



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA**  
**INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA**

**EVALUACIÓN DE LA OZOFLOTACIÓN COMO PRETRATAMIENTO EN BIOMASA  
MICROALGAL PARA LA OBTENCIÓN DE BIOGÁS.**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN INGENIERÍA**

**PRESENTA:**  
**SANTIAGO QUEROL MORFÍN**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO DE INGENIERÍA**  
**COMITÉ TUTOR**  
**DRA. IDANIA VALDEZ VÁZQUEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA**  
**DR. THANGARASU PANDIYAN, FACULTAD DE QUÍMICA**  
**DR. ULISES DURÁN HINOJOSA, INSTITUTO DE INGENIERÍA**  
**DRA. GABRIELA E. MOELLER CHÁVEZ, INSTITUTO MEXICANOS DE TECNOLOGÍA DEL**  
**AGUA**

**MÉXICO, D.F. FEBRERO 2017**

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: DRA. IDANIA VALDEZ VÁZQUEZ  
Secretario: DR. ULISES DURÁN HINOJOSA  
Vocal: DRA. GABRIELA E. MOELLER CHÁVEZ  
1<sup>er.</sup> Suplente: DR. PANDIYAN THANGARASU  
2<sup>d o.</sup> Suplente: DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: Instituto de Ingeniería, UNAM.

**TUTOR DE TESIS:**

Dra. María Teresa Orta Ledesma

-----  
**FIRMA**

## *Agradecimientos*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida para realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Ingeniería por abrirme las puertas y permitirme hacer uso de sus instalaciones para desarrollar mi trabajo de investigación en la maestría en ingeniería ambiental.

A la Doctora María Teresa Orta Ledesma por el apoyo brindado durante mis estudios y la paciencia que me mostro durante el transcurso de los mismos.

A los integrantes de mi comité tutor la Doctora Idania Valdez Vázquez y el Doctor Pandiyan Thangarasu por los aportes que realizaron a mi trabajo de tesis y el tiempo que dedicaron para poder brindarme el consejo acertado en los momentos en que los necesité.

Al Doctor Ulises Durán Hinojosa por el apoyo que me mostro a lo largo de mi experimentación y el tiempo que dedico a la corrección de mi tesis.

A la Doctora Gabriela E. Moeller Chávez por todo el conocimiento que me compartió y el tiempo dedicado a la corrección de mi tesis.

A la Maestra Isaura Yañez Noguez por los jalones de oreja y todo el apoyo que nos brinda en el día a día, muchas gracias.

Al Doctor Ignacio Monje Ramírez por los conocimientos impartidos y los consejos dados durante el transcurso de la maestría.

A la Maestra Margarita Cisneros y al Doctor Simón Gonzales por el apoyo brindado en la presente tesis al permitirme hacer uso de sus equipos analíticos.

## *Dedicatoria*

A mi esposa Daniela Martín del Campo Ramírez, no sólo por el apoyo que me ha brindado en todos los capítulos de esta travesía, sino también por ser mi motivación para seguir adelante aún en esos momentos en los que no me quedaban muchas ganas de seguir adelante.

A mis papá que nunca me dejó de apoyar aun cuando no estaba de acuerdo con mis decisiones.

A mi mamá y Manuel, que siempre han tenido palabras de apoyo para mí aún en las peores situaciones.

A mi hermana por su apoyo incondicional y palabras de ánimo.

A mis amigos en Guadalajara y Ciudad de México que siempre logran distraerme y separarme de mis preocupaciones aunque sea por un momento.

Y por último un agradecimiento muy especial a mis amigos y compañeros del equipo de trabajo que logran hacer los días más llevaderos y crean una atmosfera de compañerismo que no es fácil encontrar estos días.

# Contenido

<b>Índice de figuras</b> .....	1
Índice de tablas .....	2
Índice de ilustraciones .....	2
1. Introducción .....	3
2. Objetivos .....	6
2.1. Objetivo General.....	6
2.2. Objetivos Específicos y Metas.....	6
3. Marco teórico.....	7
3.1. Microalgas .....	7
3.2. Pared celular microalgal.....	8
3.3. Cultivo de microalgas.....	12
3.4. Cosecha de microalgas.....	13
3.5. Pretratamientos para biomasa microalgal.....	14
3.5.1. Pretratamientos térmicos .....	15
3.5.2. Pretratamientos mecánicos .....	17
3.5.3. Pretratamientos químicos .....	18
3.5.4. Pretratamientos biológicos .....	19
3.6. Ozoflotación.....	22
3.7. Energía a partir de microalgas .....	23
3.8. Biogás .....	27
3.9. Biogás a partir de microalgas .....	28
4. Metodología.....	31
4.1. Cultivo de microalgas.....	31
4.2. Recolección de lodos.....	32
4.3. Preparación de muestras .....	33
4.4. Ozoflotación.....	33
4.5. Extracción de lípidos.....	35
4.6. Pretratamiento hidrotermal .....	37

4.7. Digestión anaerobia .....	37
4.8. Parámetros a medir.....	38
4.9. Esquema del proceso .....	39
4.10. Diseño de experimento .....	40
5. Resultados y análisis .....	41
5.1. Curvas de crecimiento .....	41
5.2. Determinación de porcentaje de SV para las muestras e inóculo .....	42
5.3. Determinación de ST para las muestras que fueron concentradas .....	43
5.4. Cálculos finales para montaje de reactores .....	44
5.5. Generación de biogás.....	46
5.6. Cromatografía .....	49
5.7. Gráfica de Metano .....	51
6. Conclusiones .....	54
7. Trabajos futuros a desarrollar.....	55
8. Referencias.....	56
9. Anexo - Análisis estadístico.....	61

## Índice de figuras

Figura 1. Diagrama que muestra la interpretación de la pared celular de <i>Scenedesmus quadricauda</i> . (Weier 1963) .....	11
Figura 2. Pretratamientos para biomasa microalgal utilizada en producción de biogás (Passos et al. 2014) .....	15
Figura 3. Conversión de energía a partir de microalgas (Amin, 2009; Brennan & Owende, 2010) .....	24
Figura 4. Componentes de la unidad de oxidación por ozono (Valeriano G. M., 2013) .....	34
Figura 5 Esquema del proceso completoResultados .....	39
Figura 6. Esquema del proceso completo.....	39
Figura 7. Curva de Crecimiento de microalgas .....	41
Figura 8. Crecimiento diario de microalgas.....	41
Figura 9. Crecimiento microalgal .....	42
Figura 10. Generación de biogás, primer ensayo.....	46
Figura 11. Generación de biogás en segundo ensayo. ....	47
Figura 12. Generación de biogás, tercer ensayo. ....	48

Figura 13. Curva de calibración para metano.....	50
Figura 14. Generación de metano en tercer ensayo .....	51
Figura 15. Tabla de Anova. ....	62

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de microalgas debido a su cobertura.....	9
Tabla 2. Composición celular (% en peso seco).....	9
Tabla 3. Distribución de azúcares en la pared celular (% de azúcares) .....	10
Tabla 4. Comparación de métodos de pretratamiento para incrementar la biodegradabilidad de la biomasa microalgal en la digestión anaerobia (Passos et al. 2014).....	19
Tabla 5. Comparación de balances de energía para pretratamientos (Passos et al. 2014) .....	21
Tabla 6. % de aumento de metano en diferentes pretratamientos. ....	21
Tabla 7. Contenido lipídico en diferentes especies de microalgas (Maity et al. 2014) .....	25
Tabla 8. Composición de biogás generado por digestión anaerobia (Kwietniewska and Tys 2014) .....	28
Tabla 9. Porcentaje de sólidos volátiles por muestra para los ensayos 1 y 2.....	42
Tabla 10. Porcentaje de sólidos volátiles para el ensayo 3. ....	43
Tabla 11. Determinación de sólidos totales en muestras concentradas.....	43
Tabla 12. Cálculos finales para montaje de reactores en ensayos 1 y 2.....	44
Tabla 13. Cálculos finales para montaje de reactores en ensayo 3. ....	45
Tabla 14. Picos de metano en tercer ensayo .....	49
Tabla 15. Resultados de cromatografía. ....	50
Tabla 6. Porcentaje de aumento de metano en diferentes pretratamientos.....	52

## Índice de ilustraciones

Ilustración 1 Laguna facultativa del lago de Texcoco.....	32
Ilustración 2. Lodos anaerobios recolectados .....	32
Ilustración 3. Columna de ozoflotación.....	35
Ilustración 4. Ozoflotación de microalgas.....	35
Ilustración 5. Arreglo del sistema de ozoflotación.....	35
Ilustración 6. Biomasa ozoflotada residual después de extracción de lípidos .....	36
Ilustración 7. Reactores para digestión anaerobia.....	38
Ilustración 8. Biomasa ozoflotada concentrada.....	43
Ilustración 10. Biomasa cruda concentrada.....	43
Ilustración 9. Biomasa con pretratamiento hidrotermal concentrada.....	43

## 1. Introducción

La creciente industrialización y la alta tasa de crecimiento poblacional en el mundo (1.068% según la CIA, 2014), han provocado un fuerte incremento en el consumo de combustibles fósiles, llevando así al mundo hacia la crisis energética en la que nos encontramos actualmente. Si el consumo de combustibles fósiles se mantiene al ritmo actual, las reservas mundiales se habrán acabado en menos de 50 años (Huang et al. 2010).

Los combustibles fósiles abarcan alrededor del 80% de la demanda energética global. Esto es un problema mayúsculo, no sólo debido al inminente agotamiento de las reservas de dichos combustibles, sino también debido a que los combustibles fósiles son los principales responsables de las emisiones de gases de efecto invernadero y por lo tanto del cambio climático que se está viviendo (Brennan and Owende 2010; Guo et al. 2015).

Una solución a estos problemas es el uso de los llamados biocombustibles, los cuales son combustibles creados a partir de materia orgánica. Estos biocombustibles ayudan a mejorar el panorama para el problema energético, ya que pueden ser utilizados para producir energía reduciendo así el consumo de combustibles fósiles. Pero también nos presentan una respuesta al problema del cambio climático debido a diferentes factores como lo son: 1) el biodiesel reduce las emisiones de azufre en 30% y de monóxido de carbono en 10%; 2) la cantidad de gas producido durante la combustión de biodiesel es menor que la de la gasolina; 3) debido a la ausencia de compuestos aromáticos en el biodiesel la toxicidad de las emisiones se reducen en 90% y las emanaciones de cancerígenos en 95 (Huang et al. 2010).

El biodiesel es producido tradicionalmente mediante transesterificación de triglicéridos de origen natural, principalmente de aceites vegetales. Como materia prima generalmente se utilizan cultivos como raps, maíz, soya y aceite de palma, que requieren el uso de suelo fértil, provocando una reducción de los terrenos disponibles para cultivos con fines alimentarios. Para solucionar este problema, en los últimos años se han buscado materias primas que no compitan con la producción de alimentos, surgiendo



como una alternativa, la utilización de cultivos de microalgas (Halim et al. 2011; Meier Figueroa et al. 2011).

Algunas de las ventajas de usar la biomasa microalgal como el precursor de los biocombustibles son: 1) las algas son un sistema biológico muy eficiente para utilizar la energía solar con el fin de producir compuestos orgánicos; 2) las algas son plantas no-vasculares, no poseen (generalmente) aparatos reproductivos complejos; 3) muchas especies de algas pueden ser inducidas para producir concentraciones altas de compuestos deseados como las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y pigmentos; 4) las microalgas son organismos que poseen un muy simple ciclo de división celular; 5) existen diferentes fuentes de alimentos para microalgas, lo que facilita su cultivo; 6) las microalgas se pueden adaptar fácilmente a variaciones en el sistema, dándonos así facilidad para la operación de sus tanques de reproducción (Amin 2009).

Uno de los principales problemas a los que nos enfrentamos al generar biodiesel a partir de microalgas es el bajo rendimiento energético, debido a los altos costos de energía que nos provoca su producción (mezclado, bombeo, extracción de lípidos, secado de biomasa, etc). Este bajo rendimiento energético se puede ver mejorado con el aprovechamiento de la biomasa microalgal residual que nos queda después de la extracción de lípidos. Una opción para este aprovechamiento sería la producción de biogás, llevando a cabo una digestión anaerobia de dicha biomasa, liberando así la energía residual guardada en ella (Meier Figueroa et al. 2011).

Uno de los principales obstáculos con los que nos encontramos al tratar de realizar una digestión anaerobia a partir de biomasa microalgal es la resistencia que presenta la pared celular de estas especies. *Scenedesmus* sp. posee una de las paredes celulares más resistentes debido a su composición multicapa de celulosa y hemicelulosa en el interior, y esporo-polínicos y politerpenos en el exterior. Esta pared celular, que tiene como objetivo proteger a la microalga de ataques biológicos, reduce también la cantidad de biogás que se logra producir por una digestión anaerobia (Passos et al. 2014).

En esta investigación se pretende evaluar a la ozoflotación como una alternativa de pretratamiento, para la ruptura o debilitación de la pared celular de la microalga, y con

esto, incrementar la producción de biogás a partir de la digestión anaerobia. Aunado a esto, se evaluará la capacidad de producción de biogás a partir de la biomasa microalgal residual post-extracción de lípidos, como proceso complementario para mejorar el rendimiento energético de la obtención de biodiesel a partir de biomasa microalgal.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo General**

Evaluar la ozoflotación como pretratamiento en biomasa microalgal para la obtención de biogás.

### **2.2. Objetivos Específicos y Metas**

1. Obtener muestras de biomasa microalgal con las siguientes características: sin pretratamiento, con pretratamiento de ozoflotación, con pretratamiento de ozoflotación y extracción de lípidos. Para ser utilizadas en las pruebas de digestión anaerobia.
2. Diseñar y construir reactores para llevar a cabo las digestiones anaerobias de cada muestra, considerando la medición de producción de biogás.
3. Establecer la cantidad de biomasa en peso, temperatura en reactores y tiempo de retención, para cuantificar la cantidad y composición del biogás en términos de CH<sub>4</sub> en cada uno de los ensayos.
4. Evaluar la capacidad de generación de biogás a partir de la biomasa microalgal residual post extracción de lípidos, para su aprovechamiento en la generación de otros biocombustibles.
5. Analizar y comparar, mediante ANOVA por pares, los resultados obtenidos para poder sacar conclusiones que ayuden a evaluar la eficiencia de la ozoflotación como pretratamiento para la obtención de biogás.

## **3. Marco teórico**

### **3.1. Microalgas**

Las algas son reconocidas como una de las formas de vida más antiguas en la tierra. Son las plantas primitivas, no poseen raíces, ramas u hojas, ni tienen formas reproductoras complicadas. Poseen clorofila como pigmento y medio de asimilación de energía solar. Sus estructuras celulares son principalmente para generación de energía y su forma simple de desarrollo les permite sobrevivir en ambientes inhóspitos (Brennan and Owende 2010).

Entre las algas se encuentra una variedad microscópica que se denomina microalga. Estas algas microscópicas se pueden considerar como pequeñas fábricas celulares que convierten el dióxido de carbono en biocombustibles y bioreactivos de alto valor comercial. En adición a esto, las microalgas pueden ser usadas para bioremediación y para fijación de nitrógeno (Chisti 2007).

Las algas y microalgas tienen características muy parecidas, sin embargo se prefiere la utilización de microalgas para obtención de biocombustibles debido principalmente a: 1) su tamaño, debido a este tamaño el área de contacto es mayor y debido a esto el tamaño requerido de tanque para su reproducción menor; 2) la capacidad de crecer con agua residual como nutriente.

Las microalgas pueden ser organismos procariontes o eucariontes, que son capaces de crecer en muchos ambientes como: agua dulce, agua residual, agua de mar y algunos ambientes más extremos. Los tamaños de estos microorganismos varían desde los micrómetros hasta milímetros. Existen entre 200,000 y 800,000 especies de algas aunque sólo se han descrito cerca de 50,000. Las microalgas fotosintéticas pueden crecer prácticamente en cualquier ambiente que contenga nutrientes aunque estén en bajas concentraciones y luz solar. Sin embargo para mejorar su crecimiento se debe contar con nutrientes específicos para cada especie. (Maity, et al., 2014; Martínez et al., 2005).

