RED IBEROMASA

PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO (CYTED)

PROGRAMA IBEROAMERICANO

CYTED

CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO

OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE BIOMASA SÓLIDA PARA USO ENERGÉTICO

Trabajos de investigación 2022

Red IBEROMASA

Cuadernos de la Red **IBEROMASA**

Optimización de los procesos de extracción de biomasa sólida para uso energético

Trabajos de investigación 2022

Red IBEROMASA

Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)

PROGRAMA IBEROAMERICANO

CYTED

CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO

RED IBEROMASA

Cuadernos de la **RED IBEROMASA**

Optimización de los procesos de extracción de biomasa sólida para uso energético
Trabajos de investigación 2022.

Editor

Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)

Coordinador

Borja Velázquez Martí

© de los textos y las imágenes: sus autores

Diseño y maquetación

Enrique Mateo, *Triskelion Diseño Editorial*

ISBN: 978-84-15413-56-1

Los editores autorizan la reproducción, traducción y difusión parcial de la presente publicación con fines científicos, educativos y de investigación que no sean comerciales ni de lucro, siempre que se identifique y se reconozca debidamente a los editores, la publicación y los autores. La autorización para reproducir, difundir o traducir el presente estudio, o compilar o crear obras derivadas del mismo en cualquier forma, con fines comerciales/lucrativos, deberá solicitarse por escrito.

Impreso en España

Contenido

Prólogo v

Biorrefinerías de microalgas: perspectivas en Ecuador 7
Ingrid Mercado Reyes, Xavier Álvarez Montero

Digestión anaeróbica: Perspectivas en Ecuador 65
Xavier Álvarez Montero, Ingrid Mercado-Reyes

Production of cellulases and xylanases by a new fungal species using green coconut fiber pretreated by steam explosion 109
Beatriz de Azevedo, Stephanie Caroline Bivar Matias, Pedro Ferreira de Souza Filho, Everaldo Silvino dos Santos

Evaluación de briquetas con residuos de madera de pino en una comunidad indígena mexicana 127
Mario Morales-Máximo, Víctor Manuel Ruiz-García, Carlos Alberto García Bustamante, Borja Velázquez-Martí, Omar Masera, José Guadalupe Rutiaga-Quiñones

Potencial de la biomasa tropical con fines energéticos caso Colombia 141
Luz Stella Cadavid-Rodríguez

Deteminación de ecuaciones alométricas para estimar biomasa aérea y captura de CO_2 en bolaina (*Guazuma crinita* C. Martius) *157*
Mario Torres García, Tania Guerrero Vejarano

Potencial de la biomasa como fuente renovable de energía en las principales industrias forestales de la provincia de Guantánamo 169
José Rolando Dupuy Parra, René Lesme Jaén, Aldel Estiven Matos, Ignacio Utria Mendoza, Alejandro Soto Agüero

Binomio ruralidad-bioenergía: retos, desafíos y soluciones desde proyectos situados. Argentina 177
Ada Graciela Nogar

Oportunidades y barreras de la producción de biogás en Argentina. El caso de la bioeléctrica General Alvear 181
Valentín Decunto, Antonio Riccillo

Aprovechamiento integral de madera bajo un enfoque de biorrefinería basada en procesos hidrotérmicos 185
Carmina Reyes Plascencia, Matías Cagno, Pierre Cabot, Nestor Tancredi

Evaluación del potencial energético del cambio de cultivo de *Citrus reticulata* var. Murcott por *Citrus unshiu* mandarina satsuma 199
Mary Flor Césare Coral, Angela Tiffany Castillo Híjar, Pablo Guamán Eras, Alejandrina Sotelo Mendez, José Manuel Alejandro Cerdán Morillo, José Luis Calle Maravi, Jhon Romero

Prólogo

Es para mí un honor volver a presentar el conjunto de trabajos de investigación realizados en la RED IBEROMASA del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) durante el año 2022. Como se ha demostrado, cada día cobra más importancia el interés de obtención de combustibles a partir de la biomasa, los cuales suponen una fuente energía que complementará el resto de las energías renovables. La cantidad de recursos disponibles en el medio agrícola y forestal en Latinoamérica es realmente abrumadora. El conocimiento sobre las cantidades y características de los materiales, así como de los procesos y posibilidades de mercado justifican la necesidad de realizar investigaciones en este entorno. El trabajo de la red trata de ahondar en el conocimiento de estos recursos en el contexto Iberoamericano, preparando el camino para el cambio de la matriz energética inevitable a nivel global cuando empiecen a escasear los combustibles fósiles.

Los trabajos presentados se centran, por un lado, en la recogida, transporte y pretratamiento de los materiales biomásicos, por otro lado, su transformación en astillas, pélets, carbón vegetal, biodiésel bioetanol, gas de síntesis, biogás y biohidrógeno.

