Demirbas, A., & Demirbas, M. F. (2010). *Algae energy: algae as a new source of biodiesel*. Springer Science & Business Media.
- Dinnebier, H. C. F., Matthiensen, A., Michelon, W., Tápparo, D. C., Fonseca, T. G., Favretto, R., ... y Kunz, A. (2021). Phycoremediation and biomass production from high strength swine wastewater for biogas generation improvement: An integrated bioprocess. *Bioresource Technology*, 332, 125111.
- Elser, J. J., Fagan, W. F., Denno, R. F., Dobberfuhl, D. R., Folarin, A., Huberty, A., ... & Sterner, R. W. (2000). Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature*, 408(6812), 578-580.
- Feroso, F. G., Beltran, C., Jimenez, A., Fernández, M. J., Rincón, B., Borja, R., y Jeison, D. (2016). Screening of biomethane production potential from dominant microalgae. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 51(12), 1062-1067.
- Freitas, J. V., Bilatto, S., Squinca, P., Pinto, A. S., Brondi, M. G., Bondancia, T. J., & Farinas, C. S. (2021). Sugarcane biorefineries: potential opportunities towards shifting from wastes to products. *Industrial Crops and Products*, 172, 114057.
- Frigon, J. C., Matteau-Lebrun, F., Abdou, R. H., McGinn, P. J., O'Leary, S. J., y Guiot, S. R. (2013). Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Applied energy*, 108, 100-107.
- Gandam, P. K., Chinta, M. L., Prashanth, N. P., Velidandi, A., Sharma, M., Kuhad, R. C., & Gupta, V. K. (2022). Corncob based biorefinery: A comprehensive review of pretreatment methodologies, and biorefinery platforms. *Journal of the Energy Institute*.
- Garcia-Casal MN, Ramirez J, Leets I, Pereira AC, Quiroga MF. (2009) Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva* sp, *Sargassum* sp and *Porphyra* sp) in human subjects. *Br J Nutr*;101:79–85.
- Golueke, C. G., & Oswald, W. J. (1959). Biological conversion of light energy to the chemical energy of methane. *Applied microbiology*, 7(4), 219-227.
- Golueke, C. G., Oswald, W. J., & Gotaas, H. B. (1957). Anaerobic digestion of algae. *Applied microbiology*, 5(1), 47-55.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J. P. (2012). Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass and bioenergy*, 40, 105-111.

- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., y Steyer, J. P. (2012). Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(2), 205-218.
- Haag, A. L. (2007). Algae bloom again. *Nature*, 447.
- Hackenberg, Norbert. (2008). Biocombustibles de segunda generación. *Revista Virtual REDESMA*, 2, 49.
- Hamidian, N., y Zamani, H. (2021). Potential of *Chlorella sorokiniana* Cultivated in Dairy Wastewater for Bioenergy and Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1-12.
- Hamidian, N., y Zamani, H. (2021). Potential of *Chlorella sorokiniana* Cultivated in Dairy Wastewater for Bioenergy and Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1-12.
- Hanelt, D., Bischof, K. and Dunton, K. (2007) life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 6:95-126
- Harper, L. A., Flesch, T. K., Weaver, K. H., & Wilson, J. D. (2010). The effect of biofuel production on swine farm methane and ammonia emissions. *Journal of Environmental Quality*, 39(6), 1984-1992.
- Heaton, E. A., Dohleman, F. G., & Long, S. P. (2008). Meeting US biofuel goals with less land: the potential of *Miscanthus*. *Global change biology*, 14(9), 2000-2014.
- Hernández, E. S., y Córdoba, L. T. (1993). Anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* for energy production. *Resources, conservation and recycling*, 9(1-2), 127-132.
- Inglesby, A. E., & Fisher, A. C. (2012). Enhanced methane yields from anaerobic digestion of *Arthrospira maxima* biomass in an advanced flow-through reactor with an integrated recirculation loop microbial fuel cell. *Energy & Environmental Science*, 5(7), 7996-8006.
- Jankowska, E., Zieliński, M., Dębowski, M., & Oleśkiewicz-Popiel, P. (2019). Anaerobic digestion of microalgae for biomethane production. In *Second and Third Generation of Feedstocks* (pp. 405-436). Elsevier.
- Javed, F., Aslam, M., Rashid, N., Shamair, Z., Khan, A. L., Yasin, M., & Bazmi, A. A. (2019). Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: a pathway towards sustainable biorefinery. *Fuel*, 255, 115826.
- Kannah, RY, Kavitha, S., Karthikeyan, OP, Rene, ER, Kumar, G. y Banu, JR (2021). Una revisión sobre la digestión anaeróbica de la energía y el pretratamiento rentable de microalgas para la producción de biogás. *Tecnología de biorecursos*, 332, 125055.
- Karmee, S. K. (2016). Liquid biofuels from food waste: current trends, prospect and limitation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, 945-953.
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., y Das, D. (2014). Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource technology*, 167, 358-366.
- Kumar, K., Ghosh, S., Angelidaki, I., Holdt, S. L., Karakashev, D. B., Morales, M. A., & Das, D. (2016). Recent developments on biofuels production from microalgae and macroalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 235-249.
- Kwietniewska, E., & Tys, J. (2014). Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 491-500.
- Kythreotou, N., Florides, G., & Tassou, S. A. (2014). A review of simple to scientific models for anaerobic digestion. *Renewable Energy*, 71, 701-714.
- Le, T. M., Tran, U. P., Duong, Y. H., Nguyen, K. T., Tran, V. T., & Le, P. K. (2022). Development of a paddy-based biorefinery approach toward improvement of biomass utilization for more bioproducts. *Chemosphere*, 289, 133249.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2013). High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Bioresource technology*, 131, 60-67.
- Li, D., Amoah, P. K., Chen, B., Xue, C., Hu, X., Gao, K., y Deng, X. (2019). Feasibility of growing *Chlorella sorokiniana* on cooking cocoon wastewater for biomass production and nutrient removal. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(3), 663-676. 63.
- Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., y Chen, P. (2019). Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*, 291, 121934. 64.