La utilización de microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles ofrece diversas ventajas entre las cuales se destacan:

- Organismos fotosintéticos capaces de duplicar su biomasa en 24h. Tiempo de duplicación celular 0.824 días (Quevedo, Morales, and Acosta 2008).
- Para su crecimiento las microalgas requieren únicamente de luz solar, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), agua y sales inorgánicas.
- No requieren de productos químicos tales como herbicidas o pesticidas para su crecimiento.
- Menor requerimiento de área para su reproducción.
- No son dependientes de un suelo fértil.
- No requieren un suministro de agua dulce.
- Las microalgas pueden cultivarse en agua residual bajo condiciones controladas, contribuyendo a la remoción de nitrógeno y fósforo.
- Las microalgas funcionan como un tratamiento terciario de aguas residuales.
- Alto contenido de lípidos (puede exceder el 80% en peso seco).
- CO<sub>2</sub> como fuente de carbono, 1Kg de biomasa fija 1.83Kg CO<sub>2</sub>.
- La utilización de microalgas no compromete la producción de alimentos.
- Las microalgas producen subproductos de alto valor agregado como son proteínas, pigmentos, biopolímeros e hidratos de carbono (Yang et al. 2011; Chisti 2007; Brennan & Owende 2010).

### **3.2. Pared celular microalgal**

La pared celular de las microalgas sigue siendo un tema de interés para muchos biólogos. Cada especie muestra diferentes composiciones en ella. A pesar de ello, utilizando distintas caracterizaciones que se han realizado, se ha logrado clasificar a las microalgas debido a su cobertura extracelular de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación de microalgas debido a su cobertura.

Taxon	Cobertura	Composición
<i>Prasinophyceae</i>	Escalas	2-Ceto azúcares, mananos, glicoproteínas
<i>Chlorodendrophyceae</i>	Escalas unidas	2-Ceto azúcares, proteínas
<i>Trebouxiophyceae</i>	Pared celular	Celulosa, algaena, $\beta$ -galactofurano
<i>Chlorophyceae</i>	Pared de glicoproteínas cristalinas; pared celular fibrosa	Glucoproteínas ricas en hidroxiprolina, celulosa, arabinogalactano, extensina.
<i>Ulvophyceae</i>	Pared celular	Celulosa, $\beta$ -mananos, $\beta$ -xilanos, polisacáridos sulfatados, extensina.
<i>Charophyceae</i> – antiguas	Escalas, pared celular	2-Ceto azúcares, celulosa, homogalacturona, 1,3- $\beta$ -glucano, arabinogalactano.
<i>Charophyceae</i> – nuevas	Pared celular	Celulosa, homogalacturona, xiloglucanos, mananos, xilanos, 1,3- $\beta$ -glucanos, arabinogalactano, extensina, lignina.

(Domozych et al. 2012)

Blumreisinger y su equipo de trabajo (Blumreisinger et al. 1983) realizó un análisis de biomoléculas presentes en la pared celular de diferentes microalgas:

Tabla 2. Composición celular (% en peso seco)

Alga	Azúcares	Ácidos urónicos	Glucosaminas	Proteínas	Desconocidos
<i>C. vulgaris</i> K	74	4.1	---	3.9	18
<i>C. vulgaris</i> 211-81	24	18	6.3	4.5	47

<i>C. vulgaris</i> 211-11f	44	24	15	3.9	13
<i>C. saccharophila</i> 211-1 <sup>a</sup>	54	14	0	1.7	30
<i>C. fusca</i> 211-8c	68	6.9	0	11	14
<i>M. braunii</i> 202-7b	47	6.1	0.4	16	31
<i>A. Densus</i> 202-1	32	2.3	---	14	52
<i>S. obliquus</i> 276-3a	39	1.2	0	15	45

(Blumreisinger et al. 1983)

El mismo equipo de trabajo realizo un análisis de los azúcares presentes en las paredes celulares:

Tabla 3. Distribución de azúcares en la pared celular (% de azucares)

Alga	Rha	Fuc	X1	Ara	Xil	X2	Man	Gal	Glu
<i>C. vulgaris</i> K	47	0	13	1.6	7.1	0	1.7	26	3.6
<i>C. vulgaris</i> 211-81	45	0	<1	9	19	0	6.7	18	1.7
<i>C. vulgaris</i> 211-11f	54	<1	<1	6.6	10	8.8	5.4	14	<1
<i>C. saccharophila</i> 211-1 <sup>a</sup>	26	0	1.2	2.2	3.3	0	18	27	22
<i>C. fusca</i> 211-8c	2.4	<1	<1	<1	<1	0	66	0	30
<i>M. braunii</i> 202-7b	4.2	<1	0	0	1.7	0	72	0	22
<i>A. Densus</i> 202-1	1.7	0	0	0	<1	0	79	0	19
<i>S. obliquus</i> 276-3a	<1	1.6	0	0	0	0	25	0	73

\*Rha = Ramnosa, Fuc = Fucosa, Ara = Arabinosa, Xil = Xilosa, Man = Manosa, Gal = Galactosa, Glu = Glucosa.

\*\*Las

X son azucares que no se pudieron identificar. (Blumreisinger et al. 1983)

En este estudio se utilizó un cultivo de *Scenedesmus* sp. y un cultivo de *Desmodesmus* sp. por esto resulta importante el estudio realizado por T. Bisalputra y E. Weier sobre la pared celular de *Scenedesmus quadricauda*. En este estudio se llega a vislumbrar con mayor claridad la pared celular de esta microalga, que al igual que toda la familia *Scenedesmus* muestra una alta cantidad de capa peptídica en su pared celular. En otro

estudio realizado por S. Derenne y colaboradores se ve que alrededor del 70% del nitrógeno que se encuentra en el alga *Scenedesmus quadricauda* corresponde a enlaces amidas, los cuales son grupos resistentes a tratamientos como pueden ser los pretratamientos químicos (Derenne et al. 1993).

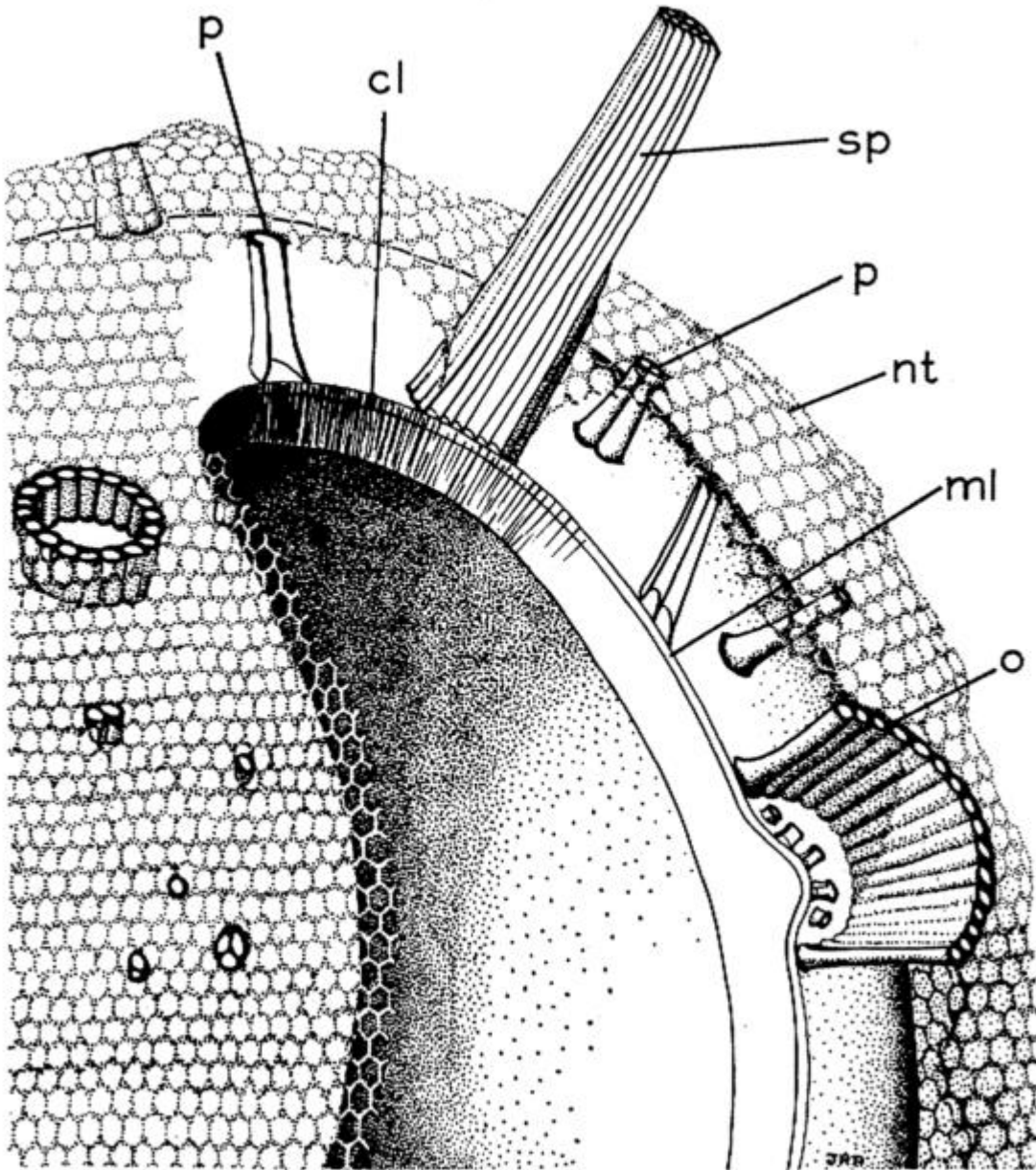


Figura 1. Diagrama que muestra la interpretación de la pared celular de *Scenedesmus quadricauda*. (Weier 1963)

cl = capa de celulosa, ml = capa media, nt = red hexagonal, o = apertura de la pared peptídica, p = apoyo, sp = espina.



La composición de la pared celular también llega a cambiar según las condiciones del cultivo, cambiando tanto la concentración como el tipo de proteínas y carbohidratos presentes en ella. (Cheng et al. 2011).

### **3.3. Cultivo de microalgas**

El cultivo de microalgas es la etapa en la cual se busca el incremento de la biomasa, las microalgas se desarrollan en ambientes que provean las condiciones ideales para dicha acción, estas requieren de una fuente de luz, carbono (CO<sub>2</sub>), agua (natural, residual o salobre), macro nutrientes (C, N, P, S, Ca, Mg y K) y micro nutrientes (Mo, Fe, Ni, Cu, Zn, Co, B, Mn, Cl), además de referir a una temperatura favorable de 20-30°C (Yang et al. 2011).

Las microalgas pueden ser cultivadas de distintas maneras. A escala laboratorio, usando un pequeño fotobiorreactor iluminado, un fermentador o un tanque de agua tipo caja. Para su cultivo es necesaria la irradiación de luz UV, para simular la luz solar.

A gran escala se utilizan tanto sistemas abiertos como cerrados. Los sistemas abiertos se categorizan en: naturales como lagos, lagunas y estanques; y artificiales como estanques artificiales y contenedores. Siendo los más utilizados los estanques, lagos no muy profundos, tanques, estanques circulares y estanques corrientes (Amin 2009).

De manera general, los sistemas de cultivo cerrados se utilizan para producir de 2-8 g/L de biomasa, inclusive cuando se desea desarrollar una sola especie; de manera general un biorreactor consiste de un arreglo matricial de tubos de plástico o de vidrio, de aproximadamente 0.1m de diámetro o menor, permitiendo una penetración efectiva de la luz solar; de igual forma se tienen condiciones de operación controladas como son la disponibilidad de la fuente de carbono, la iluminación, la temperatura y el flujo de nutrientes; sin embargo, el biorreactor presenta problemas de sedimentación con el flujo de las microalgas a través de éste, la producción de oxígeno (que a concentraciones

elevadas inhabilita el crecimiento de las algas), el aumento del pH y problemas de escalamiento y de limpieza.

Por otra parte, los sistemas de cultivo abierto para microalgas son más simples y generan una producción de biomasa de 0.1-0.5g/L, dichos sistemas consisten en estanques al aire libre de baja profundidad (0.3-0.5m), sin agitación; sin embargo dicho sistema presenta ciertas desventajas como lo son la disponibilidad de CO<sub>2</sub>, siendo la solubilidad de la fuente de carbono la limitante para el desarrollo de las microalgas; de igual forma la disponibilidad de nutrientes, la penetración de la luz solar, el control de la temperatura y la invasión de depredadores (FAO, 2009). Los sistemas de cultivo abierto son considerados como apropiados para la producción de algas a gran escala (Chisti 2007).

Uno de los principales problemas para la generación de biocombustibles a partir de microalgas es el costo que produce el cultivo de las mismas, debido a esto se ha propuesto el cultivo utilizando como alimento agua residual, la cual proporciona los nutrientes necesarios, tiene un costo prácticamente nulo (Cho et al. 2013) y es tratada por las microalgas, ayudando así a la disminución de precio del tratamiento de dicha agua residual (Abinandan and Shanthakumar 2015; Batista et al. 2014; Hernández et al. 2013; Kim et al. 2015).

### **3.4. Cosecha de microalgas**

La etapa de cosecha o recolección consiste en la recuperación de la biomasa del medio acuoso en el que fue cultivada, los métodos de cosecha más comunes son la sedimentación, centrifugación, filtración, ultrafiltración, la floculación-flotación y la flotación

Floculantes tradicionales para cosechar microalgas son cloruro férrico y de aluminio, y hasta se ha llegado a utilizar citosina. La cosecha de microalgas por floculación suele ser un proceso caro al utilizarse en operaciones grandes (Amin 2009).

La cosecha de microalgas dentro del proceso de producción de biodiesel, implica del 20-30% del costo total de producción, debido a que es necesario procesar grandes volúmenes de agua para obtener la biomasa; se favorecen los procesos que involucran coagulantes químicos, sin embargo estos procesos no obtienen un producto biológicamente puro, además se sabe que el uso de floculantes modifica los constituyentes del aceite presente en las microalgas (Halim et al. 2012; Tan et al. 2015).

En este trabajo se evaluó el proceso de ozoflotación como pretratamiento, sin embargo este proceso también es un método de cosecha que se da al mismo tiempo que el pretratamiento y fue este el que se utilizó en la investigación.

### **3.5. Pretratamientos para biomasa microalgal**

La principal limitación al utilizar biomasa microalgal como sustrato para la digestión anaerobia es la dificultad que tienen las bacterias metanogénicas para degradar la pared celular de las microalgas (Dębowski et al. 2013; Schwede et al. 2011).

Las técnicas de pretratamiento son necesarias para poder romper la pared celular de las microalgas y tener acceso a los compuestos de interés que después serán utilizados para la generación de biocombustibles. La efectividad del pretratamiento depende en gran parte de la composición de la pared celular de la microalga a tratar (Passos et al. 2014).

El pretratamiento es de vital importancia en el aprovechamiento de la biomasa microalgal para la generación de metano, ya que sin él las bacterias encargadas de la digestión deben gastar mucha energía para degradar la pared celular y en algunos casos no logran penetrar esa pared, lo que lleva a una baja producción de metano y por lo tanto un bajo rendimiento energético (Lakaniemi et al. 2013).

Los métodos de pretratamiento se pueden dividir en cuatro categorías: térmicos, mecánicos, químicos y biológicos (Mat 2015). Hasta la fecha los pretratamientos térmicos y mecánicos son considerados los más efectivos para lograr la lisis de la microalga. Los

pretratamientos térmicos han sido muy estudiados, hasta el grado de existir ya reactores continuos trabajando con estos métodos. Los pretratamientos mecánicos dependen menos de la especie de microalga a tratar, pero requieren mayor cantidad de energía comparados con las demás técnicas. Los pretratamientos químicos han resultado exitosos, particularmente combinados con calor, sin embargo el uso de químicos puede contaminar los productos del pretratamiento. Por último los pretratamientos enzimáticos, mejoran la hidrólisis de las microalgas utilizando una cantidad de energía baja, pero tardan más en lograr la hidrólisis necesaria.