Como se puede comprobar el trabajo coordinado de los investigadores que conforman la red ha permitido abarcar todo el espectro de los biocombustibles obtenibles a partir de biomasa. Quiero felicitar a las instituciones que conforman la red por el gran esfuerzo realizado para ofrecer resultados que son transferidos entre todos los países con el objetivo común de poder solucionar de forma conjunta los problemas energéticos que son compartidos por todo el continente. Al mismo tiempo, el aprovechamiento de la biomasa está vinculado a la consecución de los ODS para acabar con la pobreza, el hambre, mitigar el cambio climático y el logro de ciudades y comunidades sostenibles.

La creatividad, el conocimiento, la tecnología y los recursos financieros de toda la sociedad son necesarios para alcanzar los ODS en todos los contextos. Los trabajos presentados por la red son un grano de arena más para dar a conocer las posibilidades de utilizar unos recursos con potencial energético todavía infrautilizados. La creatividad y el conocimiento son más exitosos cuando se ejercitan conjuntamente y por eso el trabajo de los investigadores en red es muy conveniente. Quiero agradecer al programa CYTED por haber dado la oportunidad de esta interacción entre instituciones e investigadores en la red de Iberomasa.

Tras este prólogo les doy paso a los trabajos realizados en el año 2022, los cuales se centran en la evaluación de la sostenibilidad del aprovechamiento de la biomasa. Mis más sinceras felicitaciones a los investigadores por los resultados obtenidos. Para los artífices de este trabajo mi más sincero reconocimiento.

Borja Velázquez-Martí
Coordinador de la red IBEROMASA

Catedrático de Universidad
Departamento de Ingeniería Rural y Agroalimentaria.
Universitat Politècnica de València.
Camino de Vera s/n, 46022 Valencia (Spain)

Biorrefinerías de microalgas: perspectivas en Ecuador

Ingrid Mercado Reyes[1], Xavier Álvarez Montero[2]*

[1]Laboratorio de Biotecnología Microbiana (LabBiotem S.A.), Ceibos Calle 17 y transversa, Guayaquil-Ecuador.

[2]ESPE-Universidad de las Fuerzas Armadas, sede Santo Domingo. Ecuador.

***Autor para correspondencia:** *xgalvarez@espe.edu.ec*

1. Introducción

Las microalgas son microorganismos que mediante su metabolismo fotosintético utilizan el dióxido de carbono (CO_2) y la luz solar para producir oxígeno (O_2) y biomoléculas de alto valor agregado (Miranda *et al.*, 2022). En procesos biotecnológicos, son capaces de generar parcial o totalmente alimentos, piensos, fertilizantes, abonos, aplicaciones farmacéuticas, biocombustibles, entre otros, de forma que constituyen maquinarias fotosintéticas que permiten reducir los gases de efecto invernadero atmosféricos sin comprometer la seguridad alimentaria, energética y sanitaria a través de enfoques nuevos y sostenibles (Giraldo-Calderón *et al.*, 2018).

El cultivo de especies microalgales resulta novedoso y potencialmente escalable, se ha demostrado que su biomasa contiene concentraciones altas de proteínas, lípidos y azúcares, se desarrollan en sistemas de cultivo abierto o cerrado utilizando solo agua, nutrientes y CO_2 atmosférico, alta eficiencia fotosintética, mayores rendimientos frente a cultivos vegetales, captura eficiente de carbono, no requieren de tierras arables, etc (Benedetti *et al.*, 2018; Bhattacharya & Goswami, 2020).

Debido a las ventajas que traen los procesos biotecnológicos con microalgas, se ha propuesto el concepto de "Biorrefinería Verde", que se enfoca en aspectos sistémicos para emplear biomasa microalgal como materia prima para diferentes aplicaciones, reduciendo los costos de producción, obteniendo productos altamente viables y disminuyendo el aporte al deterioro ambiental. El término "Biorrefinería" es como las refinerías convencionales de petróleo, con el objetivo principal de que la biomasa sea transformada en productos químicos de bajo y alto valor, combustibles u otros compuestos de interés comercial, básicamente en tres pasos fundamentales: 1-cultivo; 2-recolección y ruptura celular; 3-purificación del producto, tal como esquematiza la Figura 1 (Bhattacharya & Goswami, 2020).