- Li, S., Zhao, S., Yan, S., Qiu, Y., Song, C., Li, Y., y Kitamura, Y. (2019). Food processing wastewater purification by microalgae cultivation associated with high value-added compounds production—A review. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 27(12), 2845-2856.
- Liu, J., Huang, J., Fan, K. W., Jiang, Y., Zhong, Y., Sun, Z., & Chen, F. (2010). Production potential of *Chlorella zofingienesis* as a feedstock for biodiesel. *Bioresource technology*, 101(22), 8658-8663.
- Mahlknecht, J., González-Bravo, R., & Loge, F. J. (2020). Water-energy-food security: A Nexus perspective of the current situation in Latin America and the Caribbean. *Energy*, 194, 116824.
- Malani, R. S., Choudhury, H. A., & Moholkar, V. S. (2020). Waste biorefinery based on waste carbon sources: case study of biodiesel production using carbon based catalysts and mixed feedstocks of nonedible and waste oils. *Waste Biorefinery*, 337-378.
- Manhongo, T. T., Chimphango, A. F. A., Thornley, P., & Röder, M. (2021). Current status and opportunities for fruit processing waste biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 111823.
- Mata-Alvarez J, Mace´ S and Llabre´ s P (2000) Anaerobic Digestion of solid organic wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology* 74: 3–16.
- McKendry P. (2002) Energy production form biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour Technol*;83(1):37–46.
- McLaughlin, S. B. (1992). New switchgrass biofuels research program for the southeast (No. CONF-9211101-10). Oak Ridge National Lab., TN (United States).
- Mi Ambiente. (2021, 28 septiembre). Producción porcina, cada vez más limpia en Azuero. Ministerio de ambiente. Recuperado 28 de febrero de 2022, de <https://www.miambiente.gob.pa/produccion-porcina-cada-vez-mas-limpia-en-azuero/>
- Miao X, Wu Q. (2004) High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J Biotechnol*;110(1):85–93.
- Milledge, J.J. (2011). Commercial Application of Microalgae Other than as Biofuels: A Brief Review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10: 31–41.
- Møller, H. B., Sommer, S. G., & Ahring, B. K. (2004). Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and bioenergy*, 26(5), 485-495.
- Mussgnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of biotechnology*, 150(1), 51-56.
- Nitiéma-Yefanova, S., Tschamber, V., Richard, R., Thiebaud-Roux, S., Bouyssiére, B., Bonzi-Coulibaly, Y. L., & Coniglio, L. (2017). Ethyl biodiesels derived from non-edible oils within the biorefinery concept—Pilot scale production & engine emissions. *Renewable energy*, 109, 634-645.
- Ojeda, K., Ávila, O., Suárez, J., & Kafarov, V. (2011). Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production—Part 1. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(3), 270-279.
- Ometto, F., Quiroga, G., Pšenička, P., Whitton, R., Jefferson, B., & Villa, R. (2014). Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. *Water research*, 65, 350-361.
- Oswald WJ (2003) My sixty years in applied algology. *J Appl Phycol* 15:99–106
- Patzek, T. W. (2004). Thermodynamics of the corn-ethanol biofuel cycle. *Critical Reviews in plant sciences*, 23(6), 519-567.
- Peng, L., Fu, D., Chu, H., Wang, Z., & Qi, H. (2020). Biofuel production from microalgae: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(2), 285-297.
- Pessôa, L. C., Deamici, K. M., Pontes, L. A. M., Druzian, J. I., & de Jesus Assis, D. (2021). Technological prospection of microalgae-based biorefinery approach for effluent treatment. *Algal Research*, 60, 102504.
- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., & Simões, M. (2012). Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and sustainable energy reviews*, 16(5), 3043-3053.
- Pittman JK, Dean AP, Osundeko O. (2011) The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour Technol*;102:17–25.

- Polakovičová, G., Kušník, P., Nagyová, S., & Mikulec, J. (2012). Process integration of algae production and anaerobic digestion. In 15th international conference on process integration, modelling and (Vol. 29).
- Qureshi, N., Saha, B. C., Cotta, M. A., & Singh, V. (2013). An economic evaluation of biological conversion of wheat straw to butanol: a biofuel. *Energy Conversion and Management*, 65, 456-462.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Dien, B., Hughes, S., Liu, S., ... & Cotta, M. A. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II—Use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass and bioenergy*, 34(4), 566-571.
- Ragauskas, A. J., Nagy, M., Kim, D. H., Eckert, C. A., Hallett, J. P., & Liotta, C. L. (2006). From wood to fuels: integrating biofuels and pulp production. *Industrial biotechnology*, 2(1), 55-65.
- Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I., & Bux, F. (2014). The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresource technology*, 168, 127-135.
- Ramírez, E. F., & Isaza Alvarado, W. S. (2019). Diseño conceptual de un sistema para la generación de energía eléctrica a partir de aguas residuales domésticas vía digestión anaerobia en la Finca Loma La Tranca en Distrito de Pedasí, Panamá.
- Ramírez, M., Deago, E., & Tejedor, N. F. (2020). Digestividad anaeróbica de biosólidos de aguas residuales usando el sistema Oxitop para estimar la producción de biogás. *Revista de I+ D Tecnológico*, 16(2).
- Rastogi, G., Ranade, D. R., Yeole, T. Y., Gupta, A. K., Patole, M. S., & Shouche, Y. S. (2008). Molecular analyses of methanogen diversity associated with cattle dung. *World journal of microbiology and Biotechnology*, 24(12), 2973-2979.
- Razzak, S.A., Hossain, M.M., Lucky, R.A. and Bassi, A.S. (2013). Integrated CO2 Capture, Wastewater Treatment and Biofuel Production by Microalgae Culturing-A Review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 27: 622– 653.
- Requena, J. S., Guimaraes, A. C., Alpera, S. Q., Gangas, E. R., Hernandez-Navarro, S., Gracia, L. N., ... & Cuesta, H. F. (2011). Life Cycle Assessment (LCA) of the biofuel production process from sunflower oil, rapeseed oil and soybean oil. *Fuel Processing Technology*, 92(2), 190-199.
- Ruan, R., Zhang, Y., Chen, P., Liu, S., Fan, L., Zhou, N., ... & Li, B. (2019). Biofuels: introduction. In *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels* (pp. 3-43). Academic Press.
- Russo, V. M., & Webber III, C. L. (2012). Peanut pod, seed, and oil yield for biofuel following conventional and organic production systems. *Industrial crops and products*, 39, 113-119.
- Sampeiro, J. I., & Jiménez, A. M. (2010). Bioenergía. *Revista Ciencia*, 1-10.
- Samson, R., & LeDuy, A. (1983). Improved performance of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass by addition of carbon-rich wastes. *Biotechnology letters*, 5(10), 677-682.
- Scarlatt, N., Dallemand, J. F., & Fahl, F. (2018). Biogas: Developments and perspectives in Europe. *Renewable energy*, 129, 457-472.
- Sharma, A., Singh, G., & Arya, S. K. (2020). Biofuel from rice straw. *Journal of Cleaner Production*, 277, 124101.
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann JR, Roessler P (1998) A look back at the US Department of Energy's aquatic species program- Biodiesel from algae. The renewable energy laboratory, Golden, CO. Prepared for: Office of Fuels Development, US Department of Energy
- Shi, A. Z., Koh, L. P., & Tan, H. T. (2009). The biofuel potential of municipal solid waste. *Gcb Bioenergy*, 1(5), 317-320.
- Siddiki, S. Y. A., Mofijur, M., Kumar, P. S., Ahmed, S. F., Inayat, A., Kusumo, F., ... & Mahlia, T. M. I. (2022). Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. *Fuel*, 307, 121782.
- Simankova, M. V., Kotsyurbenko, O. R., Lueders, T., Nozhevnikova, A. N., Wagner, B., Conrad, R., & Friedrich, M. W. (2003). Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(2), 312-318
- Singh, A., Pant, D., Olsen, S.I. and Nigam, P.S. (2012). Key Issues to Consider in Microalgae Based Biodiesel Production. *Energy Educ. Sci. Technol. Part A* 29: 687– 700.
- Slewinski, T. L. (2012). Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production. *Journal of Experimental Botany*, 63(13), 4647-4670.