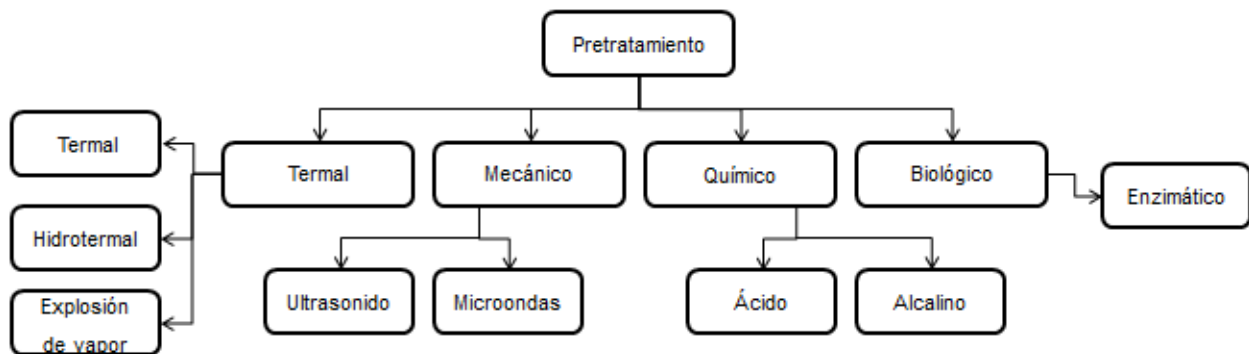


Figura 2. Pretratamientos para biomasa microalgal utilizada en producción de biogás (Passos et al. 2014)

### 3.5.1. Pretratamientos térmicos

Los pretratamientos térmicos son aquellos en que la biomasa microalgal es solubilizada aplicando calor. Estos pretratamientos han sido usados por mucho tiempo para mejorar la desintegración de partículas orgánicas a temperaturas que varía entre 50 y 270°C. La temperatura óptima varía de acuerdo al sustrato que se debe hidrolizar. Para microalgas temperaturas entre los 55 y 170°C han sido aplicadas para incrementar la cantidad de metano (biogás) producido. Estos pretratamientos térmicos se pueden dividir en tres tipos:

- Térmico

Para el pretratamiento termal, la temperatura manejada es menor a 100°C bajo presión atmosférica y es muchas veces conocido como pretratamiento de baja temperatura. Su mayor ventaja es la baja cantidad de energía utilizada en comparación con los otros pretratamientos termales.

Este pretratamiento puede verse influenciado tanto por la temperatura como por el tiempo de exposición, siendo la temperatura la variable con mayor importancia para la desintegración de la biomasa y la efectividad de la generación de metano por digestión anaerobia.

Los aumentos en la cantidad de metano producida son dependientes de la temperatura en tal grado que para temperaturas de entre 50 y 70°C el aumento llegó sólo a 12%, sin embargo en temperaturas de entre 80 y 100°C se ven aumentos en la cantidad de metano producida de hasta 200%.

- Hidrotermal

Este es un pretratamiento que se da a temperaturas mayores a 100°C con una disminución en la presión después del pretratamiento. La cantidad de tiempo del pretratamiento se ve disminuida drásticamente siendo ahora de 15 a 30 minutos, en vez del tiempo usado en el tratamiento termal (3 a 24 horas). Este pretratamiento logra rendimientos de hasta el doble comparado con el pretratamiento termal tanto en producción de metano como en la mejora de la hidrólisis de la microalga

- Termal con explosión de vapor

La presión del pretratamiento incrementa con la temperatura, especialmente a temperaturas superiores a los 160°C. Después del tratamiento la presión se debe disminuir drásticamente hasta llegar a la presión atmosférica. Este proceso de cambio de presión se denomina explosión de vapor. Otro término utilizado para este proceso es el de hidrólisis térmica, usualmente se manejan temperaturas de 160°C con presiones que rondan los 6 bars, por un tiempo de entre 10 y 30 minutos. Después se deja salir el vapor hasta llegar a la presión atmosférica y la biomasa se enfría. Este cambio de presión

logra una gran degradación de la pared celular y desintegración de la biomasa. Con este procedimiento se logra aumentar la cantidad de biogás generado hasta en un 100%.

### **3.5.2. Pretratamientos mecánicos**

Estos logran romper la pared celular utilizando fuerzas físicas. Estos pretratamientos se han estudiado mucho para mejorar la extracción de lípidos para la obtención de biodiesel. La gran ventaja de estos métodos es su poca selectividad hacia el tipo de microalga a utilizar.

- Ultrasonido

El ultrasonido consiste en compresiones y descompresiones rápidas de ciclos de ondas de sonido. Estos ciclos generan cavidades con formación de vapor de agua dentro de la célula, estas cavidades son generalmente llamadas microburbujas. Estas se forman por el movimiento de las moléculas de agua que causa el ultrasonido. Dependiendo de la intensidad de las ondas estas microburbujas son comprimidas a su mínimo e implotan, produciendo calor, radicales libres, una zona de alta presión y una onda de choque, dañando así la pared celular.

El ultrasonido puede ser aplicado en bajas y altas frecuencias (abajo y arriba de 50 kHz respectivamente). Las frecuencias bajas favorecen los efectos mecánicos, mientras que las frecuencias altas la formación de radicales. Una vez que se controla la frecuencia las variables principales a manejar son fuente de poder y tiempo de exposición. Para que este pretratamiento funcione, la concentración de biomasa debe ser suficientemente alta para incrementar así la probabilidad de contacto entre células, pero no tan alta como para incrementar la viscosidad. La temperatura también juega un papel importante, a menor temperatura menor presión vapor y por ende menor efectividad del pretratamiento.

El ultrasonido promueve la destrucción de la pared celular y la solubilización de la materia orgánica. Sin embargo los resultados son altamente dependientes de las especies de microalga y la cantidad de energía aplicada. La relación de energía con destrucción de

la pared celular es lineal para la mayoría de las microalgas criadas en aguas residuales (Passos et al. 2014; Lee et al. 2014).

- Microondas

Las microondas son ondas cortas de energía electromagnética que oscilan entre los 300 MHz y 300 GHz de frecuencia. Generalmente sus frecuencias se encuentran alrededor de los 2450 MHz. Estas ondas generan un aumento en la energía cinética de las moléculas, lo que las pone a vibrar y de esta forma aumenta su temperatura. La energía aplicada por irradiación de microondas no es capaz de romper los enlaces químicos, sin embargo los puentes de hidrógeno si se rompen. Debido a esto las microondas causan cambios en las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, sin embargo no en las primarias.

Similares a aquellos del ultrasonido, los principales parámetros a controlar son el tiempo de exposición y la fuente de poder. Su principal ventaja es la rápida penetración de la irradiación al núcleo de la microalga, sin embargo esto llega a un alto costo de energía directamente dependiente de la concentración de biomasa. La temperatura también puede jugar un papel clave en este pretratamiento.

Este pretratamiento arroja generalmente un aumento en la producción de biogás de alrededor de 78% en condiciones óptimas (Passos et al. 2014; Passos et al. 2013)

### **3.5.3. Pretratamientos químicos**

Los pretratamientos químicos son mucho menos usados que los mecánicos y térmicos. El más usado de los pretratamientos químicos aplicados a microalgas es el alcalino, especialmente mezclado con temperatura.

Los estudios sobre pretratamiento con medio alcalino y temperatura han arrojado resultados contradictorios, donde se ha visto que la adición del alcalino (NaOH) mejora la degradación de la célula microalgal, pero disminuye la producción de biogás.

Los pretratamientos químicos han resultado inefectivos, a comparación de los pretratamientos mecánicos y térmicos (Passos et al. 2014).

### 3.5.4. Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos consisten en la degradación de la pared celular a base de enzimas, estos pretratamientos son prometedores debido a su bajo consumo energético. Además los pretratamientos enzimáticos o biológicos, no proveen de compuestos inhibidores que perjudiquen la creación del biogás. Las enzimas descomponen muchos de los componentes de la pared celular (como la celulosa y hemicelulosa), a componentes de menor peso molecular, que son más viables para las bacterias anaerobias al momento de la digestión.

Los parámetros más importantes para estos procesos son: la dosis de enzimas, la temperatura y el tiempo de exposición. La temperatura y el pH deben estar fijos en los valores ideales para la actividad de la enzima.

Los principales problemas que tiene este tipo de tratamiento, se deben a la selección de las enzimas, que varían según la especie de microalga, ya que cada especie tiene diferente la composición de su pared celular (Passos et al. 2014).

**Tabla 4. Comparación de métodos de pretratamiento para incrementar la biodegradabilidad de la biomasa microalgal en la digestión anaerobia** (Passos et al. 2014)

Pretratamiento	Parámetros de control	Solubilización de la biomasa	Mejora en la generación de metano	Ventajas	Desventajas
Termal (<100°C)	Temperatura, tiempo de exposición	Xxx	Xx	Baja demanda energética, escalabilidad	Alto tiempo de exposición



Hidrotermal (>100°C)	Temperatura, tiempo de exposición	Xxx	Xx	Escalabilidad	Alta demanda de energía, riesgo de creación de compuestos refractarios
Termal con explosión de vapor (>100°C)	Temperatura, tiempo de exposición, presión	Xxx	Xxx	Escalabilidad	Alta demanda energética, riesgo de creación de compuestos refractarios, alto costo de inversión
Microondas	Fuente de poder, tiempo de exposición	Xx	Xx	-	Alta demanda de energía eléctrica, dificultades para escalar
Ultrasonido	Fuente de poder, tiempo de exposición	X	X	Escalabilidad	Alta demanda de energía eléctrica
Químico	Dosis de reactivos, tiempo de exposición	X	X	Baja demanda energética	Contaminación química, riesgo de formar inhibidores, costos elevados.
Termo químico	Dosis de reactivos, tiempo de exposición, temperatura	Xxx	Xx	Baja demanda energética	Contaminación química, riesgo de formar inhibidores, costos elevados.
Enzimático	Dosis de enzimas, tiempo de exposición, pH, temperatura	X	X	Baja demanda energética	Costos elevados, necesidad de mantener condiciones de esterilidad

La cantidad de X se refiere a la eficiencia del proceso, siendo X la menor y Xxx la mayor.

Para poder comparar el balance de energías totales en los diversos pretratamientos se puede tomar en cuenta la siguiente tabla.

**Tabla 5. Comparación de balances de energía para pretratamientos** (Passos et al. 2014)

Pretratamiento	Condición óptima	Concentración de SV (g/L)	Incremento en la generación de metano (L CH <sub>4</sub> /g SV)	Energía de alimentación (kJ/g SV)	Energía generada (kJ/g SV)	Comparación de energías (Eg/Ea)
Térmico	75°C ; 10h	13.5	0.120	6.50	3.87	0.59
Térmico	95°C ; 10h	13.5	0.130	7.43	4.19	0.56
Hidrotérmico	100°C ; 8h	37	0.080	2.80	2.58	0.92
Hidrotérmico	120°C ; 2h	200	0.140	0.58	4.51	7.78
Hidrotérmico	130°C ; 15min	14.6	0.050	8.30	1.61	0.19
Microondas	900W ; 3min	9.8	0.100	70.13	3.22	0.05

\*Sólo se toman en cuenta en la tabla pretratamientos en los que se han realizado balances de energía.

Para tener un mejor entendimiento del rendimiento de los pretratamiento nos sirve ver la siguiente tabla:

**Tabla 6. % de aumento de metano en diferentes pretratamientos.**

Pretratamiento	Condiciones	Incremento % de metano	Referencia
Termal	<i>Scenedesmus</i> 70-90°C por 3 h	12.2%	(González-Fernández et al. 2012)
Termal	<i>Scenedesmus</i> 70-80°C por 25 m	9.57%	(González-Fernández et al. 2012)
Termal	<i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. 50-80°C por 30m		(Cho et al. 2013)

Termal	Consorcio de microalgas 75-95°C por 10 h	67-72%	(Passos & Ferrer, 2014)
Hidrotermal	<i>Chlorella sp.</i> y <i>Scenedesmus sp.</i> 120°C por 30m	20%	(Cho et al. 2013)
Hidrotermal	Consorcio de microalgas 130°C por 15m	42%	(Passos & Ferrer, 2014)
Termal con explosión de vapor	<i>Scenedesmus</i> 170°C a 8 bars por 30m	81%	(Keymar et al., 2013)
Ultrasonido	<i>Scenedesmus</i> 100-130 MJ/kg TS	75-90%	(González-Fernández et al., 2012)
Ultrasonido	<i>Scenedesmus sp.</i> y <i>Chlorella sp.</i> 39, 117 y 234 MJ/kg VS	6%, 10% y 15%	(Cho et al. , 2013)
Microondas	Consorcio de microalgas 21.8, 43.6, 65.4 MJ/kg TS	12-78%	(Passos et al. , 2014)

### 3.6. Ozoflotación

La ozoflotación es la combinación de las propiedades oxidantes del ozono con el proceso de flotación para la remoción de partículas suspendidas en agua. A través de la ozoflotación se busca separar la biomasa microalgal del agua debido a que en el proceso se obtiene la disminución del potencial zeta de las partículas, incluidas las microalgas, favoreciendo la formación de aglomerados de células al momento de la cosecha. Por

otra parte, al utilizar ozono como gas de dispersión, éste produce lisis en la membrana de las microalgas, dando lugar a la liberación de biopolímeros que funcionan como coagulantes, y de igual forma la lisis de la membrana se puede utilizar como un pretratamiento para etapas posteriores. En este trabajo se midió la efectividad de este proceso como pretratamiento para la obtención de biogás (Cheng et al. 2010).

El ozono al ser un oxidante provoca la lisis de diferentes algas, teniendo como consecuencia la liberación de biopolímeros presentes en las microalgas, por ejemplo ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos. El ozono actúa en la liberación de coagulantes orgánicos naturales, y disminuye el efecto de los biopolímeros que algunas especies de algas excretan de forma natural que pueden afectar la coagulación (Langlais et al. 1991).

Estudios anteriores demostraron que el ozono produce cambios en las propiedades de las proteínas, como en el caso del espumado, en el cual se ve afectado el volumen y la estabilidad de la burbuja formada por la proteína (Uzun et al. 2012).

La oxidación de aminoácidos puede inducir en un aumento de la flexibilidad o rigidez de la cadena proteínica, causando alteraciones en la estructura secundaria y terciaria de la proteína; por otra parte, la capacidad de formación de espuma depende de la adsorción rápida en la interface aire-agua (Cataldo, 2003).

Aunque todos los aminoácidos son objetivos para la oxidación, los más sensibles de ser oxidados son tirosina, triptófano, y el azufre que contienen los aminoácidos cisteína y metionina, además de los ácidos alifáticos de arginina, lisina, fenilalanina e histidina (Uzun et al. 2012).

### **3.7. Energía a partir de microalgas**

La conversión de energía a partir de biomasa puede ser clasificada en tres formas: 1) conversión bioquímica, 2) conversión termoquímica, y 3) combustión directa. Sin embargo debido a que las microalgas poseen un muy alto contenido de agua (80–90%),

la combustión directa no tendría sentido para la biomasa microalgal ya que gran parte de la energía empleada se perdería en evaporar el agua. Pero esta alta cantidad de agua la vuelve una excelente candidata para los procesos bioquímicos. En la figura 1 se muestra los caminos para conversión de energía a partir de microalgas (Amin 2009).