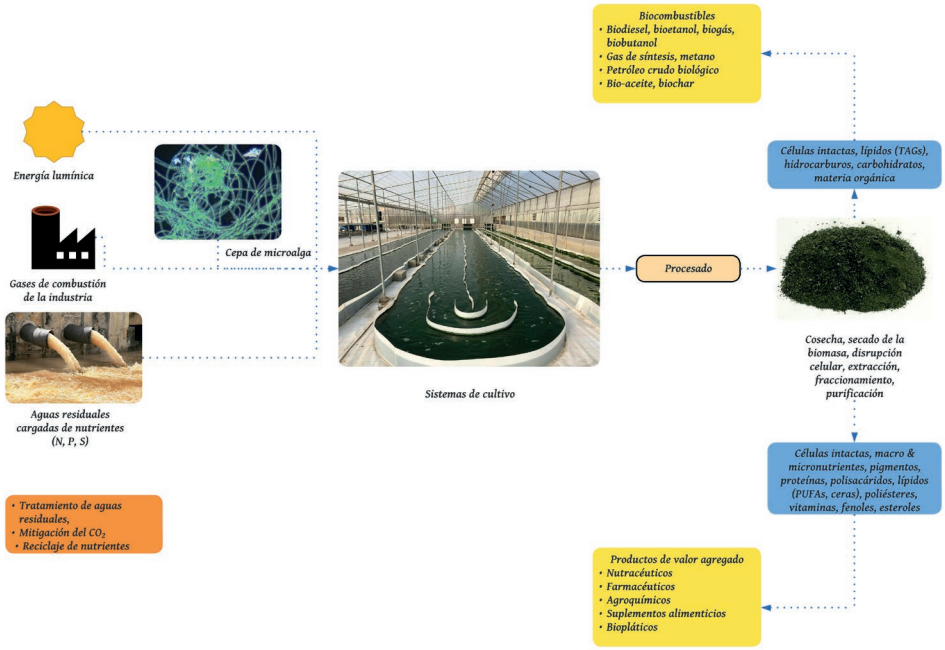


Figura 1. Biorrefinería de microalgas. La biomasa se puede producir a través de la fotosíntesis y/o el reciclaje de efluentes y gases de combustión, y se puede procesar más para producir biocombustibles y productos de valor agregado, adaptado de Bhattacharya & Goswami, 2020.

Las microalgas se han utilizado en el pasado para reciclar algunos de los nutrientes de las fuentes de aguas residuales urbanas y como un paso en el tratamiento de aguas residuales agroindustriales. A medida que crece la población mundial, la generación de aguas residuales se incrementa cada vez más. Utilizando las aguas residuales como fuente de nutrientes, las microalgas pueden producir lípidos que se consideran una fuente potencial de biodiésel. Sin embargo, existen tres aspectos de la producción de microalgas que influyen fuertemente en la sostenibilidad futura de la producción de biocombustibles de microalgas, estos son:

1. Balance energético y de carbono.
2. Los impactos ambientales.
3. El costo de producción (Yousuf, 2020).

La recuperación y preparación de la biomasa de microalgas para la reacción de transesterificación para la producción de biodiesel requiere más del 20-30% del coste total de elaboración del biocombustible. Flotación, centrifugación, coagulación-floculación y la filtración son algunas de las formas más utilizadas para la separación; sin embargo, no existe un mejor método único para cosechar aún. La mayoría de los métodos utilizados para extraer el aceite de biomasa de algas depende del producto de la biomasa seca. La liofilización, secado al horno o secado con aire forzado también genera un costo adicional. Por estas razones la producción de aceite de algas de grado comercial aún no es rentable.

Sin embargo, las microalgas tienen prioridad sobre otros cultivos energéticos debido a lo siguiente:

1. Pueden cultivarse en tierras no cultivables.
2. Se pueden cultivar en estanques y fotobiorreactores.
3. Pueden tolerar un amplio rango de pH, salinidad y temperatura.
4. Son continuamente cultivables, la cosecha no es estacional.
5. Pueden mitigar el CO_2 de fuentes industriales y atmosféricas.
6. Aprovechamiento completo de la biomasa (proteínas, lípidos y carbohidratos).
7. No son un recurso finito, es decir, renovables y sostenible (Yousuf, 2020).

El balance general de energía y carbono debe ser favorable para considerar a las microalgas como una materia prima viable. Comparando los sistemas de producción de biomasa en términos de ratio de energía neta (NER-*Net Energy Ratio*), debería exigirse un balance energético positivo. Cuando NER se define como la suma de la energía utilizada para el cultivo, la cosecha y el secado dividida por el contenido energético de la biomasa seca, entonces, si es menor que la unidad, el proceso produce más energía de la que consume. En casos realistas, la mayoría de los sistemas tienen un valor NER >1. En los sistemas con NER <1, si se consideran los procesos de secado, deshidratación y extracción de lípidos, el NER puede incrementarse en de 0,05-0,1 a 0,5-0,75 (Slade y Bauen, 2013).

Una aplicación novedosa recientemente desarrollada es el uso de microalgas específicas ricas en lípidos, a saber, microalgas oleaginosas, para eliminar el CO_2 del biogás, no solo se puede purificar el biogás, sino también producir materias primas para biodiésel. Este proceso integrado es muy atractivo para compensar los costes de producción de biocombustibles y mitigar el CO_2, que es fijado en la biomasa de microalgas de forma respetuosa con el medio ambiente (Srinuanpan *et al.*, 2020).