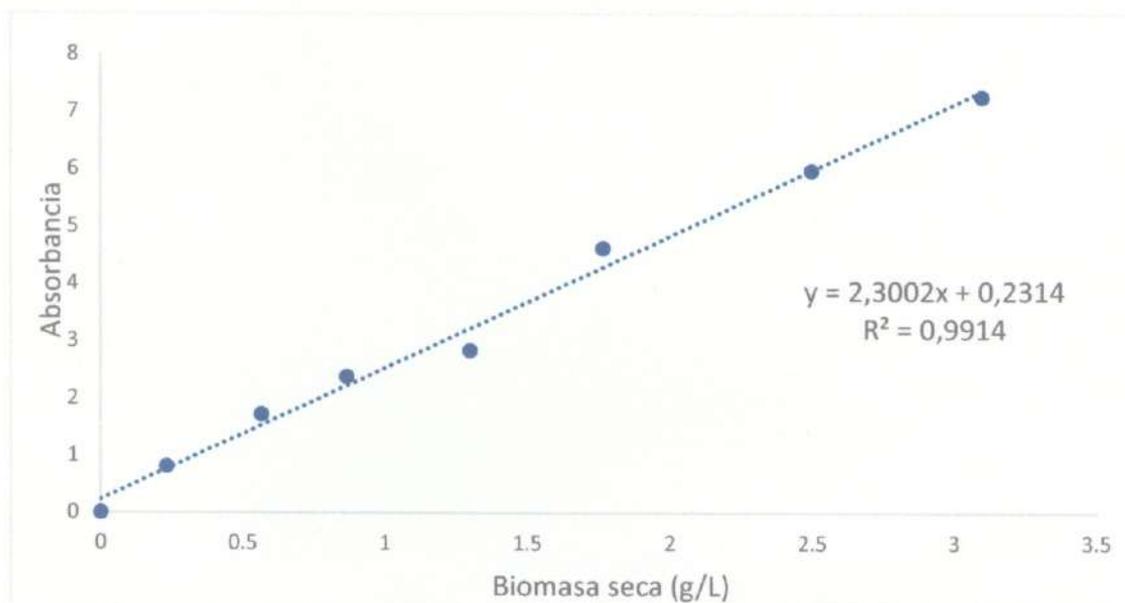
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 87–96.
- Stamenković, O. S., Siliveru, K., Veljković, V. B., Banković-Ilić, I. B., Tasić, M. B., Ciampitti, I. A., ... & Prasad, P. V. (2020). Production of biofuels from sorghum. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 124, 109769.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H. H., & Renganathan, S. (2016). Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 909-941.
- Sukias J, Craggs R.(2007) Enhanced methane yields from microalgal digestion with various pre-treatments. 7th IWA specialist conference on waste stabilization ponds. Bangkok, Thailand:.
- Suryanto, A. (2015). The production of biofuels from coconut oil using microwave. *Modern Applied Science*, 9(7), 93-98.
- Sydney, E.B., Sturm, W., de Carvalho, J.C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A. and Soccol, C.R. (2010). Potential Carbon Dioxide Fixation by Industrially Important Microalgae. *Bioresour. Technol.* 101: 5892–5896.
- Takeda, H. (1996). Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry*, 42(3), 673-675.
- U.S. Energy Information (2021). INTERNATIONAL ENERGY OUTLOOK 2021. Administration. Recuperado 2 de febrero de 2022, de <https://www.eia.gov/outlooks/ieo/>
- Uggetti, E., García, J., Álvarez, J. A., & García-Galán, M. J. (2018). Start-up of a microalgae-based treatment system within the biorefinery concept: from wastewater to bioproducts. *Water Science and Technology*, 78(1), 114-124.
- Um, B.H. and Kim, Y.S. (2009). Review: A Chance for Korea to Advance Algal-biodiesel Technology. *J. Ind. Eng. Chem.* 15: 1–7.
- Van Lier JB and Lubberding H (2002) *Anaerobic Digestion*. Antwerp, Belgium: IWA Publishing. 385 p.
- Vandenbroucke, M., & Largeau, C. (2007). Kerogen origin, evolution and structure. *Organic Geochemistry*, 38(5), 719-833.
- Vergara-Fernández, A., Vargas, G., Alarcón, N., & Velasco, A. (2008). Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 338-344.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(5), 707-718.
- Ward, A. J., Lewis, D. M., & Green, F. B. (2014). Anaerobic digestion of algae biomass: a review. *Algal Research*, 5, 204-214.
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Ravishankar, G. A., y Ambati, R. R. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: an overview. *Cells*, 10(2), 393.
- Zabed, H. M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Zhang, Y., & Qi, X. (2020). Biogas from microalgae: Technologies, challenges and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 109503.
- Zabed, HM, Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Zhang, Y. y Qi, X. (2020). Biogás a partir de microalgas: Tecnologías, desafíos y oportunidades. *Revisiones de energía renovable y sostenible* , 117 , 109503.
- Zhang, Y., Ghaly, A. E. & Li, B. (2012). Availability and Physical Properties of Residues from Major Agricultural Crops for Energy Conversion Through Thermochemical Processes. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 7(3), 312-321
- Zhang, Y., Ghaly, A. E. & Li, B. (2013). Determination of the Exergy of Four Wheat Straws. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 9(3), 338-347.
- Zhang, Y., Wang, Q., Li, B., Li, H., & Zhao, W. (2018). Is there a general relationship between the exergy and HHV for rice residues?. *Renewable Energy*, 117, 37-45.
- Zhang, Y., Yu, X., Li, B., Zhang, H., Liang, J., & Li, Y. (2016). Exergy characteristics of woody biomass. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 38(16), 2438-2446.
- Zhao, B., Ma, J., Zhao, Q., Laurens, L., Jarvis, E., Chen, S., & Frear, C. (2014). Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. *Bioresource technology*, 161, 423-430.

ANEXOS

1) CURVA DE CALIBRACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR

En la realización de la curva de calibración se tomó una alícuota del cultivo concentrado y se realizaron diluciones (10, 20, 30, 40, 60, 80 y 100%) a las que se le analizó masa seca y la absorbancia para la construcción de la curva de calibración.

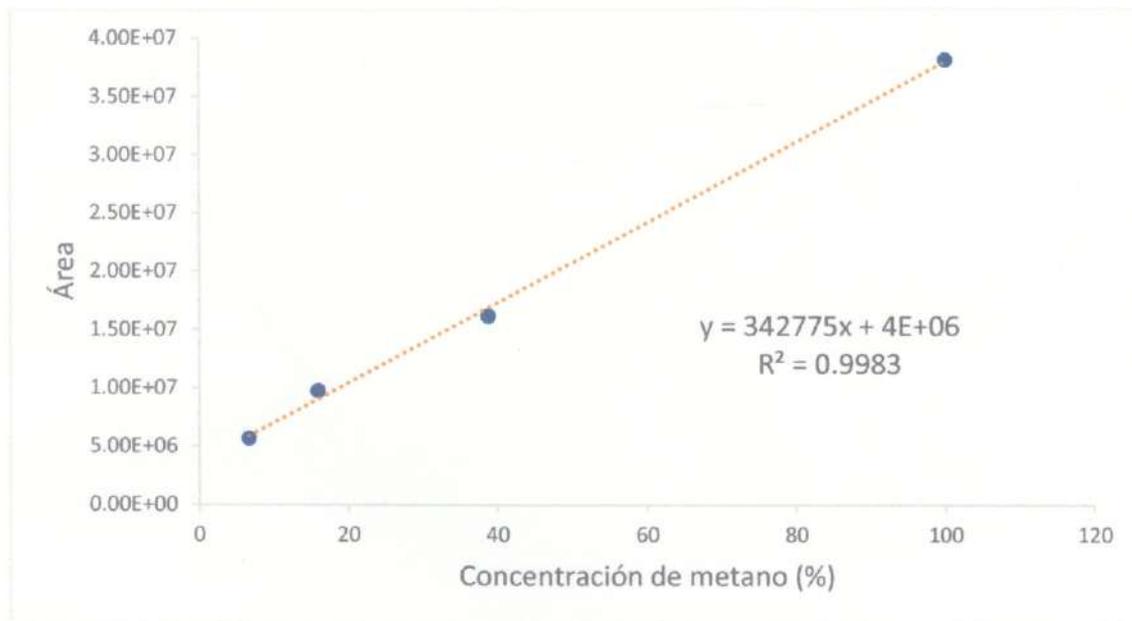
Figura 12. Curva de calibración utilizada para la determinar el crecimiento celular de la microalga.