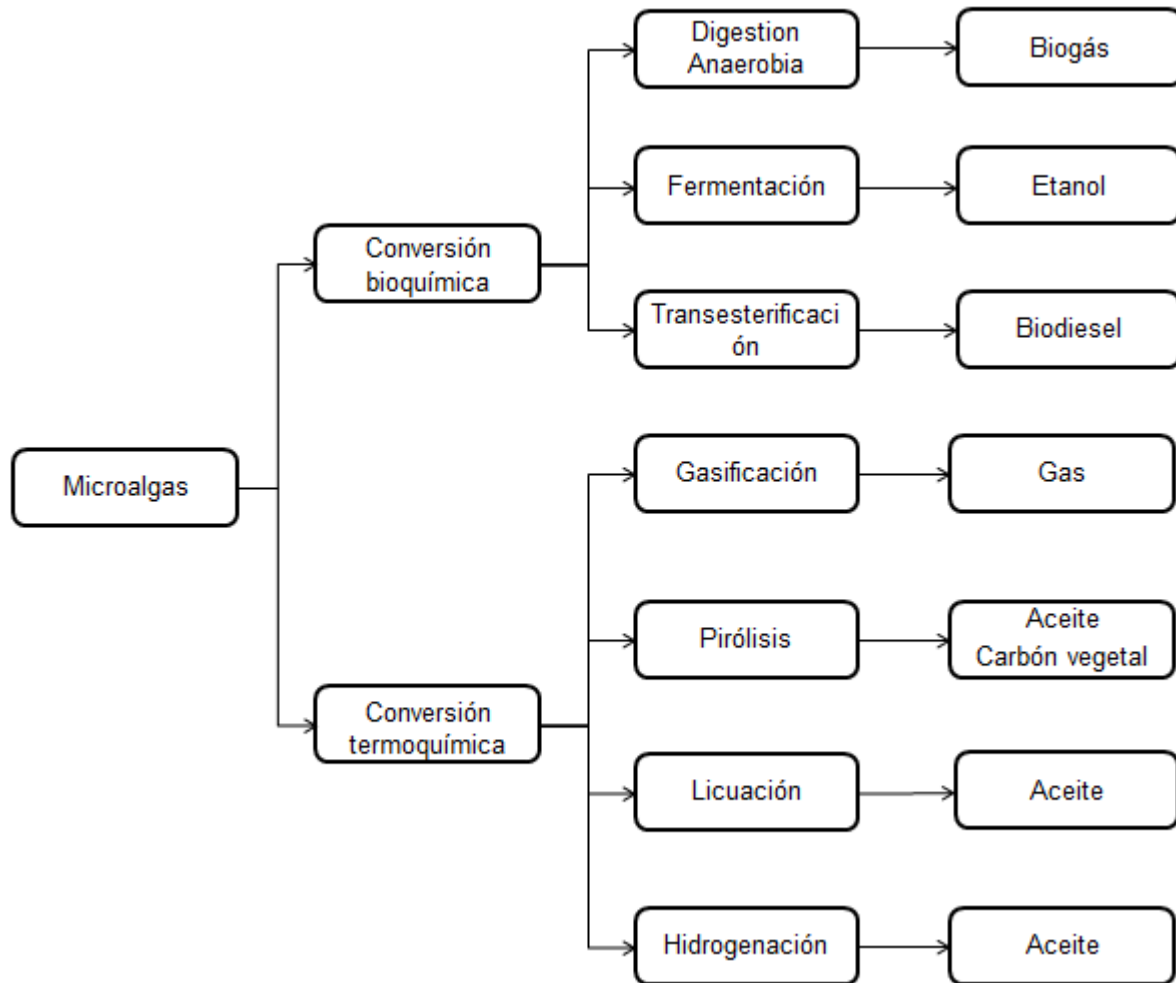


Figura 3. Conversión de energía a partir de microalgas (Amin, 2009; Brennan & Owende, 2010)

Para generar energía, principalmente biogás y biodiesel, a partir de microalgas es importante analizar, entre otras cosas, el contenido lipídico de las diferentes especies de microalgas. Para esto es útil la siguiente tabla.

Tabla 7. Contenido lipídico en diferentes especies de microalgas (Maity et al. 2014)

Especie de microalga	Tipo de microalga	Contenido lipídico en % de masa seca
<i>Arthrospira maxima</i>	Verde azul	20.34
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	Verde	24 – 31
<i>Botryococcus braunii</i>	Verde	25 – 75
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Diatomea	33.6
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Diatomea	14.6 – 39.8
<i>Chlorella emersonii</i>	Verde	25 – 63
<i>Chlorella minutissima</i>	Verde	57
<i>Chlorella protothecoides</i>	Verde	14.6 – 57.8
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Verde	19 – 22
<i>Chlorella vulgaris</i>	Verde	5 – 58
<i>Chlorella sp.</i>	Verde	10 – 48
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Verde	11 – 26
<i>Chlorococcum sp.</i>	Verde	19.3
<i>Cylindrotheca sp.</i>	Diatomea	16 – 37
<i>Crptheodinium cohnii</i>	Roja	20 – 51
<i>Dunaliella salina</i>	Verde	16 – 44
<i>Dunaliella primolecta</i>	Verde	23
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Verde	16.7 – 71
<i>Ellipsoidion sp.</i>	<i>Eustigmatophytes</i>	27.4
<i>Euglena gracilis</i>	Verde	14 – 20
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Rojo sangre	15.6 – 33
<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Prymnesiophytes</i>	7 – 40
<i>Isochrysis sp.</i>	<i>Prymnesiophytes</i>	7.1 – 33
<i>Monodus subterraneus</i>	<i>Eustigmatophytes</i>	16.1
<i>Monallanthus salina</i>	Verde	20 – 22
<i>Nannochloris sp.</i>	Verde	20 – 56

<i>Nannochloropsis oculata</i>	Verde	22.7 – 29.7
<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Eustigmatophytes</i>	12 – 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Verde	29 – 65
<i>Nitzschia sp.</i>	Diatomea	16 – 47
<i>Oocystis pusilla</i>	Verde	10.5
<i>Pavlova salina</i>	<i>Prymnesiophytes</i>	30.9
<i>Pavlova lutheri</i>	<i>Prymnesiophytes</i>	35.5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomea	18 – 57
<i>Porphyridium cruentum</i>	Roja	9 – 60.7
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Verde	6 – 40
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Verde	11 – 55
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Verde	1.9 – 18.4
<i>Schizochytrium sp.</i>	Verde amarilla	50 – 57
<i>Scenedesmus sp.</i>	Verde	19.6 – 21.1
<i>Skeletonema sp.</i>	Diatomea	13.3 – 31.8
<i>Skeletonema costatum</i>	Diatomea	13.5 – 51.3
<i>Spirulina platensis</i>	Verde	10.3
<i>Spirulina maxima</i>	Verde	4 – 9
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Diatomea	20.6
<i>Tetraselmis suecica</i>	Verde	8.5 – 23
<i>Tetraselmis sp.</i>	Verde	12.6 – 14.7

Existen diferentes formas de biocombustibles que se han sintetizado a partir de microalgas.

El biodiesel parece ser la meta de la mayoría por su factibilidad para reemplazar a la gasolina actual. Este biocombustible se sintetiza a partir de los lípidos contenidos en la microalga, para lo cual es necesario realizar una extracción de lípidos de la biomasa microalgal y realizar una transesterificación para crear el biodiesel. El principal problema

que viene con la síntesis del biodiesel es el bajo rendimiento energético que provee su creación (Halim et al. 2012)

Los bioalcoholes son otra forma de biocombustibles que han llamado su atención, especialmente porque no son a partir de los lípidos, sino que utilizan los carbohidratos para su generación.

El otro gran biocombustible que se ha planteado crear a partir de biomasa microalgal es el biogás. De este biocombustible se hablará a continuación.

Sin embargo se ha visto que el proceso óptimo desde el punto de vista económico como ambiental consiste en mezclar procesos, en una biorefinería, para así solventar los grandes costos de cultivo, cosecha y pretratamiento (Collet et al. 2011; Li et al. 2015; Posten and Schaub 2009).

Para lograr implementar el concepto de biorefinería aún quedan muchos caminos que investigar (Razon and Tan 2011). Algunos de estos caminos pueden ser, la generación de biogás post extracción de lípidos, así como técnicas de pretratamiento y cosecha, más económicas, que mejoren el balance energético.

### **3.8. Biogás**

El biogás es el producto de la digestión anaerobia de materia orgánica. Esta digestión involucra una serie de reacciones como lo son: hidrólisis, acidificación, acetogénesis y metanogénesis. Estas reacciones se llevan a cabo gracias a la acción de distintos grupos de bacterias. El primer grupo de microorganismos contienen enzimas que hidrolizan compuestos orgánicos complejos a sus monómeros (glucosa, aminoácidos, etc.). Después estos monómeros son transformados en ácidos grasos volátiles, hidrógeno y ácido acético. Luego las bacterias acetogénicas transforman los ácidos grasos volátiles en hidrógeno, dióxido de carbono y ácido acético. Al final las bacterias metanogénicas convierten estos compuestos en metano y dióxido de carbono (Harun et al. 2011).



**Tabla 8. Composición de biogás generado por digestión anaerobia** (Kwietniewska and Tys 2014)

Compuesto	Concentración en el biogás (%)
Dióxido de carbono	25 – 50
Metano	50 – 75
Agua	6 – 6.5
Oxígeno	0.9 – 1.1
Nitrógeno	3.9 – 4.1
Hidrógeno	
Sulfuro de Hidrógeno	<0.1 – 0.8
Amoniaco	<0.1 – 1
Mercaptano	En esporas
Ácidos grasos de bajo peso molecular	
Substancias moleculares	Trazas

Un parámetro muy importante a medir para evaluar la calidad de un biogás que se genera para implementar como fuente de energía es su concentración porcentual de metano. Un biogás con una alta concentración de metano será un biogás que nos genere una alta cantidad de energía.

### **3.9. Biogás a partir de microalgas**

El potencial de biometano en microalgas depende principalmente de los compuestos presentes en ellas (carbohidratos, lípidos y proteínas), lo cual depende directamente de las condiciones de crecimiento y la especie de microalga. Entre mayor cantidad de lípidos se encuentren en la microalga mayor será su potencial de biometano, sin embargo esto aumentará el tiempo de obtención del biogás. Existen pocos trabajos realizados para la generación de biogás en microalgas después de la extracción de lípidos, lo cual nos daría una interesante forma de solventar el poco rendimiento energético que resulta de la creación de biodiesel a partir de microalgas (Alzate, et al., 2014).

Los ensayos realizados hasta ahora han mostrado productividades bajas en la generación de metano a partir de digestión anaerobia de microalgas, en comparación de la producción que se da si se utiliza otro sustrato como residuos sólidos municipales o residuos orgánicos (Heaven et al. 2011). Esto se atribuye principalmente a la resistencia de la pared celular de las microalgas, para esto es necesario usar pretratamientos que nos ayuden a destruirla.

Un factor a tomar en cuenta al realizar ensayos de digestión anaerobia de microalgas es el S/I sustrato contra inóculo. Este factor puede determinar la cantidad de biogás generado al final del proceso (Zhao et al. 2014).

La concentración del sustrato en el ensayo de PBM (Potencial Bioquímico de Metano) impacta en la biodegradabilidad del sustrato y debido a esto en la producción de metano. La presentación del sustrato también es un factor a considerar, pues una cantidad excesiva de sólidos en él hace que el mezclado sea más difícil y puede generar inhibición por acumulación de ácidos grasos. Por la otra parte, una concentración baja de sustrato aumenta el consumo de energía ya que requiere una temperatura mayor para ser consumido con efectividad y requiere también de un volumen mayor de reactor para evitar la pérdida de inóculos. También la cantidad de sustrato juega un papel muy importante en la concentración de metano en el biogás (Alzate et al. 2012).

Un gran problema en la digestión anaerobia de microalgas para generación de biogás, es la generación de amoníaco, el cual es tóxico para las bacterias metanogénicas y por ello inhibe la generación del metano. La relación C:N (carbono/nitrógeno) promedio de las microalgas es de 10.5, habiendo especies que llegan a tener relaciones de 5.9 (Ramos-Suárez and Carreras 2014), sin embargo la relación ideal para una digestión anaerobia es de 20 a 30, lo cual es un problema a tratar al intentar generar biogás en buenas cantidades. Para corregir esto existen autores que han realizado ensayos para evaluar la generación de biogás post extracción de proteínas (Ramos-suárez et al. 2014).

Otro parámetro importante a tomar en cuenta al llevar a cabo una digestión anaerobia es la temperatura, El incremento de temperatura de 15 a 52°C, mejora la conversión a metano de *Spirulina maxima*, y en general una temperatura de 35°C mejora el proceso.

Se ha encontrado como temperatura óptima la de 40°C, ya que a pesar de que a mayor temperatura el proceso mejora en cuanto a producción de metano, el balance de energía ya no es el mejor debido a la energía empleada en aumentar la temperatura.

El tiempo de retención hidráulica y de retención de sólidos, son también, parámetros de mucha importancia al momento de llevar a cabo la digestión anaerobia. Se deben calcular los intervalos en los que se puede llevar a cabo el proceso de manera exitosa y de ahí analizar la interacción de uno con otro para mejorar la generación de metano. Según estudios anteriores se ha notado que tomando el máximo óptimo de tiempo de retención hidráulica y el mínimo óptimo de tiempo de retención de sólidos, se dan los mejores resultados de generación de metano.

La calidad del biogás producido a partir de la biomasa microalgal, generalmente se encuentra en los rangos de 69 a 75% metano. Sin embargo es importante siempre llevar a cabo las mediciones de dicha calidad, ya que un biogás bajo en metano genera menor energía que uno alto en dicho compuesto.

Otro factor a considerar en el proceso es la toxicidad del sodio, el cual es requerido para llevar a cabo la digestión correctamente en rangos de 0.002 a 0.004M, pero si está en concentraciones mayores a 0.14M se vuelve altamente tóxico para las bacterias metanogénicas (Heaven et al. 2011)

## 4. Metodología

Para el caso de investigación se eligió trabajar con la especie *Scenedesmus sp.* El motivo de esta selección es debido a 2 factores principales:

1. La especie *Scenedesmus sp.* presenta una pared celular resistente frente a la digestión anaerobia, lo cual la vuelve una especie que ha sido difícil de trabajar con digestión anaerobia si no es pretratada antes de digerir. Al evaluar el efecto de la ozoflotación como pretratamiento, tenemos como objetivo vislumbrar que tan eficaz es su poder de oxidación para hidrolizar la pared celular y con este motivo es importante elegir una especie de microalga que presente una pared celular que presente una mala digestión sin pretratamiento (Mussgnug et al. 2010).
2. La especie *Scenedesmus sp.* se reproduce fácilmente utilizando únicamente agua residual como fuente de nutrientes. Esto es una característica deseable tanto por el ahorro de energía como por el objetivo de la investigación.

En el tercer ensayo se cambió la especie a *Desmodesmus sp.* esto debido a problemas de proliferación de otras especies en los cultivos de *Scenedesmus sp.* Las características de esta especie son muy similares a las de la especie *Scenedesmus sp.* por lo que no se necesitaron realizar cambios a la metodología del tercer ensayo.

### 4.1. Cultivo de microalgas

Las microalgas se cultivaron en Botes de 10 litros transparentes de PET, con agitación manual y lámparas de luz blanca como fuente de luz. Se les añadió agua residual (Komolafe et al. 2014), en dos etapas, 4.5 litros al montar el cultivo y 4.5 litros diez días después.

Los cultivos se mantuvieron por lo menos tres semanas para llegar a la concentración de biomasa esperada de 500 mg/l. Se notó que después de la tercera semana el crecimiento de biomasa se reducía considerablemente.

Al final del cultivo se realizó una observación en microscopio para poder determinar el % de *Scenedesmus sp.* ya que al ser alimentadas con agua residual es prácticamente imposible evitar la existencia de otro tipo de microalgas, especialmente cianobacterias. Esta concentración fue mayor al 90% en los cultivos que se utilizaron para las pruebas.

#### 4.2. Recolección de lodos

Para la recolección de lodos se fabricó un nucleador utilizando una botella de refresco retornable, debido a su resistencia, esta se partió a la mitad con un cuchillo caliente y se le realizaron pequeños orificios en la parte de abajo para poder así drenar una parte del agua contenida en los lodos. La botella se atornillo a una madera larga para así tener acceso a las zonas alejadas o profundas.

Los lodos fueron recolectados de las lagunas facultativas del lago de Texcoco. Se recolectaron en exceso.



Ilustración 1 Laguna facultativa del lago de Texcoco



Ilustración 2. Lodos anaerobios recolectados

Los lodos utilizados en el tercer ensayo fueron donados por la Cervecería Modelo y provenían de su reactor anaerobio para el tratamiento de sus aguas residuales. Este cambio se realizó para comprobar si eran los lodos el factor por el que los ensayos estaban arrojando datos no cuantificables de metano.