2. Biorrefinería microalgal

Las microalgas, como parte fundamental de la cadena alimentaria de los ecosistemas acuosos, representan microorganismos fotosintéticos muy diversos, con numerosas ventajas en comparación con las plantas terrestres y un gran potencial en productos de base biológica y aplicaciones derivadas (Milano *et al.*, 2016). La biomasa microalgal se compone principalmente de proteínas, lípidos y carbohidratos, mientras que también se producen muchas sustancias y moléculas bioactivas, incluidos pigmentos, macro y micronutrientes, vitaminas, fenoles y esteroles (Koller *et al.*, 2014). Tanto la producción de biocombustibles como la extracción/formación de productos de valor agregado a partir de microalgas pueden enfrentar varios desafíos en los países desarrollados y en desarrollo, incluido el agotamiento de los combustibles fósiles, las emisiones de CO_2, el cambio climático, el agua, los alimentos, la escasez de piensos y la demanda de energía renovable (Koutra *et al.*, 2020).

Sin embargo, el uso energético a gran escala de las microalgas sigue siendo inviable en la actualidad, y los productos de microalgas disponibles representan solo una pequeña participación en los mercados, lo que resulta en productos de alto valor (Ruiz *et al.*, 2016). Además, la producción industrial actual se ha centrado en la biomasa total

de microalgas para usos nutracéuticos y piensos o en una sola fracción, dejando sin explotar hasta el 70% de la biomasa producida (Sankaran *et al.*, 2018). Con este fin, la viabilidad y sostenibilidad de la tecnología de microalgas requiere el uso completo y eficiente de todos los compuestos de biomasa disponibles en un enfoque integrado de biorrefinería (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013).

Al igual que una refinería de petróleo, o más adecuadamente a una planta láctea que procesa materias primas ricas en proteínas, lípidos y carbohidratos, la biorrefinería de microalgas puede dar lugar a múltiples productos, dado que las técnicas de procesado son suaves y bien definidas, conservando la funcionalidad de las fracciones disponibles (Eppink *et al.*, 2017). El procesamiento de biomasa depende en gran medida del uso final deseado y la calidad del producto objetivo (Gerardo *et al.*, 2015) y puede incluir varias etapas de recolección, secado, ruptura celular, extracción, fraccionamiento y purificación.

La extracción es innecesaria en caso de que las células intactas sea el objetivo, mientras que, para las sustancias extracelulares como los polisacáridos, la disrupción celular es innecesaria (Hariskos y Posten, 2014). Sin embargo, varios pasos de procesamiento dificultan la ampliación de la tecnología y hacen que la biorrefinería de microalgas sea demasiado costosa en comparación con los procesos industriales comunes (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013; ´t Lam *et al.*, 2018). Se anticipa que los avances técnicos, las opciones de reciclaje y la producción simultánea de biocombustibles de bajo valor y productos más rentables, junto con una mayor producción de biomasa, harán factible el enfoque general (Hariskos y Posten, 2014; Zhu, 2015; Eppink *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018).

2.1 Microalgas para producción de biodiesel

El biodiésel es el producto de una reacción de transesterificación, durante la cual los lípidos neutros de microalgas en forma de triacilgliceroles (TAG) se convierten en ésteres alquílicos de ácidos grasos, en presencia de alcohol, comúnmente metanol y un catalizador ácido/base o enzimático, al mismo tiempo, también se co-produce glicerol (Rangabhashiyam *et al.*, 2017). El biodiésel es uno de los biocombustibles más comunes, con propiedades combustibles mejoradas, como alta densidad de energía, generación limitada de contaminantes del aire durante la combustión y compatibilidad con los motores existentes (Rashid *et al.*, 2014). Además de los lípidos neutros que sirven como reservas de energía, la fracción lipídica de la biomasa de microalgas también se compone de lípidos estructurales, principalmente lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos), esteroles, ceras e hidrocarburos (Sharma *et al.*, 2012).

En cuanto a la composición lipídica, la longitud de cadena de los ácidos grasos de las microalgas varía entre C10 y C24; sin embargo, los C16 - C18 se consideran los más adecuados para biodiésel de alta calidad, según lo determinan las Normas Internacionales, la norma ASTM (*American Society for Testing and Materials*) D6751-02 en Estados Unidos y la norma EN 14214 en la Comunidad Europea (Koutra *et al.*, 2020). Según esto último, el C18:3 debe ser inferior al 12% y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs-*Polyunsatured Fatty Acids*) no deben superar el 1% (w/w). Además, los ácidos grasos libres (FFAs-*Free Fatty Acids*) pueden dificultar la producción de biodiésel debido a la saponificación en la transesterificación alcalina, lo que reduce el rendimiento y dificulta la separación del producto. Por lo tanto, la esterificación ácida de FFA, afectada principalmente por la relación metanol: FFA, se realiza

como un proceso de pretratamiento a escala industrial, seguido de la transesterificación alcalina (Chai *et al.*, 2014).