2) CURVA DE CALIBRACIÓN DE METANO (CH₄) y DIOXIDO DE CARBONO (CO₂)

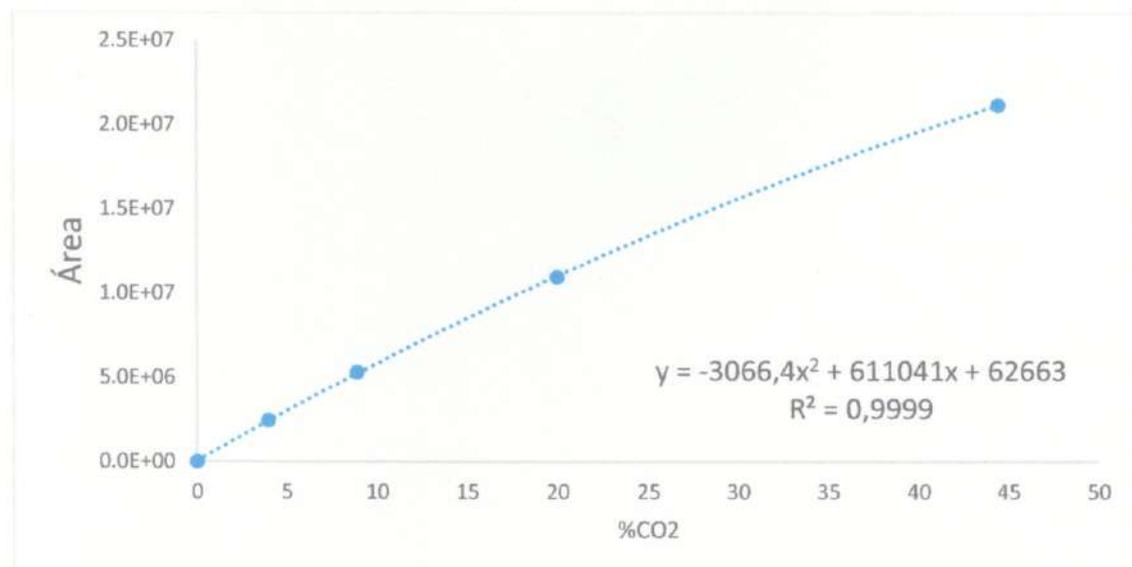
La curva de calibración de metano fue realizada por el método de dilución con nitrógeno utilizando un sistema como el plasmado en la figura 8, las concentraciones de los puntos de la curva son 100%, 41.6%, 17.2%, 7.1% y 2.9% de metano.

Figura 13. Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de metano en las muestras de biogás.



La curva de calibración de dióxido de carbono se realizó con el método de dilución con nitrógeno utilizando el sistema de la figura 8, en la construcción de la gráfica se utiliza una función cuadrática. Las concentraciones porcentuales de CO_2 utilizadas para la construcción son 44.4%, 19.9%, 8,9%, 3,9% y 0%.

Figura 14. Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de dióxido de carbono en las muestras de biogás.

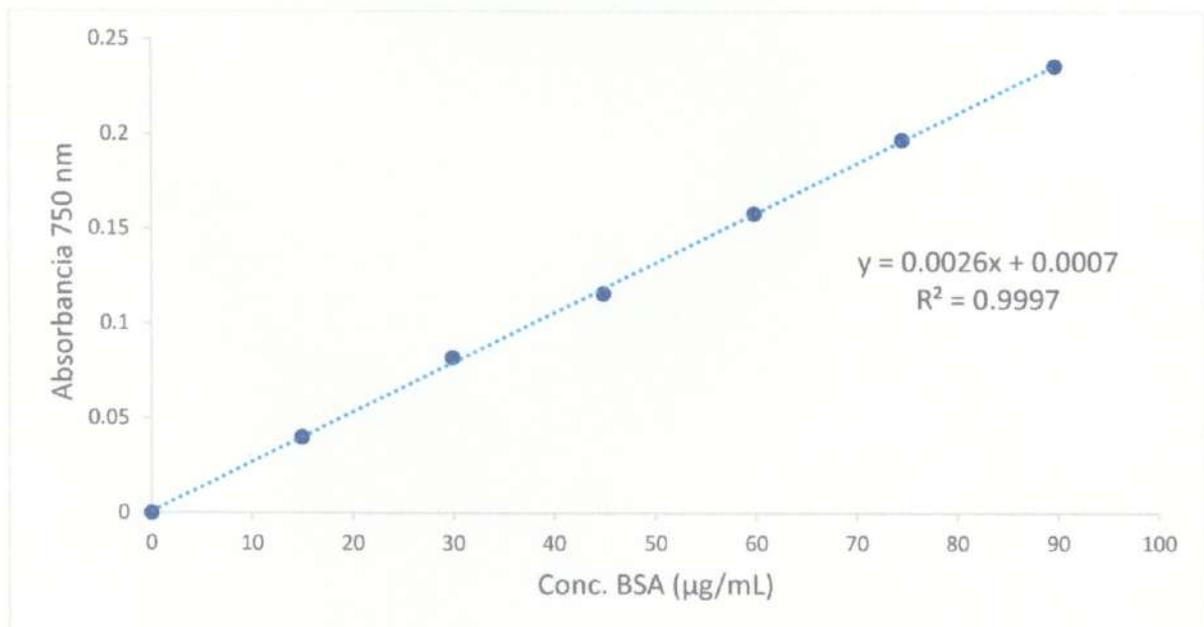


3) PROTOCOLO PARA ANÁLISIS DE PROTEÍNAS TOTALES

Se colocaron 3 mL de cultivo fresco de la microalga en tubos de centrifuga, se centrifugó a 4000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Los tubos con la biomasa húmeda se les adicionaron aproximadamente 2 mL de NaOH 1N, se sonicaron y se colocaron en un baño térmico a una temperatura entre 95 y 100 °C por 1 hora. Posteriormente se centrifugó la mezcla y se colocó una alícuota de ésta en un nuevo tubo de vidrio junto con porciones de NaOH 1N y agua. A esta mezcla se le adicionó el reactivo 3 (solución de Cu-tartrato saturada), se mezcló y se dejó reaccionar por 10 min. Seguidamente se adicionó el reactivo 4 (Folin-Ciocalteu diluido), se mezcló y se dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se leyó a 750 nm y se correlacionó con una curva de calibración con el estándar de BSA para determinar el contenido de proteínas.

Curva de calibración realizada:

Figura 15. Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de proteínas en la biomasa de microalgas.



4) PROTOCOLO PARA ANÁLISIS DE LÍPIDOS.