### 4.3. Preparación de muestras

Las muestras preparadas fueron seis diferentes:

- Dos controles, uno de únicamente microalgas y otro de únicamente lodos.
- Un blanco, que no recibe pretratamiento.
- Una muestra que se cosecho por sedimentación y se le aplico un pretratamiento hidrotermal, a 121°C por dos horas. Esta muestra se utilizará para comparar el pretratamiento hidrotermal con el de ozoflotación. \*
- Una muestra la cual se cosecho y pretrató por ozoflotación.
- Y por último una muestra a la que se cosecho y pretrató por ozoflotación y después se procedió a extraer los lípidos. Esta muestra utilizó para poder cumplir con el tercer objetivo específico.

\* Esta muestra fue omitida para el tercer ensayo debido a la poca cantidad de biomasa que se tenía en ese momento.

### 4.4. Ozoflotación

Las pruebas de oxidación se llevaron a cabo utilizando el arreglo experimental que se presenta en la siguiente figura, conformado por un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA) con capacidad de producción de 1.9 gO<sub>3</sub>/h, el cual utiliza aire enriquecido con oxígeno como gas de alimentación abastecido por un separador de aire (Airseo modelo AS-12, USA), un contactor gas-líquido, un analizador de ozono gas (Teledyne Instruments, USA) y una unidad de destrucción catalítica de ozono (Ozone & Control Systems INC, USA) (Valeriano G. M., 2013).

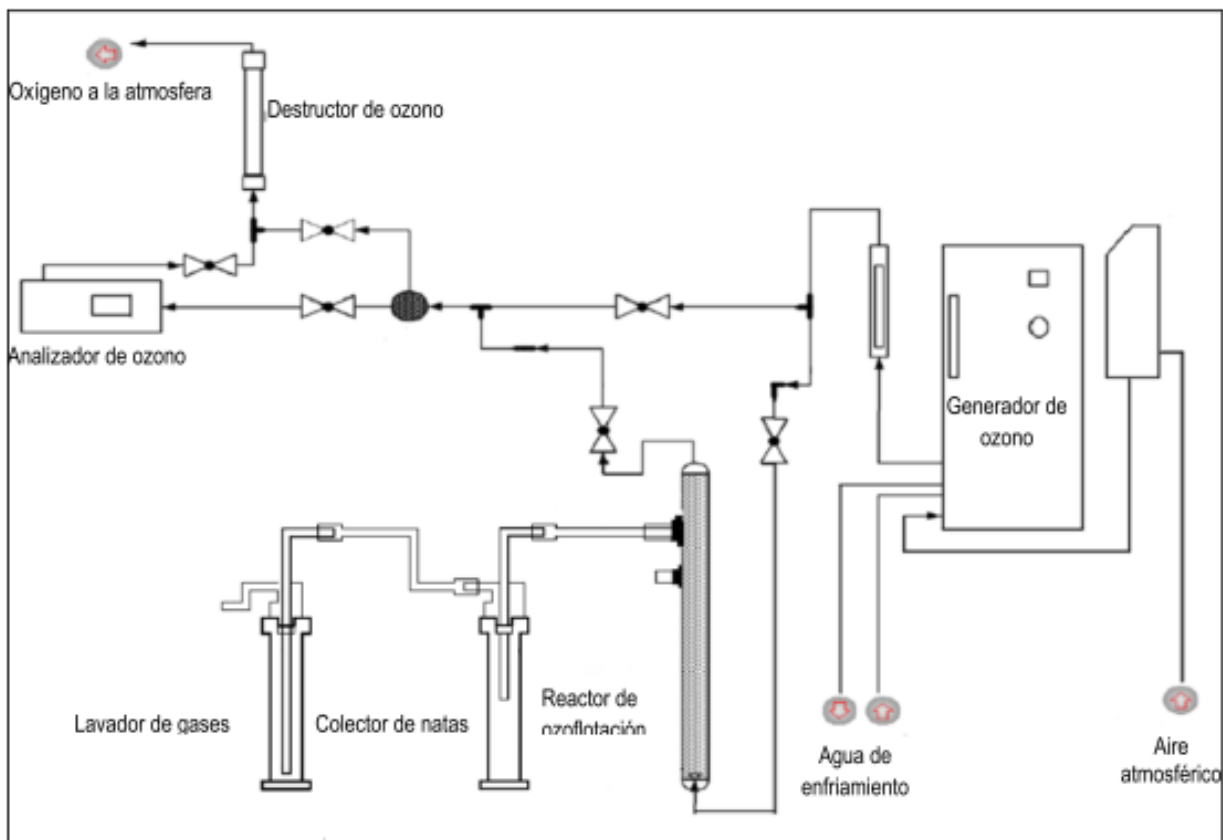


Figura 4. Componentes de la unidad de oxidación por ozono (Valeriano G. M., 2013)

La DAO (Dosis Aplicada de Ozono) aplicada fue de aproximadamente 10 mg/L.

El tiempo de ozoflotación fue de 12 minutos por corrida.



Ilustración 3. Columna de ozoflotación



Ilustración 4. Ozoflotación de microalgas

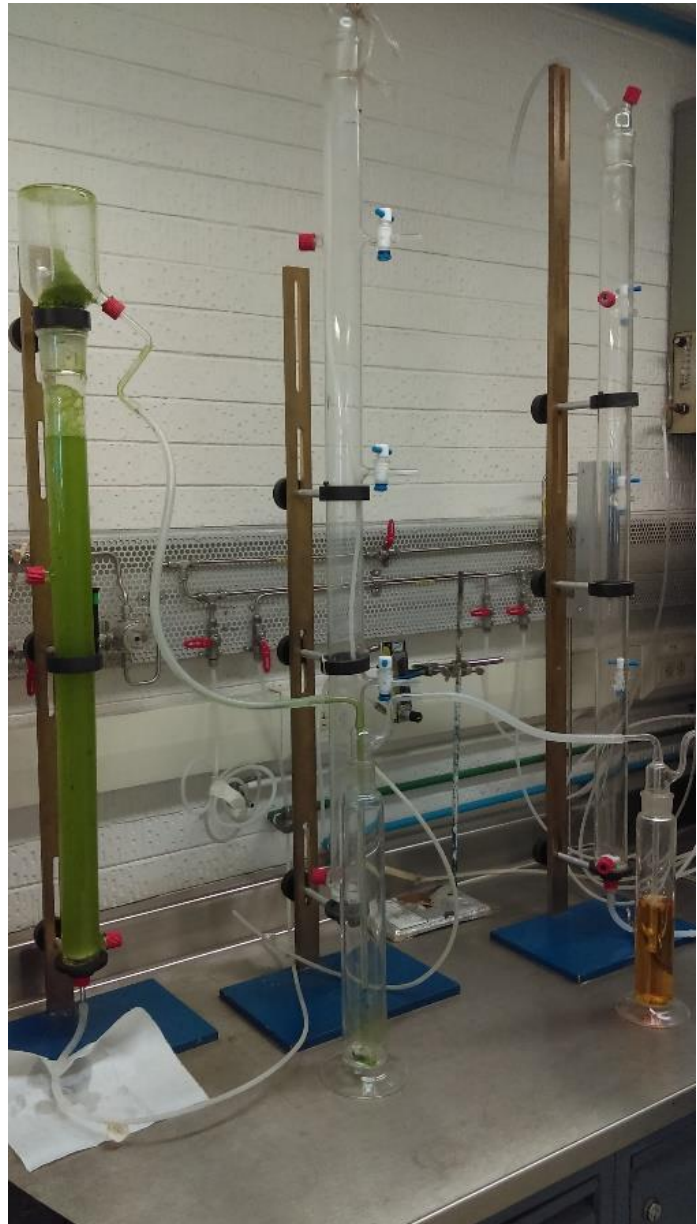


Ilustración 5. Arreglo del sistema de ozoflotación

#### 4.5. Extracción de lípidos



Para la extracción de los ácidos grasos, los solventes seleccionados fueron una mezcla de metanol: cloroformo (1:2, v/v). Durante la extracción, la biomasa es expuesta a una mezcla de disolventes que extraen los lípidos de las matrices celulares. Para ello fue necesario acondicionar la biomasa microalgal: se sometió la biomasa a centrifugación a 6,000 rpm (12min) hasta obtener un precipitado verde, el cual se colocó en una placa de vidrio para el proceso de deshidratación.

El concentrado de biomasa fue deshidratado en una estufa durante 8 horas a una temperatura de 50°C, posteriormente se retiró la biomasa seca y el polvo de biomasa se reservó hasta su utilización para el proceso de extracción.

La extracción de los ácidos grasos, se llevó a cabo colocando la biomasa en un matraz Erlenmeyer de 500 ml (perfectamente limpio y enjuagado con metanol), al cual se le añaden 20 ml de cloroformo y 10 ml de metanol, por gramo de biomasa, el matraz se selló con papel parafilm y se colocó en un agitador orbital durante 24 h a 140 rpm.

Después de esto, se procedió a filtrar, para separar la biomasa residual del líquido en el que están presentes los ácidos grasos. Se retiró el precipitado (biomasa residual), para su utilización en las pruebas siguientes (Halim et al., 2012).



**Ilustración 6. Biomasa ozoflotada residual después de extracción de lípidos**

#### **4.6. Pretratamiento hidrotermal**

Es un pretratamiento que provoca la lisis celular de las microalgas utilizando vapor de agua a altas temperaturas. Para esto es necesario aumentar la presión. En este caso se utilizó una temperatura de 121°C por dos horas, esto basado en literatura.

#### **4.7. Digestión anaerobia**

Para la digestión anaerobia se utilizó una relación biomasa/inóculo de 1:2. Se realizó en matraces cerrados y se mantuvo a una temperatura de 37°C. La cuantificación del gas producido se realizó con el método de probeta invertida, en el que el desplazamiento del líquido por gas es nuestra medición de biogás producido. A este biogás se le midió la concentración de CH<sub>4</sub>, esta medición se realizó con cromatografía de gases, utilizando una curva de calibración para poder cuantificar.

Para mantener la temperatura los reactores se mantuvieron dentro de la cámara caliente que tiene el edificio 5 del Instituto de Ingeniería, la cual se mantiene a una temperatura de 37°C.

Para el diseño de los reactores se utilizan matraces Erlenmeyer de 50ml cerrados conectados a mangueras las cuales terminan en una probeta de 10ml invertida que se encuentra en un cubo con agua, el desplazamiento de agua para alojar el gas nos dará la medida del biogás generado.

Las pruebas se realizaron por triplicado para asegurar resultados más confiables.



**Ilustración 7. Reactores para digestión anaerobia**

#### **4.8. Parámetros a medir**

Para poder analizar los resultados será muy importante medir los siguientes parámetros a todas las muestras:

El primer parámetro a medir será la cantidad de biogás que se genera. Debido a que el objetivo de la tesis es determinar si el método de ozoflotación sirve como un buen pretratamiento para la generación de biogás a partir de biomasa microalgal, este es el parámetro de mayor importancia. Los resultados de las prácticas se basan principalmente en las cantidades de biogás que se generaron en cada uno de los reactores.

El segundo parámetro fue la calidad del biogás. Es importante saber el porcentaje de metano que se obtiene en el biogás ya que de éste dependerá la cantidad de energía

que se puede obtener a partir de dicho biogás. Para medir este parámetro se utilizó un equipo de cromatografía de gases.

#### 4.9. Esquema del proceso

El esquema completo del proceso realizado es el siguiente:

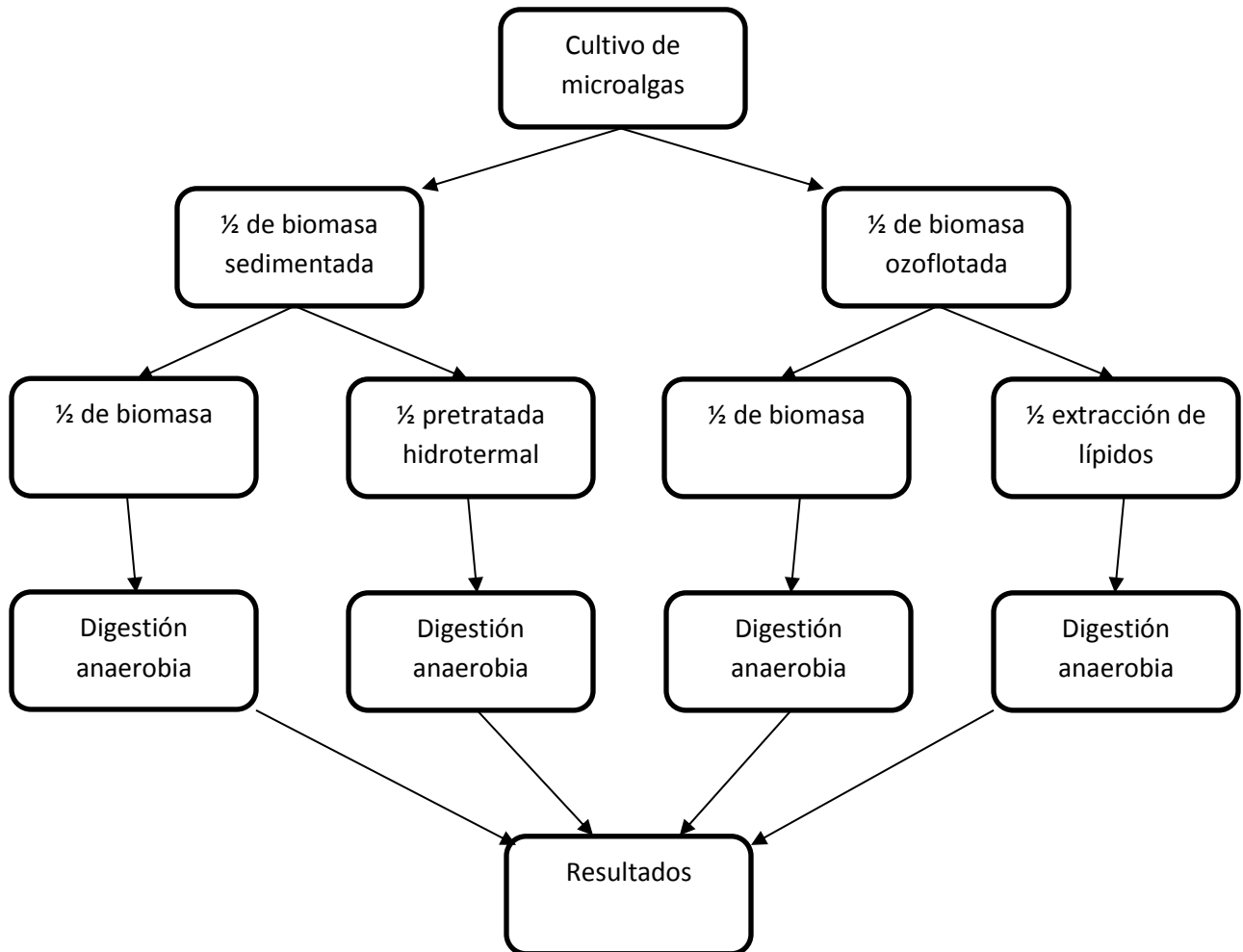


Figura 6. Esquema del proceso completo

#### **4.10. Diseño de experimento**

El experimento se llevó a cabo en un diseño de bloques aleatorios, ya que sólo se busca el efecto de una variable, en este caso el tipo de biomasa en la cantidad de biogás generado.