Debido a la alta viscosidad de los lípidos de microalgas, la transesterificación es necesaria para producir un combustible compatible para los motores diésel existentes. En cuanto a los reactivos utilizados, el metanol es el más utilizado debido a su bajo costo, mientras que los catalizadores disponibles tienen tanto ventajas como desventajas, que se revisan ampliamente en la literatura (Rangabhashiyam *et al.*, 2017; Veillette *et al.*, 2018). Entre las reacciones ácidas y alcalinas, los catalizadores alcalinos, como el NaOH, dan como resultado un menor rendimiento de biodiésel y una menor formación de jabón; por lo tanto, los ácidos, incluidos HCl (ácido clorhídrico), H_2SO_4 (ácido sulfúrico) y CH_3COCl (cloruro de acetilo), se usan comúnmente para la conversión de aceite de algas en biodiesel. La transesterificación enzimática catalizada por enzimas es más eficiente, se necesitan temperaturas de reacción más bajas, el procesamiento posterior es menos exigente, sin embargo, el costo del catalizador es alto.

Una opción emergente para la producción de biodiesel a partir de microalgas incluye la conversión directa a biodiesel, prescindiendo del paso de extracción de lípidos (Koutra *et al.*, 2020). El resultado de esta transesterificación *in situ*, en términos de rendimiento de combustible, es comparable con el proceso convencional, y dado que este último requiere más energía, se prefiere la transesterificación *in situ* (Uctug *et al.*, 2017). Con este fin, la biomasa húmeda de una cepa rica en lípidos de *Chlorella vulgaris* se ultrasonicó y luego se sometió a transesterificación *in situ* catalizada por una lipasa inmovilizada, lo que resultó en una alta conversión de biodiesel (Tran *et al.*, 2012).

De acuerdo con los estándares existentes, el biodiesel debe cumplir con varios criterios para ser utilizado como combustible para vehículos o para fines de calefacción (Chisti, 2007). Por lo tanto, el biodiésel de microalgas debe evaluarse en términos de su número de cetano, indicativo de su capacidad de ignición y calidad de combustión, índice de yodo que resulta del grado de insaturación total, un poder calorífico que muestra la energía liberada en la combustión, así como su viscosidad, comportamiento a bajas temperaturas y estabilidad a la oxidación (Veillette *et al.*, 2018).

Debido a que la composición lipídica de las microalgas determina los valores de las propiedades del biodiésel y dicta el uso adecuado del aceite de algas, el perfil de ácidos grasos (FA) es de suma importancia. El aceite producido por *Neochloris oleoabundans* se caracterizó por una mayor concentración de C16:0, que el aceite de soja comúnmente utilizado como materia prima de biodiesel, lo que resultó en un combustible con mayor número de cetano y estabilidad durante el almacenamiento, aunque con propiedades inferiores en climas fríos (Levine *et al.*, 2011).

El porcentaje de lípidos en la biomasa de microalgas es específico de la especie y puede variar significativamente, alcanzando hasta el 85 % del peso seco, mientras que los factores ambientales y las condiciones especialmente desfavorables suelen favorecer la acumulación de lípidos. La deficiencia de nutrientes, los valores altos de pH, el aumento de la intensidad lumínica, y la salinidad son los factores más comunes que inducen la acumulación de lípidos neutros sobre la síntesis de lípidos de membrana (Hu *et al.*, 2008). Sin embargo, un alto contenido de lípidos no es el único prerrequisito para la producción efectiva de biodiesel, ya que la productividad de lípidos, determinada simultáneamente por la producción de biomasa, debe ser de al menos 40 mg L^{-1} d^{-1} (Gong y Jiang, 2011).

El cultivo de dos cepas de microalgas, *Chlorella* SDEC-18 y *Scenedesmus* SDEC-8, en desechos de cocina digeridos, resultó en una alta productividad de lípidos de 21,31 y 20,27 mg L^{-1} d^{-1}, respectivamente, y propiedades mejoradas del biodiésel, en términos de número de cetano, valor de yodo, y punto de nube (Yu *et al.*, 2017). Se observó una productividad de lípidos significativamente mayor (238 mg L^{-1} d^{-1}) en la especie *Nannochloropsis* sp. cultivada en un medio sintético limitado en nitrógeno bajo una intensidad lumínica de 190 µmol m^2 s^{-1} y 5% v/v de CO_2 (Benvenuti *et al.*, 2015). En condiciones a escala de laboratorio y bajo limitación de nutrientes, la productividad lipídica de *C. vulgaris* alcanzó hasta 1,425 g L^{-1} d^{-1}, también se observó una productividad de 0,33 g L^{-1} d^{-1} a gran escala, con alto contenido de ácidos grasos insaturados (Pribyl *et al.*, 2012).