Nota: es importante mantener tubo con rosa a peso constante para el análisis de lípidos, esta condición es importante para el cálculo final.

- a) Pesar entre 5 y 50 mg de microalgas liofilizada en un tubo de vidrio de 15 mL (tubo 1). Si es muestra fresca debe determinarse la proporción de humedad para referir los resultados a peso seco.
- b) Adicionar 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo: metanol (1:2) sin agua, método de Bligh y Dyer, (1959) modificado para microalgas.
- c) Sonicar por 15 minutos (3 ciclos) en frío en un baño de agua con hielo.
- d) Incubar los tubos al menos 24 h a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- e) Sonicar otros 15 minutos (3 ciclos) en frío antes de centrifugar
- f) Centrifugar a 5000 rpm por 20 min. a 5 °C. Recuperar el extracto con una pipeta Pasteur y pasarlo a un tubo de vidrio de 15 ml (tubo 2). Agregar 1.5 mL de CHCl_3 : CH_3OH (1:2 V:V) a la biomasa residual y centrifugar nuevamente a 5000 rpm por 20 min a 5 °C, recuperando el extracto (tubo 2).
- g) Agregar 2 mL de agua destilada al tubo 2, que contiene el extracto y agitar con vortex. Eliminar el exceso de agua de la capa superior y centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 5 °C y separar la fase inferior formada de cloroformo y lípidos.
- h) Agregar 1 ml de cloroformo y separar la fase inferior (CHCl_3 : lípido), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Colocar la fase CHCl_3 :lípido en un tubo de 10 mL (tubo3, tubo a peso constante necesario para cálculo de peso final e inicial).
- i) Lavar la fase acuosa con 1 mL de CHCl_3 , mezclar con el vortex y centrifugar nuevamente a 5000 rpm durante 10 minutos, recuperar la fase inferior (CHCl_3 :lípido) y colocarlo en el tubo 3.
- j) En la campana de extracción, secar la fase CHCl_3 : lípido (tubo 3) con nitrógeno gaseoso. Proceder a la cuantificación de lípidos totales.

Cantidad de lípidos: $\frac{(\text{peso final del tubo} - \text{peso inicial del tubo})}{\text{volumen de muestra utilizada}}$

5) PROTOCOLO PARA ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

Curva de calibración

La curva de concentración se obtiene usando un gradiente de concentraciones de glucosa anhidra preparada a partir de una solución de 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Cuadro 11. Concentración de patrones para curva de calibración de carbohidratos.

Volumen de glucosa (μL)	Volumen de H_2SO_4 (μL)	Vol. Total (μL)	Glucosa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$A_{485 \text{ nm}}$ promedio
0	1000	1000	0	0
200	800	1000	24.08	0.190
400	600	1000	48.16	0.415
600	400	1000	72.24	0.617
800	200	1000	96.32	0.793
1000	0	1000	120.40	0.888

Una vez que se tienen las diferentes concentraciones se continua la curva de calibración utilizando los reactivos que se describen a partir del inicio del apartado

Análisis de muestra.

Los datos se grafican y se ajustan por mínimos cuadrados a una ecuación de segundo grado, obteniendo la R^2 , el valor de la pendiente (m), utilizando el intercepto (b) igual a cero. El valor de r deberá ser superior a 0.98, si se obtiene un valor inferior la curva se debe repetir.

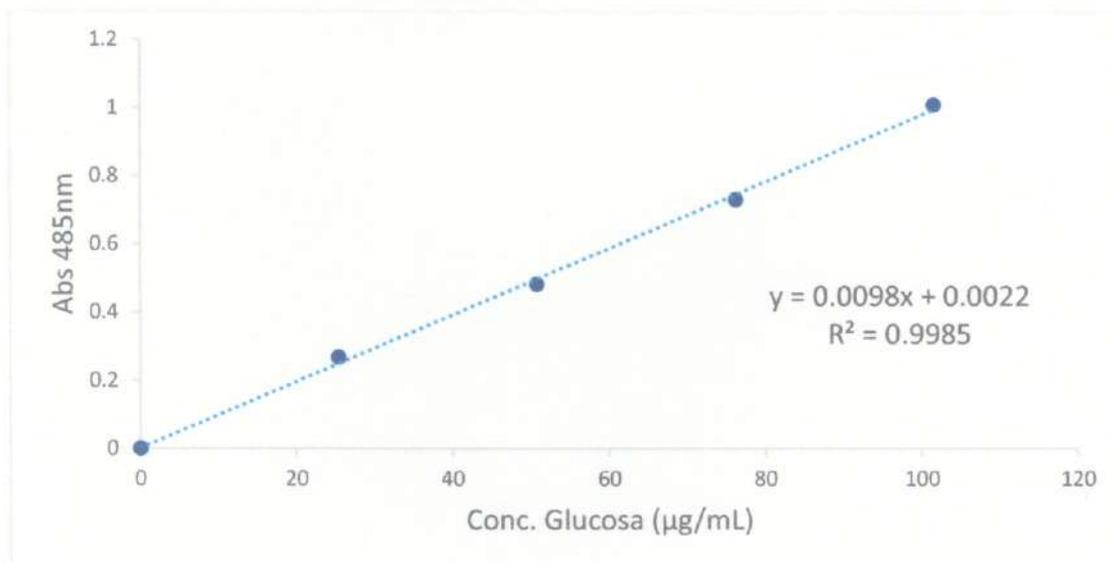
Análisis de muestra

- Tomar 3 mL de muestra y centrifugar a 6000 rpm.
- Una vez terminada la centrifugación, decantar el líquido sobrenadante para solo utilizar la biomasa suspendida en el tubo de centrifuga.
- Agregar 1 mL de H_2SO_4 1.0 M (Whyte, 1987) y mantener a temperatura ambiente hasta que todos los tubos contengan el ácido.
- Agregar otros 4 mL de H_2SO_4 1.0 M (Total 5 mL de H_2SO_4).

- e) Colocar los tubos tapados individualmente con papel aluminio en un termo baño a 100°C durante 1 h.
- f) Retirar los tubos del baño y dejar en reposo hasta que alcancen la temperatura ambiente.
- g) Centrifugar a 1,200 g por 15 min.
- h) Separar el extracto ácido con una pipeta Pasteur limpia, teniendo cuidado de no resuspender la pastilla celular adherida al fondo del tubo; medir el volumen total y pasarlo en un tubo limpio.
- i) Agregar 1 mL de fenol al 5% y mezclar y dejar reposar por 40 min.
- j) Agregar lentamente 5 mL de H₂SO₄ concentrado y enfriar a temperatura ambiente.
- k) Leer a 485 nm, calibrando el espectrofotómetro calibrando el espectrofotómetro con un blanco que se prepara de la misma manera, sustituyendo el extracto ácido de la muestra con 1 mL de H₂SO₄ 1M.

Curva de calibración realizada:

Figura 16. Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de carbohidratos en la biomasa de microalgas.



6) DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)

El PBM es un ensayo a escala de laboratorio que se realiza en batch, para determinar la biodegradabilidad anaerobia y la máxima producción de CH₄ de

diferentes sustratos que pueden estar en forma líquida o principalmente sólida. (Cárdenas, Parra, Torres y Vásquez. 2016)

Ecuaciones utilizada para la determinación:

$$PBM = \frac{\text{Volumen total de metano en condiciones de TPE}}{\text{gramos de SV iniciales de sustrato}}$$

El volumen total de metano en condiciones estándares de presión y temperatura se calcula utilizando la ley de los gases ideales de la siguiente manera.