# 5. Resultados y análisis

## 5.1. Curvas de crecimiento

Se realizaron las curvas de crecimiento, midiendo sólidos solubles totales, y el cálculo de crecimiento promedio por día en duplicado. Las gráficas obtenidas fueran las siguientes:

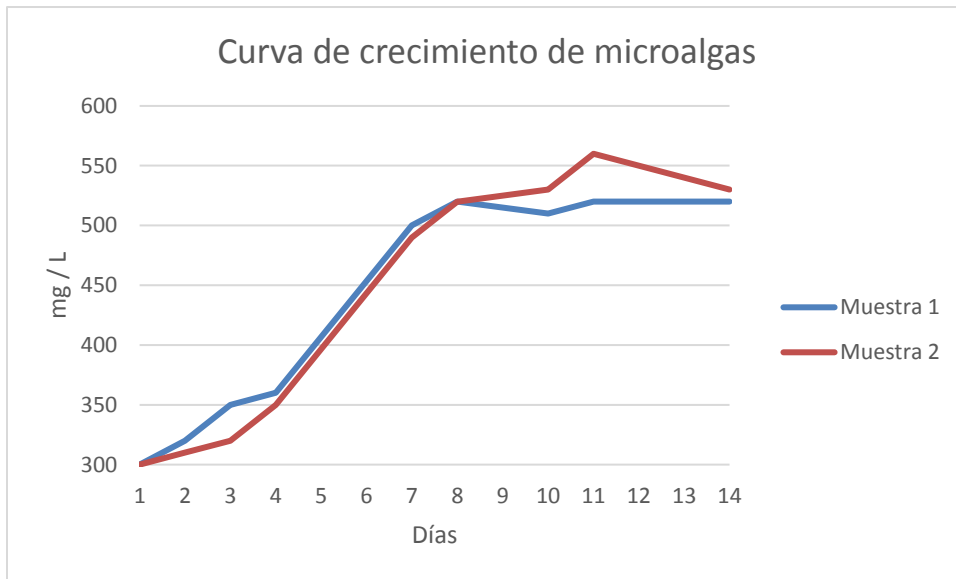


Figura 7. Curva de Crecimiento de microalgas

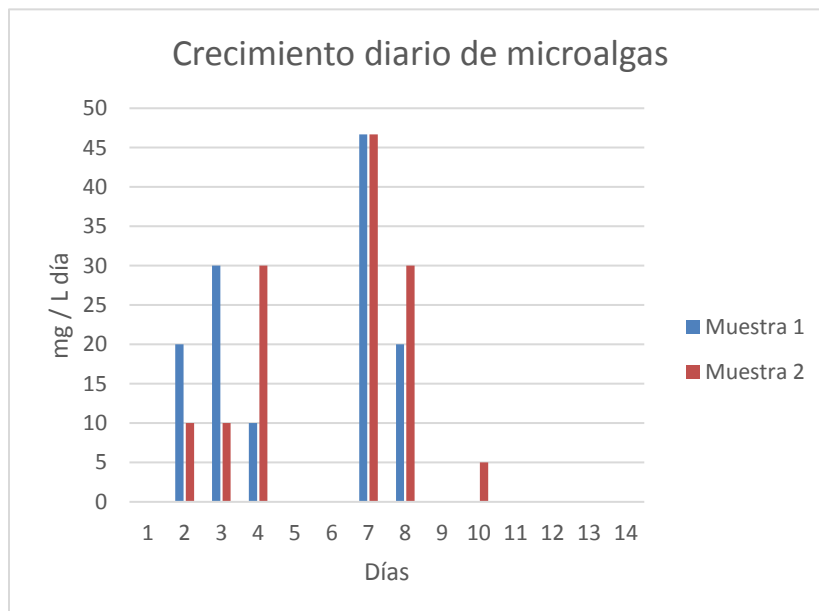


Figura 8. Crecimiento diario de microalgas

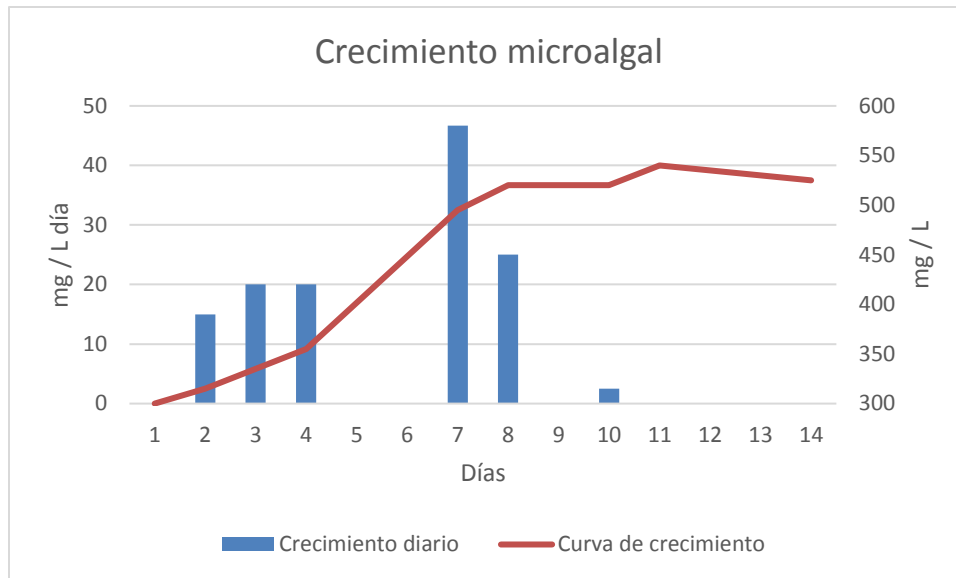


Figura 9. Crecimiento microalgal

## 5.2. Determinación de porcentaje de SV para las muestras e inóculo

Se determinó el porcentaje de sólidos volátiles (SV) para las muestras. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 9. Porcentaje de sólidos volátiles por muestra para los ensayos 1 y 2.

Muestra	ST (g/g)	ST (g/ml)	SV (g/g)	SV (g/ml)	%SV	%Humedad
Lodos	2.4878	---	0.4260	---	17.1236	66.4106
Cruda	---	0.0129	---	0.0085	65.8915	---
Con pretratamiento termal	---	0.0179	---	0.0097	54.1899	---
Con ozoflotación	---	0.0135	---	0.0108	80.0000	---
Con ozoflotación y extracción de lípidos	0.2647	---	0.2226	---	84.0952	41.9518

Tabla 10. Porcentaje de sólidos volátiles para el ensayo 3.

Muestra	ST (g/g)	ST (g/ml)	SV (g/g)	SV (g/ml)	%SV	%Humedad
Lodos	346.8000		220.9000		63.6967	65.30%
Cruda	---	0.0446	---	0.0378	84.7534	---
Con ozoflotación	---	0.0542	---	0.0427	78.7823	---
Con ozoflotación y extracción de lípidos	0.0317	---	0.0247	---	77.9180	---

### 5.3. Determinación de ST para las muestras que fueron concentradas

Algunas muestras se tuvieron que concentrar, después de esto se midieron sus sólidos totales (ST) para poder realizar los cálculos para el montaje de los reactores, los resultados fueron los siguientes:

Tabla 11. Determinación de sólidos totales en muestras concentradas

Muestra	ST (g/ml)
Cruda	0.0380
Con pretratamiento hidrotermal	0.0241
Con ozoflotación	0.0510



Ilustración 8. Biomasa ozoflotada concentrada

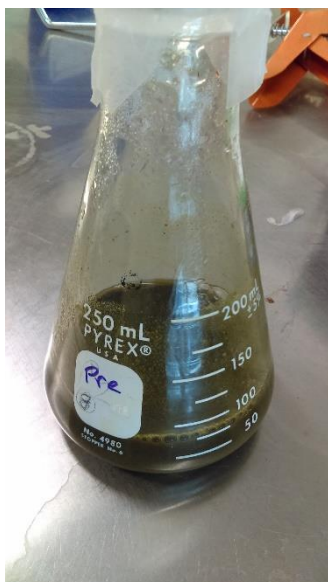


Ilustración 10. Biomasa con pretratamiento hidrotermal concentrada

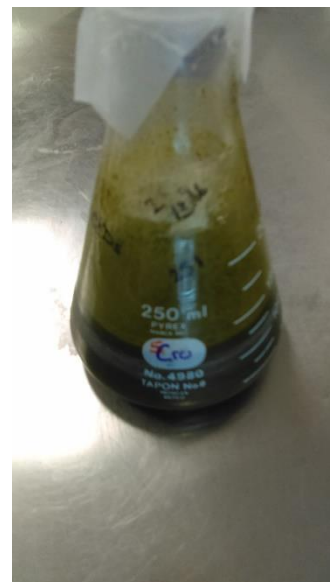


Ilustración 9. Biomasa cruda concentrada



#### 5.4. Cálculos finales para montaje de reactores

Se realizaron los cálculos finales para la cantidad de lodos y biomasa a agregar en los reactores. Estos cálculos se realizaron tomando en cuenta los sólidos totales (ST) y los sólidos volátiles (SV) calculados para cada muestra:

Tabla 12. Cálculos finales para montaje de reactores en ensayos 1 y 2.

Reactor	Nombre	Cantidad de Lodos (g)	Tipo de biomasa	Cantidad de Biomasa
1	Control de lodos	17.3861	---	---
2	Control de lodos	17.3861	---	---
3	Control de lodos	17.3861	---	---
4	Control de biomasa	---	Cruda	20 ml
5	Control de biomasa	---	Cruda	20 ml
6	Control de biomasa	---	Cruda	20 ml
7	Blanco	17.3861	Cruda	20 ml
8	Blanco	17.3861	Cruda	20 ml
9	Blanco	17.3861	Cruda	20 ml
10	Comparativo	17.3861	Con pretratamiento hidrotermal	38 ml
11	Comparativo	17.3861	Con pretratamiento hidrotermal	38 ml
12	Comparativo	17.3861	Con pretratamiento hidrotermal	38 ml
13	Con ozoflotación	17.3861	Ozoflotada	12 ml
14	Con ozoflotación	17.3861	Ozoflotada	12 ml
15	Con ozoflotación	17.3861	Ozoflotada	12 ml
16	Con extracción de lípidos	17.3861	Ozoflotada y con extracción de lípidos	1.0248 g
17	Con extracción de lípidos	17.3861	Ozoflotada y con extracción de lípidos	1.0248 g
18	Con extracción de lípidos	17.3861	Ozoflotada y con extracción de lípidos	1.0248 g

Tabla 13. Cálculos finales para montaje de reactores en ensayo 3.

Reactor	Nombre	Cantidad de Lodos (g)	Tipo de biomasa	Cantidad de Biomasa
1	Control de lodos	17.3861	---	---
2	Control de lodos	17.3861	---	---
3	Control de lodos	17.3861	---	---
4	Control de biomasa	---	Cruda	39.6912 ml
5	Control de biomasa	---	Cruda	39.6912 ml
6	Control de biomasa	---	Cruda	39.6912 ml
7	Blanco	17.3861	Cruda	39.6912 ml
8	Blanco	17.3861	Cruda	39.6912 ml
9	Blanco	17.3861	Cruda	39.6912 ml
10	Blanco	17.3861	Cruda	39.6912 ml
11	Con ozoflotación	17.3861	Ozoflotada	35.1292 ml
12	Con ozoflotación	17.3861	Ozoflotada	35.1292 ml
13	Con ozoflotación	17.3861	Ozoflotada	35.1292 ml
14	Con ozoflotación	17.3861	Ozoflotada	35.1292 ml
15	Con extracción de lípidos	17.3861	Ozoflotada y con extracción de lípidos	2.4042g
16	Con extracción de lípidos	17.3861	Ozoflotada y con extracción de lípidos	2.4042g

## 5.5. Generación de biogás

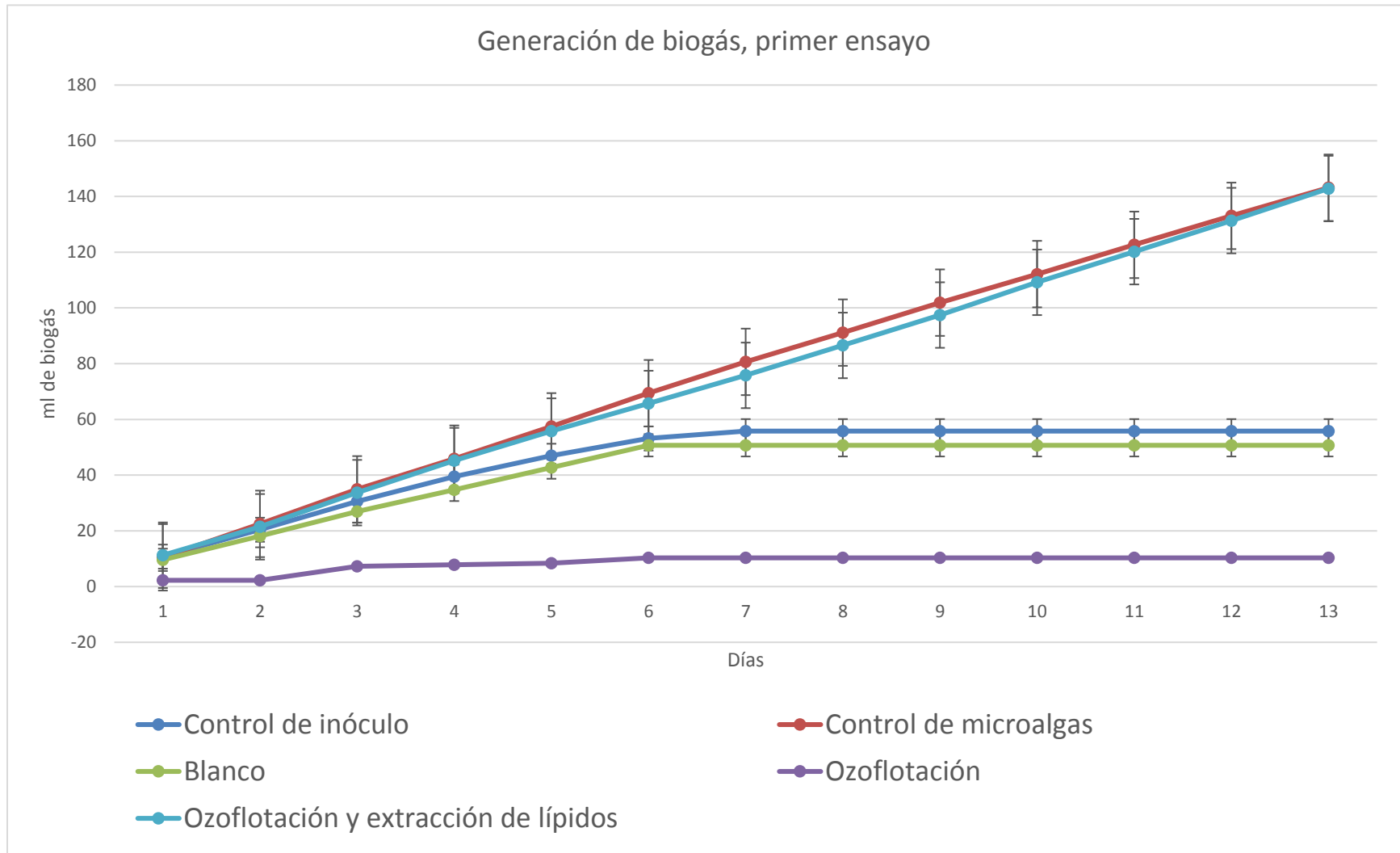


Figura 10. Generación de biogás, primer ensayo.