Otro factor importante que afecta la acumulación de lípidos es el estrés por salinidad, que resultó en un aumento del contenido de lípidos de *Scenedesmus* sp., de 33% en comparación con 19% en condiciones de control (Pancha *et al.*, 2015). La adición de NaCl al 3% desencadenó una mayor acumulación de lípidos que el estrés por N en *Coelastrella* sp., 37% sobre 24%, sin embargo, el biodiesel producido no fue apto para climas fríos debido a su alto porcentaje de ácidos grasos saturados y poliinsaturados (Karpagam *et al.*, 2015). La adición de 200 mM de NaCl dio como resultado un 33% de lípidos en células de *Acutodesmus dimorphus*. Al mismo tiempo, también se observó un aumento de los lípidos polares sobre la fracción de lípidos neutros, una respuesta que parece ser específica de la especie (Chokshi *et al.*, 2017).

La acumulación de lípidos es una estrategia de protección celular frente al estrés osmótico que pueden causar diferentes sales, como es el caso del 40% y 44% de lípidos en *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus* sp. inducido por $CaCl_2$ (Srivastava *et al.*, 2017), lo que conduce a un mejor potencial de biodiesel de las microalgas. Además, la alta intensidad lumínica es otro factor que puede aumentar el porcentaje de lípidos en *Scenedesmus abundans*, del 21% por debajo de 40,5 µmol m^{-2} s^{-1}, al 33% por debajo de 81,0 µmol m^{-2} s^{-1} (Mandotra *et al.*, 2016).

El metabolismo heterótrofo se ha propuesto como una forma efectiva de mejorar la producción de biodiesel a partir de microalgas (Perez-Garcia *et al.*, 2011). En el caso de consorcios de microalgas cultivadas heterotróficamente en aguas residuales industriales, se registraron valores extremadamente altos de contenido de lípidos, que oscilaron entre 33% y 85%, en efluentes de almidón de papa; sin embargo, los porcentajes más altos estuvieron acompañados de bajas tasas de crecimiento (Jordaan *et al.*, 2018). En otros casos, la adición de glucosa y la deficiencia de nutrientes aumentaron la productividad de lípidos de cultivos mixtos de microalgas, la mixotrofía mejora las propiedades del biodiesel a través del aumento de ácidos grasos saturados (Chandra *et al.*, 2014).

Para superar los cuellos de botella asociados con los bajos rendimientos, la productividad tanto de la biomasa como de los lípidos se pueden aumentar sustancialmente a través de la ingeniería genética y las herramientas moleculares destinadas a la recombinación, el silenciamiento o la sobreexpresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos de las microalgas. Actualmente, se han propuesto varias estrategias, incluida la mejora del rendimiento bajo altos niveles de irradiación o la fijación mejorada de CO_2, la thioesterasa y la manipulación de la acil-CoA sintetasa para la liberación de FFA y la reducción del costo de procesamiento posterior como propiedades mejoradas del combustible a través

de la síntesis de ácido oleico y tocoferol (Chung *et al.*, 2017). El aumento de la acumulación de TAG y la síntesis de ácidos grasos insaturados se lograron a través de la desactivación de la enzima clave PLA2 (*Phospholipase A2*) en el alga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (Shin *et al.*, 2019), mejorando el potencial de síntesis de biodiesel.

2.2 Microalgas para producción de biogás

La biomasa de microalgas se puede explotar como materia prima en la digestión anaeróbica (DA) para la producción de biogás. La DA es un proceso ampliamente utilizado para el tratamiento de diversos residuos orgánicos, ya que se considera una tecnología eficiente que sirve para la gestión de residuos y la producción de biocombustibles (González-González *et al.*, 2018). La DA comprende cuatro etapas individuales, hidrólisis, acidificación, acetogénesis y metanogénesis, donde los materiales orgánicos se descomponen en biogás en condiciones anaeróbicas (Fig. 2). El biogás es una mezcla de CH_4 (60%-70%) CO_2 (20%-40%) y trazas de NH_3, H_2S y N_2 (Kendir y Ugurlu, 2018).

Para tener éxito en un proceso económicamente viable, se deben tener en cuenta parámetros como el tipo de inóculo, tipo de sustrato, tipo de biorreactor, tasa de carga orgánica, tiempo de retención hidráulica (TRH) de los biorreactores, pH operativo, y temperatura. Además de lo anterior, cuando las microalgas se utilizan como materia prima para la DA, sus especies, los posibles métodos de pretratamiento y los métodos de cultivo son los puntos clave que afectan la viabilidad del proceso (Ghimire *et al.*, 2017). En la Figura 2, se puede observar los pasos a seguir para la obtención de biogás a partir de DA de biomasa de microalgas y cianobacterias.