- Cálculo de moles de biogás:

$$n_{\text{Biogás}} = \frac{PV}{RT}$$

P: presión a la que se realiza el ensayo de digestión

V: volumen de biogás medido en el ensayo de digestión

R: constante R de los gases ideales

T: Temperatura en la que fue realizado el ensayo

- Cálculo de volumen de biogás en condiciones estándares de presión y temperatura:

$$V_{\text{Biogás CE}} = \frac{n_{\text{Biogás}} * R * T}{P}$$

- Cálculo de volumen de metano en condiciones estandarates:

$$V_{\text{CH}_4 \text{ CE}} = \frac{V_{\text{Biogás CE}} * \text{Conc. (\%)}}{100}$$

Conc. (%): concentración porcentual de metano en la muestra determinada mediante cromatografía de gases.

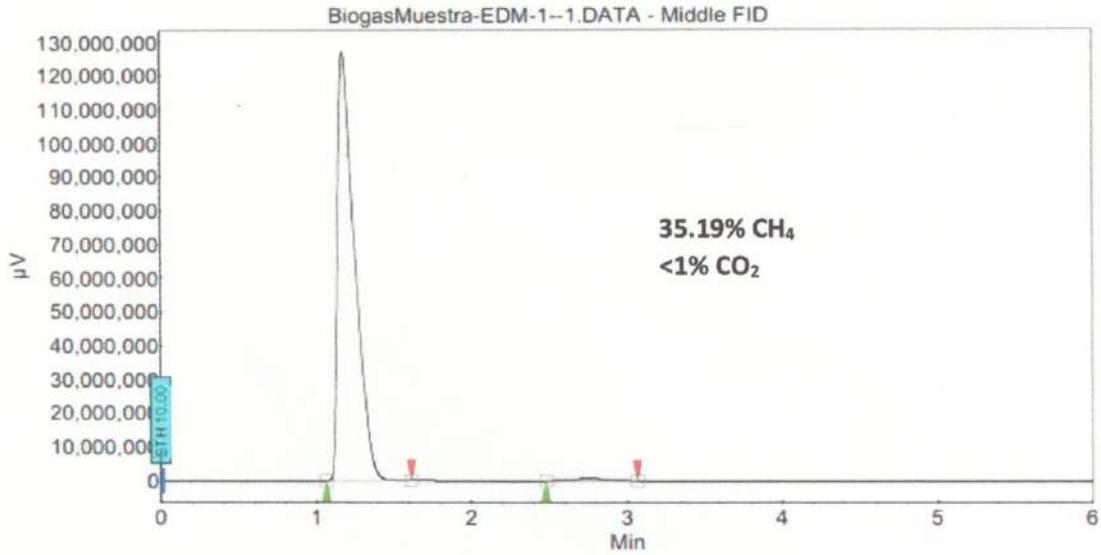
7) CONFIGURACIÓN DEL CROMATÓGRAFO DE GASES PARA ANÁLISIS DEL BIOGÁS.

Injectors			
Front (1041 On-Column)			
EFC 24 - Pressure program	Rate (Psi/min)	Step (Psi)	Time (min)
	Initial	47.0	1.00
	Total time		1.00
EFC 24 - Flow steps	Time (min)	Flow (mL/min)	
	Initial	75	
Coolable zone 1			
Heater	ON		
Setpoint	70 °C		
Middle			
EFC 24 - Pressure program	Rate (Psi/min)	Step (Psi)	Time (min)
	Initial	46.0	1.00
	Total time		1.00
EFC 24 - Flow steps	Time (min)	Flow (mL/min)	
	Initial	75	
Column oven			
Stabilization time	2.00 min		
Column oven zone			
Heater	ON		
Temperature program	Rate (°C/min)	Step (°C)	Time (min)
	Initial	70	6.00
	Total time		6.00
Valve oven			
Rear (Small valve oven)			
Coolable zone 3			
Heater	ON		
Setpoint	70 °C		
Columns			

Front				
Carrier gas	Helium			
Length	30.00 m			
Inside diameter	250 μ m			
Middle				
Carrier gas	Helium			
Length	30.00 m			
Inside diameter	250 μ m			
Detectors				
Heat-only zone 4				
Heater	OFF			
Setpoint	200 $^{\circ}$ C			
Front (TCD)				
Electronics	ON			
Time constant	Fast			
Filament temp. limit	390 $^{\circ}$ C			
Filament temperature	50 $^{\circ}$ C			
TCD event table	Time (min)	Range	Autozero	Polarity
	Initial	0.05	YES	POSITIVE
Heat-only zone 5				
Heater	ON			
Setpoint	200 $^{\circ}$ C			
Middle (FID)				
Electronics	ON			
Time constant	Fast			
FID event table	Time (min)	Range	Autozero	
	Initial	12	YES	
EFC 11				
Make-up (Helium) flow	25 mL/min			
Combustion (H2) flow	30 mL/min			
Combustion (Air) flow	300 mL/min			
Methanizer				
Middle (Methanizer)				
Coolable zone 2				

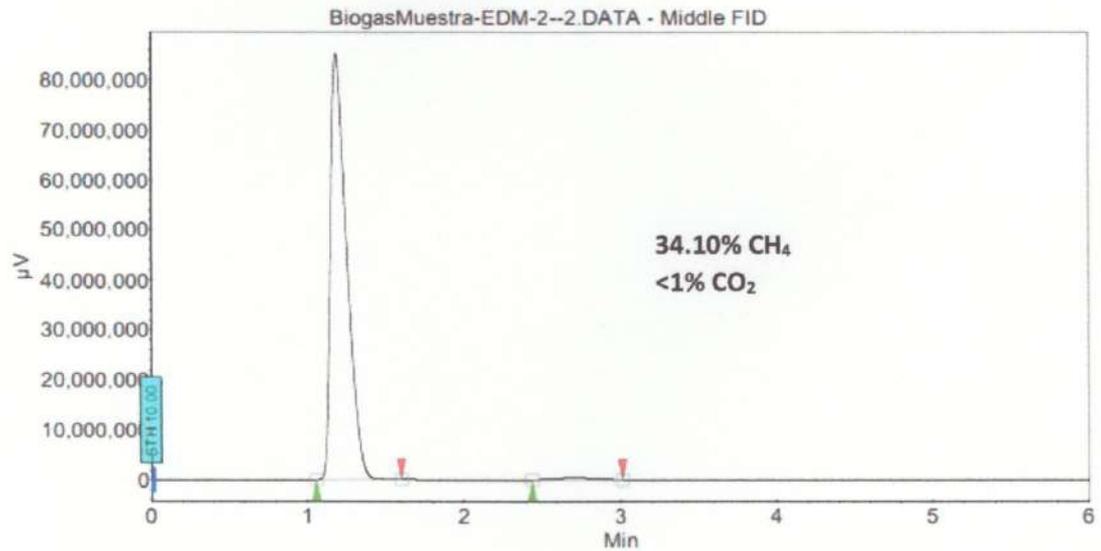
Heater	ON			
Setpoint	400 °C			
Output ports				
Front				
Output port program	Time (min)	Detector source	Attenuation (2^X)	
	Initial	Front	0	
Middle				
Output port program	Time (min)	Detector source	Attenuation (2^X)	
	Initial	Middle	0	
Rear				
Output port program	Time (min)	Detector source	Attenuation (2^X)	
	Initial	Rear	0	
Valves				
Valve event table	Time (min)	Inj + Bfl to Vent	Series Bypass	Methanizer Bypass
	Initial	Fill + Bfl	Bypass	Series
	0.01	Inject	Bypass	Series
Miscellaneous				
Data rate	10 Hz			
Start automatically when ready	NO			