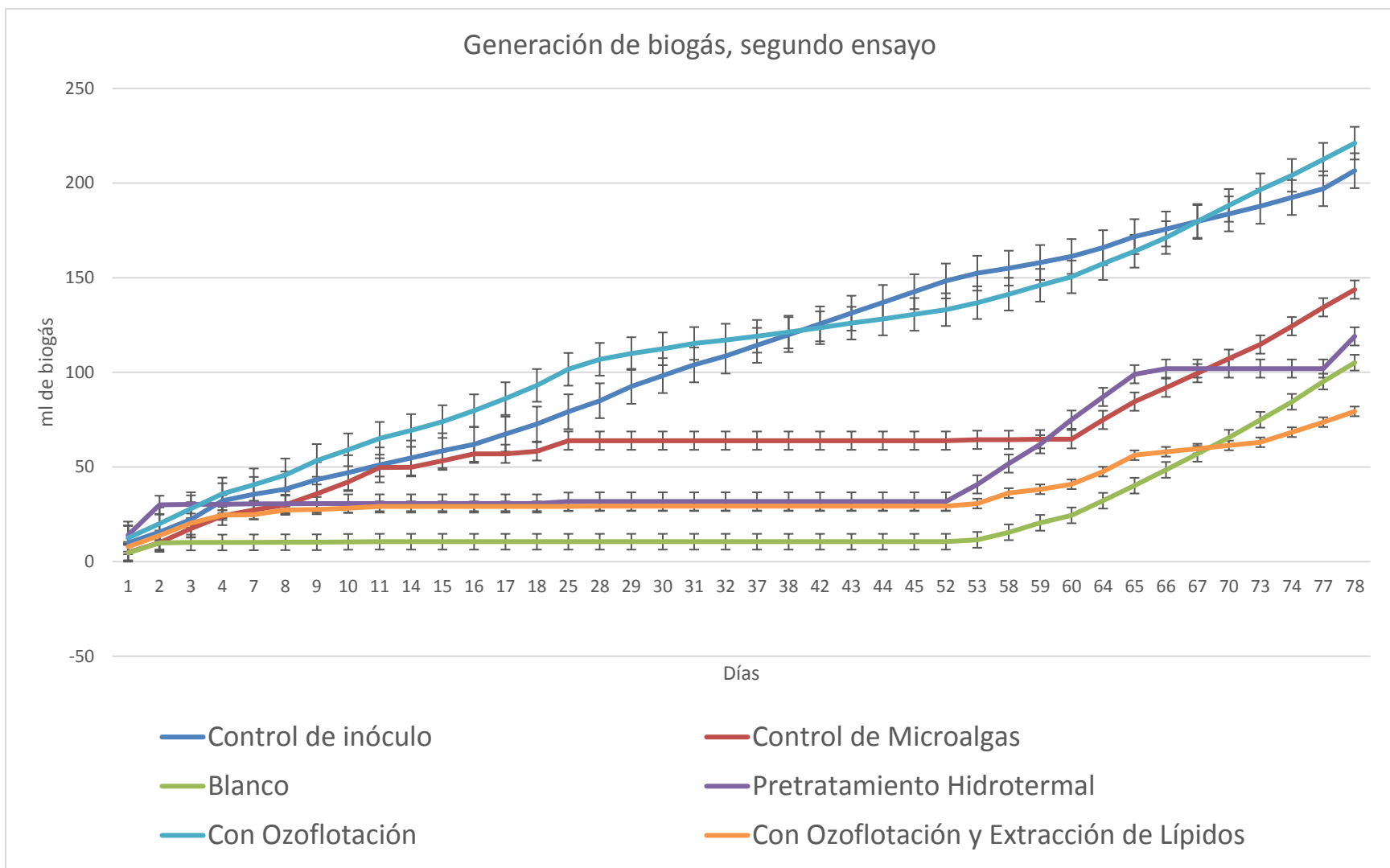


Figura 11. Generación de biogás en segundo ensayo.

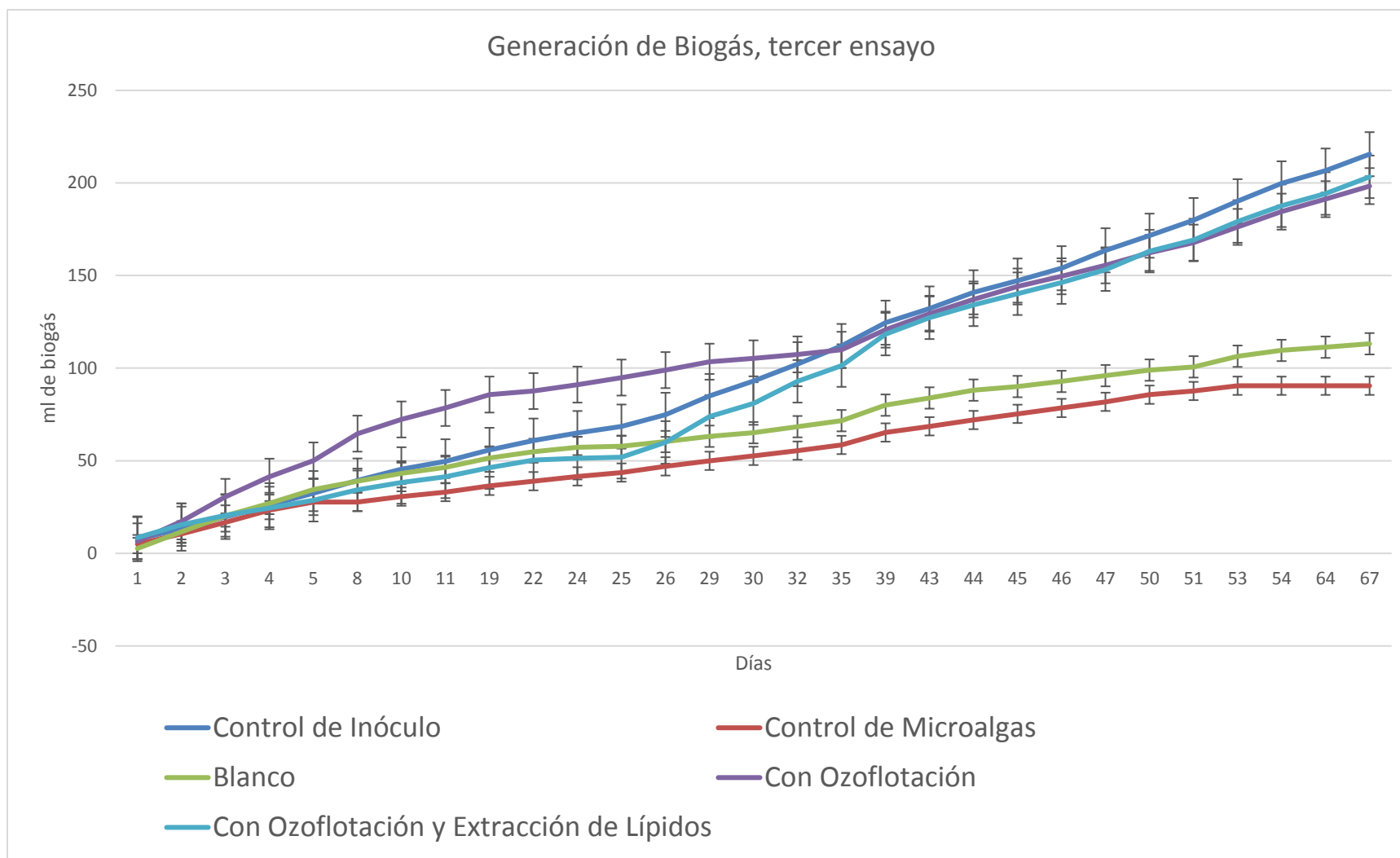


Figura 12. Generación de biogás, tercer ensayo.

## 5.6. Cromatografía

Para el primer y segundo ensayo los resultados resultaron no cuantificables, por lo que sólo se presentan los resultados de la cromatografía del tercer ensayo.

El tercer ensayo presentó los siguientes picos de metano:

Tabla 14. Picos de metano en tercer ensayo

Reactor	cm
Control Inóculo 1	1.5
Control Inóculo 2	2.5
Control Inóculo 3	1.7
Control Microalgas 1	0
Control Microalgas 2	0.6
Control Microalgas 3	0
Blanco 1	3
Blanco 2	2.7
Blanco 3	3.9
Blanco 4	1.6
Ozoflotación 1	3.4
Ozoflotación 2	3.3
Ozoflotación 3	3.2
Ozoflotación 4	2.8
Extracción de lípidos 1	2.8

Utilizando la siguiente curva de calibración:

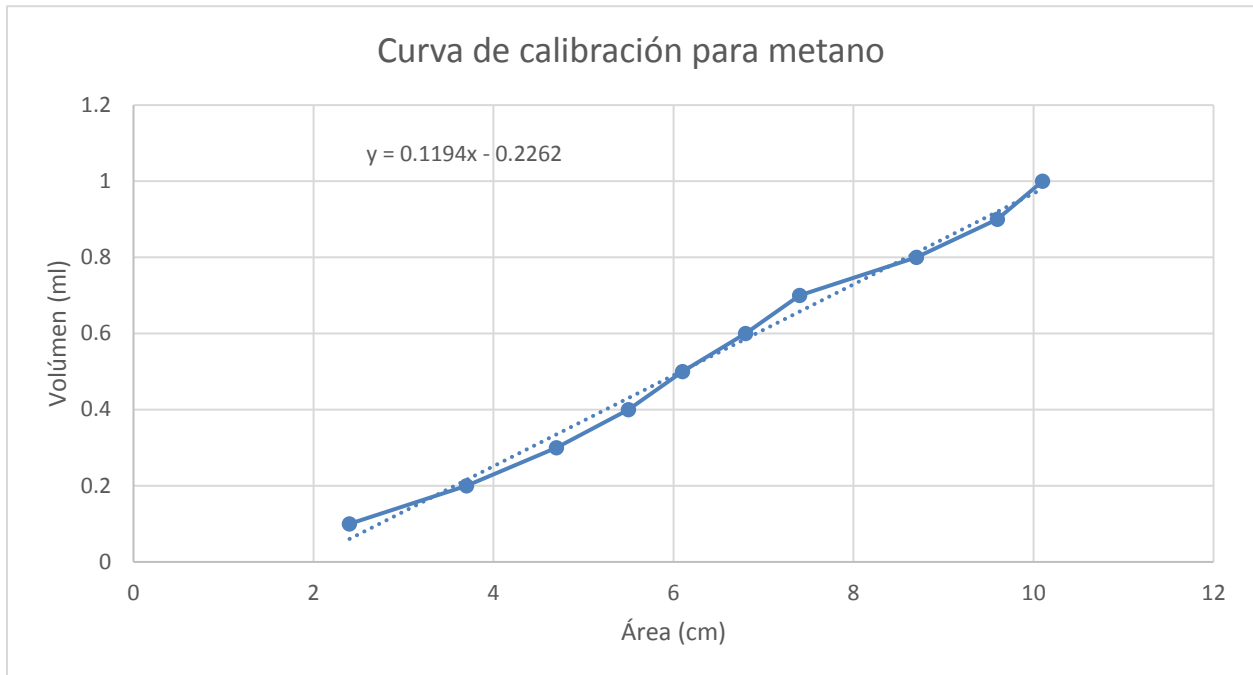


Figura 13. Curva de calibración para metano

Se llega a la siguiente tabla:

Tabla 15. Resultados de cromatografía.

Reactor	cm	conversión	Tomando en cuenta que se inyectó .5ml
Control Inóculo 1	1.5	no cuantificable	---
Control Inóculo 2	2.5	0.0723	0.1446
Control Inóculo 3	1.7	no cuantificable	---
Control Microalgas 1	0	no cuantificable	---
Control Microalgas 2	0.6	no cuantificable	---
Control Microalgas 3	0	no cuantificable	---
Blanco 1	3	0.132	0.264
Blanco 2	2.7	0.09618	0.19236
Blanco 3	3.9	0.23946	0.47892
Blanco 4	1.6	no cuantificable	---
Ozoflotación 1	3.4	0.17976	0.35952
Ozoflotación 2	3.3	0.16782	0.33564
Ozoflotación 3	3.2	0.15588	0.31176
Ozoflotación 4	2.8	0.10812	0.21624
Extracción de lípidos 1	2.8	0.10812	0.21624

## 5.7. Gráfica de Metano

Utilizando los datos arrojados por la cromatografía en la generación de gas de los reactores llegamos a la siguiente gráfica.

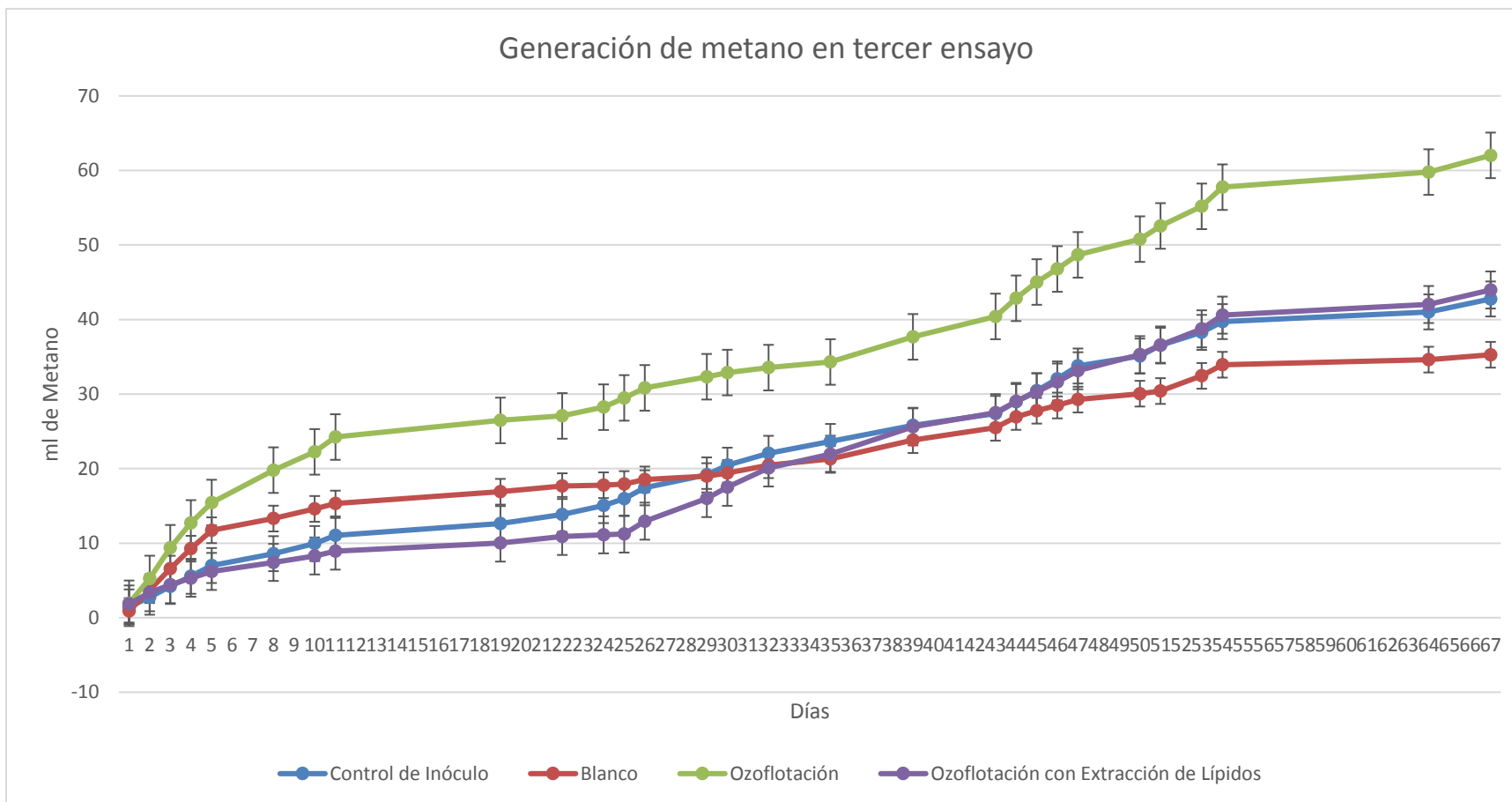


Figura 14. Generación de metano en tercer ensayo



Después de la gráfica se realizó un ANOVA para ver si las diferencias presentadas entre los reactores eran significativas o no, y el resultado fue positivo.

Con esto haciendo una simple operación matemática:

$$\frac{62.024391}{35.273532} \times 100 = 175.8 \%$$

Con este resultado podemos ver que el proceso de ozoflotación dio un aumento en la generación de metano de un 75.8%, lo cual nos dice que es un proceso que puede ser usado como pretratamiento de biomasa microalgal para digestión anaerobia.

Si comparamos nuestros resultados con otros que se muestran en la tabla 6.

Tabla 16. Porcentaje de aumento de metano en diferentes pretratamientos.

Pretratamiento	Condiciones	Incremento % de metano	Referencia
Termal	<i>Scenedesmus</i> 70-90°C por 3 h	12.2%	(González-Fernández et al. 2012)
Termal	<i>Scenedesmus</i> 70-80°C por 25 m	9.57%	(González-Fernández et al. 2012)
Termal	<i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. 50-80°C por 30m		(Cho et al. 2013)
Termal	Consorcio de microalgas 75-95°C por 10 h	67-72%	(Passos & Ferrer, 2014)
Hidrotermal	<i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. 120°C por 30m	20%	(Cho et al. 2013)

Hidrotermal	Consorcio de microalgas 130°C por 15m	42%	(Passos & Ferrer, 2014)
Termal con explosión de vapor	<i>Scenedesmus</i> 170°C a 8 bars por 30m	81%	(Keymar et al., 2013)
Ultrasonido	<i>Scenedesmus</i> 100-130 MJ/kg TS	75-90%	(González-Fernández et al., 2012)
Ultrasonido	<i>Scenedesmus sp.</i> y <i>Chlorella sp.</i> 39, 117 y 234 MJ/kg VS	6%, 10% y 15%	(Cho et al. , 2013)
Microondas	Consorcio de microalgas 21.8, 43.6, 65.4 MJ/kg TS	12-78%	(Passos et al. , 2014)

Podemos ver que el resultado arrojado de 75.8% es comparable con los resultados obtenidos por Passos y Ferrer de 67-72% (Termal), de Keymar y colaboradores de 81% (Termal con explosión de vapor), de González-Fernández y colaboradores de 75-90% (Ultrasonido) y de Passos y colaboradores de 12-78% (Microondas). Los cuales son los valores más altos arrojados en la tabla, por lo que podemos ver que el pretratamiento por ozoflotación es prometedor para la digestión anaerobia de biomasa microalgal.