La DA de la biomasa de algas es un proceso que ocurre naturalmente cuando las células se depositan en zonas sin oxígeno y luz en el fondo de los cuerpos de agua, con emisiones de CH_4 estimadas de 525-715 x 10^6 t por año y una tasa anual creciente de 1% (Kwietniewska y Tys, 2014). El primer intento de investigación sobre el potencial bioquímico de metano de la biomasa de microalgas se publicó hace más de 60 años, donde la DA de microalgas verdes dio como resultado rendimientos de CH_4 comparables con las aguas residuales sin tratar (Golueke *et al.*, 1957). Estudios recientes demostraron que el contenido de CH_4 del biogás obtenido de la DA del ensilaje de maíz, sustrato ampliamente utilizado en biogás en la industria, es 7%-13% inferior al obtenido a partir de microalgas (Mussgnug *et al.*, 2010).

La composición de la biomasa microalgal en lípidos, carbohidratos y proteínas está relacionada con el rendimiento teórico de metano de las microalgas. Entre esos sustratos, los lípidos presentan el valor más alto con 1,390 L CH_4 g^{-1} SV, mientras que las proteínas y los carbohidratos siguen con 0,800 L CH_4 g^{-1} SV y 0,746 L CH_4 g^{-1} SV, respectivamente (Murphy *et al.*, 2015). De acuerdo con la literatura, la composición de la biomasa de microalgas depende de la especie, el crecimiento y las condiciones de cosecha, y los valores pueden variar significativamente (Kwietniewska y Tys, 2014; Kendir y Ugurlu, 2018).

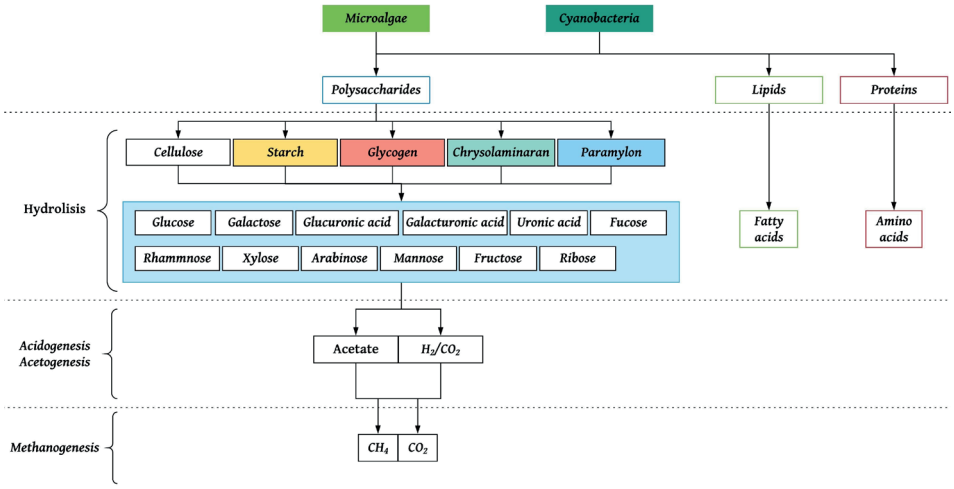


Figura 2. Pasos principales para la producción de biogás a partir de la digestión anaeróbica de la biomasa cosechada de cianobacterias y microalgas. Celulosa polimérica, almidón, glucógeno, crisolaminaran, paramylon, lípidos y proteínas se encuentran en microalgas y cianobacterias, adaptado de Maneein *et al.*, 2018.

Jankowska *et al.*, en una revisión reciente, informaron que el contenido de lípidos varía del 7% al 23%, el contenido de carbohidratos del 5% al 64% y el contenido de proteínas del 6% al 71% (Jankowska *et al.*, 2017). Los rendimientos reales de biogás obtenidos son inferiores a los valores calculados teóricamente, oscilando entre 0,47 y 0,79 L CH_4 g^{-1} SV, principalmente debido a las dificultades en la hidrólisis de la célula de microalgas, la baja relación C/N y otras condiciones operativas (Montingelli *et al.*, 2015).

La hidrólisis exitosa para una mayor explotación de la biomasa de microalgas depende de las características fisicoquímicas de su pared celular. La resistencia de la pared celular a las enzimas hidrolíticas está correlacionada con la complejidad de las moléculas que la forman. La mayoría de las paredes celulares de las especies de microalgas están compuestas de polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y pectina o glicoproteínas (Gerken *et al.*, 2013).

Schwede *et al.*, reportaron la existencia de una pared celular externa en algunas especies hecha de algaenan, (polímero de unidades n-alquilo de cadena larga, hasta C36, enlazadas con poliéter, con fracciones alifáticas y/o aromáticas) que no puede ser hidrolizado con métodos químicos o enzimáticos (Schwede *et al.*, 2011). Aunque *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. son las especies más estudiadas, tienen una pared celular dura que, en la mayoría de los casos, exige un tratamiento previo para aumentar la biodegradabilidad de la biomasa.