8) CROMATOGRAMAS



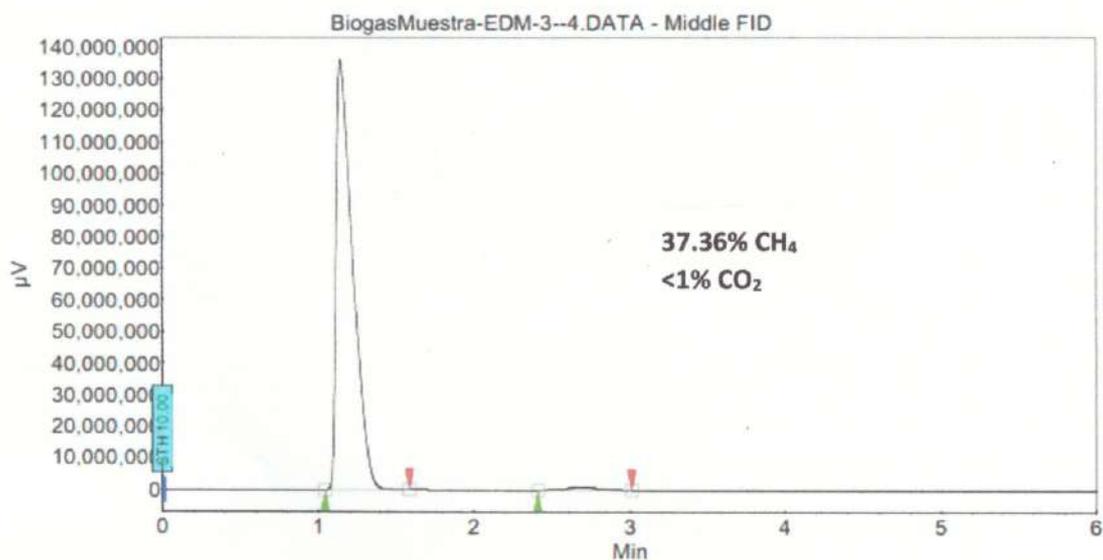
Peak results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.17	99.11	126945634.6	16062841.0	99.108
2	UNKNOWN	2.75	0.89	573113.5	144646.0	0.892
Total			100.00	127518748.1	16207486.9	100.000



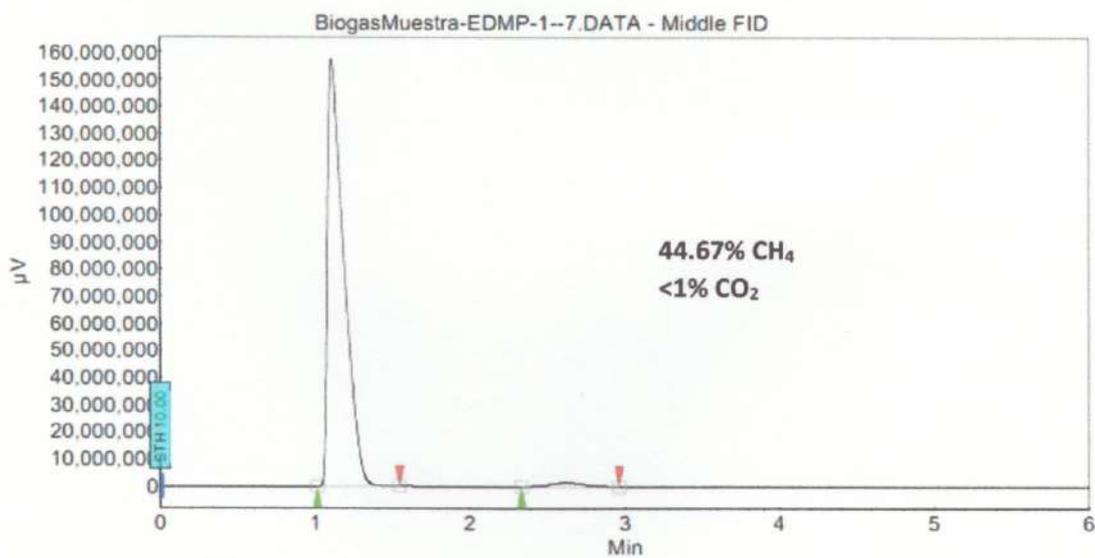
Peak results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.19	98.97	85186348.9	10148754.4	98.969
2	UNKNOWN	2.70	1.03	433088.8	105727.8	1.031
Total			100.00	85619437.7	10254482.2	100.000



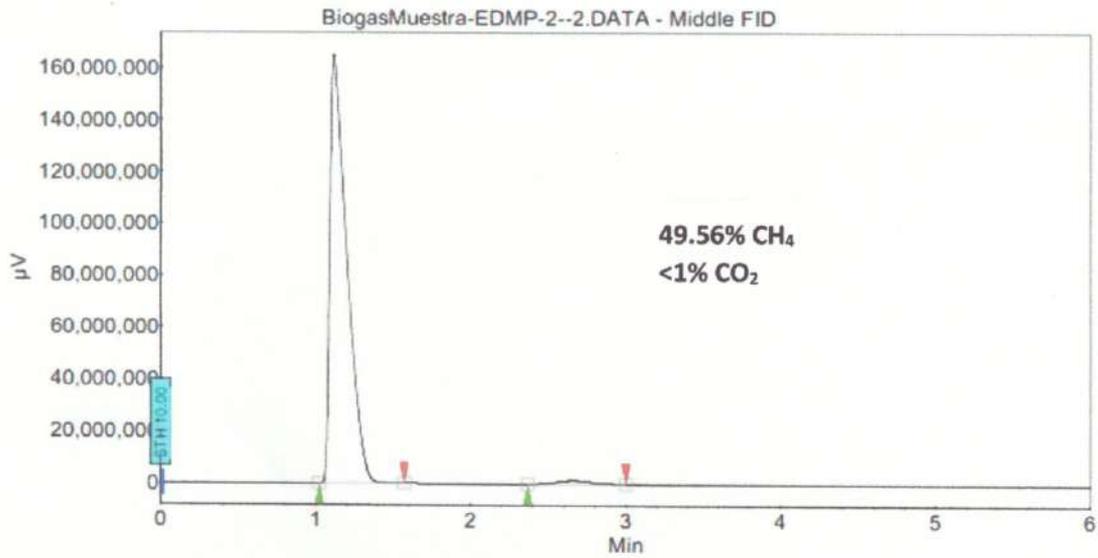
Peak results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [μV]	Area [μV Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.15	98.85	135809038.0	16806822.8	98.854
2	UNKNOWN	2.69	1.15	790391.3	194866.4	1.146
Total			100.00	136599429.3	17001689.2	100.000