La baja generación de biogás a partir de biomasa microalgal post extracción de lípidos puede ser debido tres causas principalmente: 1) a la difusión en el medio de los carbohidratos al momento de realizar el cosechado; 2) a la mineralización de carbohidratos debido a la oxidación causada por el ozono; 3) a la baja concentración de carbohidratos que se tiene en las microalgas al no ser sometidas a un ambiente de estrés (Davila B. 2016).

## 6. Conclusiones

1 - El uso de ozoflotación como pretratamiento mejora la obtención de metano en el proceso de digestión anaerobia a partir de biomasa microalgal. Aunado a esto provee un método de cosecha lo cual ayuda a la reducción de costos del proceso de obtención de metano a partir de biomasa microalgal.

2 - Las muestras de biomasa con las características de: sin pretratamiento, con pretratamiento de ozoflotación y con pretratamiento de ozoflotación con extracción de lípidos, mostraron diferencias significativas en cuanto a la generación de metano al ser sometidas a digestión anaerobia.

3 – Los reactores diseñados ayudaron a la satisfactoria realización de los ensayos de digestión anaerobia, sin embargo el sistema de medición de biogás generó problemas de lecturas y mantenimiento.

4 - Utilizando los valores de 0.5 g de biomasa en peso por reactor, temperatura de 37°C y tiempo de retención de 45 días, se obtuvieron valores de biogás de hasta 203.3 ml y composiciones de hasta 33% de metano.

5 – La capacidad de generación de biogás a partir de biomasa microalgal post extracción de lípidos fue baja, probablemente debido, a la difusión en el medio y mineralización de carbohidratos que se da al momento de la ozoflotación, aunado a que los cultivos no fueron llevados a situaciones de estrés por lo que en sí la cantidad de carbohidratos inicial era baja.

6 – Los resultados obtenidos demostraron diferencias significativas entre las diferentes muestras, dando a notar una diferencia del 75% de generación de metano entre el blanco y la muestra pretratada con ozoflotación. Esto nos deja ver que la ozoflotación si actúa como pretratamiento para el proceso de digestión anaerobia usando microalgas como sustrato y es comparable con los resultados obtenidos por investigadores como Keymar, Passos y Gonzales-Fernández, que fueron presentados en la tabla 6.

## 7. Trabajos futuros a desarrollar

- Repetir el experimento en condiciones óptimas para corroborar datos.
- Realizar diferentes experimentos para encontrar la dosis óptima de ozono como a utilizar como pretratamiento.
- Realizar el experimento utilizando otras especies de microalgas, para poder evaluar el proceso de ozoflotación como pretratamiento de una manera más general.
- Evaluar el proceso de digestión anaerobia en comparación con otras estrategias, como pueden ser la obtención de bioetanol, para valorizar la biomasa residual post extracción de lípidos, para poder trabajar en el sistema de biorefinería.
- Evaluar el potencial de generación de metano post extracción de proteínas.

## 8. Referencias

- Abinandan, S. and S. Shanthakumar. 2015. "Challenges and Opportunities in Application of Microalgae (Chlorophyta) for Wastewater Treatment: A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52:123–32. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032115007339>).
- Alzate, M. E., R. Muñoz, F. Rogalla, F. Fdz-Polanco, and S. I. Pérez-Elvira. 2012. "Biochemical Methane Potential of Microalgae: Influence of Substrate to Inoculum Ratio, Biomass Concentration and Pretreatment." *Bioresource Technology* 123:488–94. Retrieved October 28, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940359>).
- Alzate, M. E., R. Muñoz, F. Rogalla, F. Fdz-Polanco, and S. I. Pérez-Elvira. 2014. "Biochemical Methane Potential of Microalgae Biomass after Lipid Extraction." *Chemical Engineering Journal* 243:405–10. Retrieved October 26, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894713009832>).
- Amin, Sarmidi. 2009. "Review on Biofuel Oil and Gas Production Processes from Microalgae." *Energy Conversion and Management* 50(7):1834–40. Retrieved July 9, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890409000764>).
- Batista, Ana Paula et al. 2014. "Combining Urban Wastewater Treatment with Biohydrogen Production – An Integrated Microalgae-Based Approach." *Bioresource Technology* 184:230–35. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414014862>).
- Blumreisinger, Maria, Doris Meindl, and Eckhard Loos. 1983. "Cell Wall Composition of Chlorococcal Algae." *Phytochemistry* 22(7):1603–4.
- Brennan, Liam and Philip Owende. 2010. "Biofuels from microalgae—A Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-Products." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2):557–77. Retrieved July 9, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109002408>).
- Cheng, Ya-Ling et al. 2010. "Dispersed Ozone Flotation of *Chlorella Vulgaris*." *Bioresource technology* 101(23):9092–96. Retrieved November 25, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675123>).
- Cheng, Yu Shen, Yi Zheng, John M. Labavitch, and Jean S. Vandergheynst. 2011. "The Impact of Cell Wall Carbohydrate Composition on the Chitosan Flocculation of *Chlorella*." *Process Biochemistry* 46(10):1927–33. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.021>).
- Chisti, Yusuf. 2007. "Biodiesel from Microalgae." *Biotechnology advances* 25(3):294–306. Retrieved July 9, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350212>).
- Cho, Sunja et al. 2013. "Microalgae Cultivation for Bioenergy Production Using Wastewaters from a Municipal WWTP as Nutritional Sources."
- Collet, Pierre et al. 2011. "Life-Cycle Assessment of Microalgae Culture Coupled to Biogas Production." *Bioresource Technology* 102(1):207–14. Retrieved July 11,

- 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20674343>).
- Dávila Cardona, Bernardo.(2016). *Obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual empleando ozoflotación como método de cosecha*. (Tesis maestral). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Dębowski, Marcin, Marcin Zieliński, Anna Grala, and Magda Dudek. 2013. "Algae Biomass as an Alternative Substrate in Biogas Production Technologies - Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27:596–604. Retrieved July 29, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032113004747>).
- Derenne, S., C. Largeau, and F. Taulelle. 1993. "Occurrence of Non-Hydrolysable Amides in the Macromolecular Constituent of Scenedesmus Quadricauda Cell Wall as Revealed by <sup>15</sup>N NMR: Origin of N-AlkylNitriles in Pyrolysates of Ultralaminae-Containing Kerogens." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57(4):851–57.
- Domozych, David S. et al. 2012. "The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity." *Frontiers in Plant Science* 3(May):1–7.
- Guo, Yang, Thomas Yeh, Wenhan Song, Donghai Xu, and Shuzhong Wang. 2015. "A Review of Bio-Oil Production from Hydrothermal Liquefaction of Algae." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 48:776–90. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032115003196>).
- Halim, Ronald, Michael K. Danquah, and Paul a Webley. 2012. "Extraction of Oil from Microalgae for Biodiesel Production: A Review." *Biotechnology advances* 30(3):709–32. Retrieved July 11, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266377>).
- Halim, Ronald, Brendan Gladman, Michael K. Danquah, and Paul a Webley. 2011. "Oil Extraction from Microalgae for Biodiesel Production." *Bioresource technology* 102(1):178–85. Retrieved July 11, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655746>).
- Harun, Razif et al. 2011. "Technoeconomic Analysis of an Integrated Microalgae Photobioreactor, Biodiesel and Biogas Production Facility." *Biomass and Bioenergy* 35(1):741–47. Retrieved November 9, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953410003594>).
- Heaven, Sonia, John Milledge, and Yue Zhang. 2011. "Comments on 'Anaerobic Digestion of Microalgae as a Necessary Step to Make Microalgal Biodiesel Sustainable.'" *Biotechnology Advances* 29(1):164–67. Retrieved July 11, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289163>).
- Hernández, D., B. Riaño, M. Coca, and M. C. García-González. 2013. "Treatment of Agro-Industrial Wastewater Using Microalgae-Bacteria Consortium Combined with Anaerobic Digestion of the Produced Biomass." *Bioresource Technology* 135:598–603. Retrieved November 3, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23069610>).
- Huang, GuanHua, Feng Chen, Dong Wei, XueWu Zhang, and Gu Chen. 2010. "Biodiesel Production by Microalgal Biotechnology." *Applied Energy* 87(1):38–46.

- Retrieved July 12, 2014  
(<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261909002530>).
- Kim, Ga-Yeong, Yeo-Myeong Yun, Hang-Sik Shin, Hee-Sik Kim, and Jong-In Han. 2015. "Scenedesmus-Based Treatment of Nitrogen and Phosphorus from Effluent of Anaerobic Digester and Bio-Oil Production." *Bioresource Technology* 196:235–40. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415010627>).
- Komolafe, Oladapo et al. 2014. "Biodiesel Production from Indigenous Microalgae Grown in Wastewater." *Bioresource Technology* 154:297–304. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.048>).
- Kwietniewska, Ewa and Jerzy Tys. 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. Retrieved October 8, 2014  
(<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114002020>).
- Lakaniemi, Aino Maija, Olli H. Tuovinen, and Jaakko a. Puhakka. 2013. "Anaerobic Conversion of Microalgal Biomass to Sustainable Energy Carriers - A Review." *Bioresource Technology* 135:222–31. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.096>).
- Lee, Kwanyong, Phrompol Chantrasakdakul, Daegi Kim, Mingeun Kong, and Ki Young Park. 2014. "Ultrasound Pretreatment of Filamentous Algal Biomass for Enhanced Biogas Production." *Waste Management* 34(6):1035–40. Retrieved November 9, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269061>).
- Li, Jingjing, Ying Liu, Jay J. Cheng, Michal Mos, and Maurycy Daroch. 2015. "Biological Potential of Microalgae in China for Biorefinery-Based Production of Biofuels and High Value Compounds." *New Biotechnology* 32(6):588–96. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678415000187>).
- Maity, Jyoti Prakash, Jochen Bundschuh, Chien Yen Chen, and Prosun Bhattacharya. 2014. "Microalgae for Third Generation Biofuel Production, Mitigation of Greenhouse Gas Emissions and Wastewater Treatment: Present and Future Perspectives - A Mini Review." *Energy*. Retrieved August 22, 2014  
(<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360544214004150>).
- Martínez, V. et al. 2005. "Produccion de Biomasa de Scenedesmus Obliquus en Diferentes Medios de Cultivo." *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 36.
- Mat, Vito. 2015. "Cell Disruption for Microalgae Biorefineries." 33:243–60.
- Meier Figueroa, Leslie, Patricio Neumann Langdon, Laura Azócar Ulloa, Alvaro Torres Aravena, and David Jeison Núñez. 2011. "Biogás a Partir de Microalgas, Una Herramienta Para Mejorar La Sustentabilidad de La Producción de Biodiesel." (1):1–8.
- Mussgnug, J. H., V. Klassen, a. Schlüter, and O. Kruse. 2010. "Microalgae as Substrates for Fermentative Biogas Production in a Combined Biorefinery Concept." *Journal of Biotechnology* 150(1):51–56. Retrieved July 30, 2014  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691224>).

- Passos, Fabiana, Maria Solé, Joan García, and Ivet Ferrer. 2013. "Biogas Production from Microalgae Grown in Wastewater: Effect of Microwave Pretreatment." *Applied Energy* 108:168–75. Retrieved October 4, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261913001505>).
- Passos, Fabiana, Enrica Uggetti, Hélène Carrère, and Ivet Ferrer. 2014. "Pretreatment of Microalgae to Improve Biogas Production: A Review." *Bioresource Technology*. Retrieved September 11, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414012309>).
- Posten, Clemens and Georg Schaub. 2009. "Microalgae and Terrestrial Biomass as Source for Fuels--a Process View." *Journal of biotechnology* 142(1):64–69. Retrieved November 13, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19446353>).
- Quevedo, C., S. P. Morales, and a Acosta. 2008. "Scenedesmus Sp GROWTH IN DIFFERENT CULTURE Mediums FOR MICROALGAL PROTEIN PRODUCTION." *Vitae Revista De La Facultad De Quimica Farmaceutica* 15:25–31.
- Ramos-Suárez, Juan L. and Nely Carreras. 2014. "Use of Microalgae Residues for Biogas Production." *Chemical Engineering Journal* 242:86–95. Retrieved October 26, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894713016343>).
- Ramos-suárez, Juan L., Francisco García, F.Gabriel Acien, and Nely Carreras. 2014. "Benefits of Combining Anaerobic Digestion and Amino Acid Extraction from Microalgae." 258:1–9.
- Razon, Luis F. and Raymond R. Tan. 2011. "Net Energy Analysis of the Production of Biodiesel and Biogas from the Microalgae: Haematococcus Pluvialis and Nannochloropsis." *Applied Energy* 88(10):3507–14. Retrieved August 5, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261910005726>).
- Schwede, Sebastian, Alexandra Kowalczyk, Mandy Gerber, and Roland Span. 2011. "Influence of Different Cell Disruption Techniques on Mono Digestion of Algal Biomass." *Bioenergy Technology - World Renewable Energy Congress* 41–47. Retrieved ([http://www.ep.liu.se/ecp\\_article/index.en.aspx?issue=57;vol=1;article=6](http://www.ep.liu.se/ecp_article/index.en.aspx?issue=57;vol=1;article=6)).
- Tan, Chung Hong, Pau Loke Show, Jo-Shu Chang, Tau Chuan Ling, and John Chi-Wei Lan. 2015. "Novel Approaches of Producing Bioenergies from Microalgae: A Recent Review." *Biotechnology Advances* (135). Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975015000385>).
- Valeriano Gonzalez, María Teresa. (2013). Efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y en ácidos grasos precursores de biodiesel durante la separación de microalgas mediante ozoflotación. (Tesis maestra). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Weier, T.Bisalputra and T. E. 1963. "The Cell Wall of Scenedesmus Quadricauda." 50(10):1011–19.
- Yang, Jia et al. 2011. "Life-Cycle Analysis on Biodiesel Production from Microalgae: Water Footprint and Nutrients Balance." *Bioresource technology* 102(1):159–65. Retrieved July 10, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675125>).



Zhao, Baisuo et al. 2014. "Efficient Anaerobic Digestion of Whole Microalgae and Lipid-Extracted Microalgae Residues for Methane Energy Production." *Bioresource Technology* 161:423–30. Retrieved October 5, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736123>).

## 9. Anexo - Análisis estadístico

Fuente de variación	G.L.	SS	MS	F
<i>Entre tratamientos</i>	$k-1$	$SS_A$	$SS_A / (k-1)$	$MS_A / MS_E$
Error	$(r-1)k$	$SS_E$	$SS_E / k(r-1)$	
Total	$kr-1$	$SS_T$		

Fuente de variación	G.L.	SS	MS	F
<i>Entre tratamientos</i>	3	13.33	4.442556193	5.900436082
Error	84	63.24527798	0.752919976	
Total	115	76.57294656		

Como 5.90 es mayor que 2.76 la hipótesis Nula se anula, pues si existen diferencias significativas entre los tratamientos.



		Grados de libertad para el numerador																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	
Grados de libertad para el denominador	1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	251	
	2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5
	3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	
	4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	
	5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	
	6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	
	7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	
	8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	
	9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	
	10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	
	11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	
	12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	
	13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	
	14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	
	15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	
	16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	
	17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	
	18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	
	19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	
	20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	
	21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	
	22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	
	23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	
	24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	
	25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79		
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69		
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59		
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50		
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39		

Figura 15. Tabla de Anova.