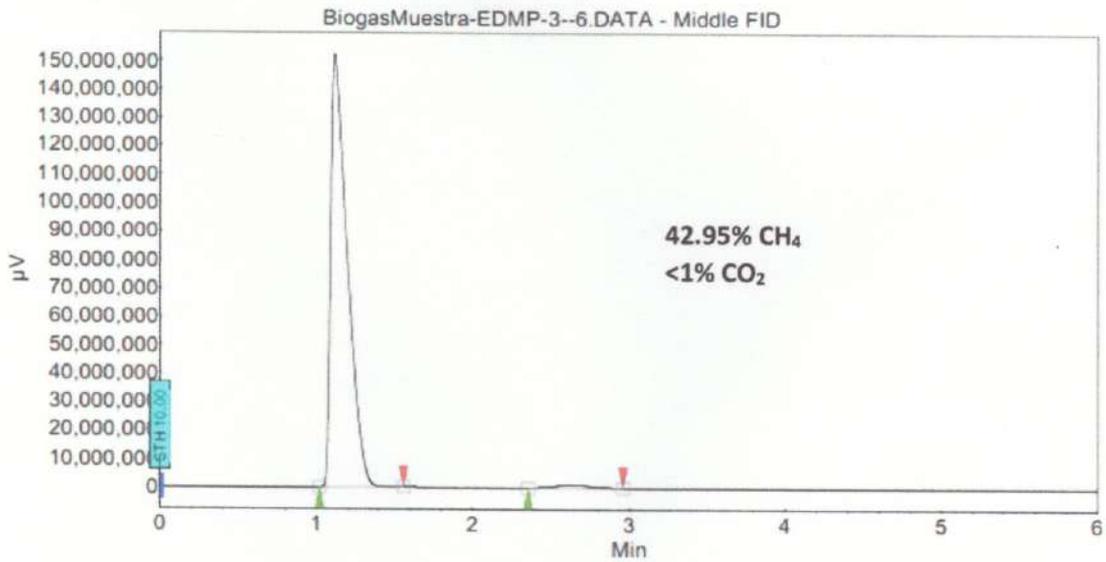
Peak results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [μV]	Area [μV Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.11	98.29	157544661.2	19313415.8	98.290
2	UNKNOWN	2.62	1.71	1400571.5	335978.0	1.710
Total			100.00	158945232.7	19649393.8	100.000



Peak results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.12	98.49	164999983.9	20986849.6	98.486
2	UNKNOWN	2.66	1.51	1313548.7	322631.7	1.514
Total			100.00	166313532.6	21309481.2	100.000



Peak results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.12	98.66	152207217.8	18722026.3	98.660
2	UNKNOWN	2.63	1.34	1080474.5	254321.8	1.340
Total			100.00	153287692.3	18976348.0	100.000

9) FOTOGRAFÍAS TOMADAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

Figura 17. Finca La Hermosa, Caldera. Sitio de muestreo de estiércol vacuno.



Figura 18. Preparación de medio de cultivo para crecimiento de microalgas.



Figura 19. Inicio de ensayo de producción de biomasa de microalgas.



Figura 20. Finalización del ensayo de producción de biomasa de microalgas.



Figura 21. Pasta de microalgas producto de la cosecha de la biomasa.



Figura 22. Análisis de biomasa de microalgas.



Figura 23. Análisis espectrofotométrico del crecimiento del cultivo de microalgas.



Figura 24. Biomasa fresca (izquierda) y biomasa pretratada térmicamente (derecha).



Figura 25. Armado de digestores anaerobios.

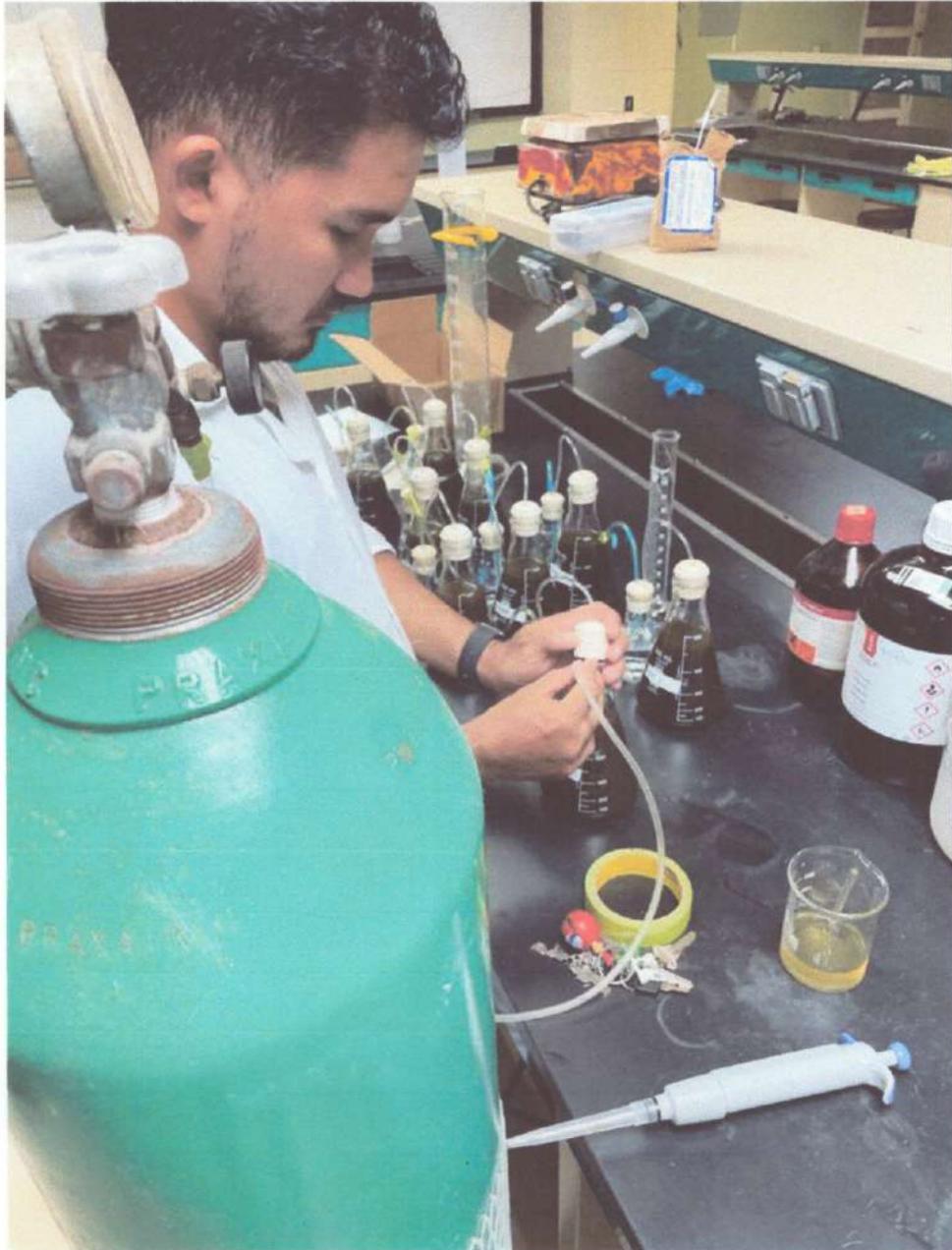


Figura 26. Ensayo de digestión anaerobia.



Figura 27. Sistema de dilución de gases utilizado para construcción de las curvas de calibración de CO_2 y CH_4 .