Se espera que las especies con paredes celulares delgadas o sin ellas sean más fáciles de fracturar y se conviertan en biogás u otros biocombustibles de manera más eficiente. Estas especies incluyen *Dunaliella* sp., que no tiene pared celular, y *Chlamydomonas* sp., que carece de celulosa (Kendir y Ugurlu, 2018). Se utilizan pretratamientos físicos, químicos y

enzimáticos o combinaciones de ellos para descomponer las paredes celulares y se evalúan en cuanto a su mejora de la biodegradabilidad de especies de microalgas específicas o su aplicación potencial en todos los tipos de biomasa de microalgas. La selección del método de pretratamiento adecuado es de gran importancia para la rentabilidad de todo el proceso (Jankowska *et al.*, 2017; Kendir y Ugurlu, 2018).

Se utilizaron bajas temperaturas (-75 ºC; -95 ºC) como pretratamiento térmico para la biomasa de microalgas cultivada en una planta piloto de tratamiento de aguas residuales. El rendimiento de metano registró un aumento del 70 % en comparación con la biomasa no pre-tratada, mientras que la ganancia de energía después del pretratamiento térmico fue de aproximadamente 2,7 GJ d^{-1}. La microscopía en muestras de digestato mostró solo especies con paredes celulares rígidas, como las diatomeas, lo que indica que el pretratamiento térmico fue efectivo y las células del resto de microalgas se rompieron (Passos y Ferrer, 2014).

Asimismo, Lavric *et al.*, informó la mejora del rendimiento de CH_4 después del pretratamiento térmico de una biomasa mixta de microalgas en un 62 %, mientras que el bioaumento con *Clostridium thermocellum* a 55 ºC mostró un incremento del 12 % (Lavric *et al.*, 2017). La hidrólisis enzimática de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. antes de la DA, derivó en un incremento en la producción de metano, 1,72 veces y 1,53 veces, respectivamente. La enzima probada que dio como resultado el mayor rendimiento de metano fue la proteasa, lo que indica que las proteínas eran el factor inhibidor de la DA y no las macromoléculas de los carbohidratos, como se piensa ampliamente (Mahdy *et al.*, 2016).

En este punto, vale la pena mencionar que la DA como proceso y el biogás como biocombustible presentan ventajas significativas en comparación con la producción de biodiesel o bioetanol, a saber:

1. Se valorizan todas las macromoléculas de la biomasa,
2. El digestato del proceso rico en nitrógeno y fósforo podría utilizarse como medio de cultivo de las algas,
3. No hay necesidad de secado o extracción de aceite,
4. Las células intactas o la biomasa restante de otros procesos se pueden utilizar como materia prima,
5. La más importante, el biocombustible (metano) se captura en la fase gaseosa (Jankowska *et al.*, 2017; Kendir y Ugurlu, 2018).

La co-digestión de la biomasa de microalgas con otros sustratos para equilibrar los altos niveles de nitrógeno y fijar la relación C/N en un valor óptimo para la DA, se propone como un método alternativo para mejorar el biogás obtenido y tratar otra biomasa rica en carbono (Rincón *et al.*, 2018). Sustratos como glicerol, lodos residuales activados, residuos de alimentos, paja de trigo, paja de cebada, estiércol de cerdo y residuos sólidos de molienda de aceitunas han sido co-digeridos con varias especies de microalgas, y dieron como resultado mayores rendimientos de metano en comparación con la biomasa de algas monodigeridas (Ehimen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Fernández-Rodríguez *et al.*, 2014; Herrmann *et al.*, 2016; Zhen *et al.*, 2016).

Bohutskyi *et al.* (2018) estudiaron la co-digestión de biomasa de algas y bacterias cultivadas en aguas residuales con celulosa, un sustrato que carece de nitrógeno, para determinar la relación C/N óptima. Los valores óptimos fueron 35%:65% biomasa alga-bacteria:

celulosa (20:80 basada en SV). La tasa de producción de metano aumentó un 35 %, mientras que la fase de latencia disminuyó un 50 %. Los investigadores también evaluaron cuatro modelos cinéticos para estimar la producción de energía total y la relación de energía neta en un sistema anaeróbico ampliado. El modelo cinético de Gompertz presentó una mejor precisión con respecto a la predicción de la producción de metano y tuvo el mejor ajuste a los datos experimentales entre los modelos probados (Bohutskyi *et al.*, 2018).

Las cáscaras de café residuales, una nueva biomasa de desecho que no ha sido ampliamente valorizada para la producción de energía hasta ahora, ha sido co-digeridas con biomasa de microalgas después de un pretratamiento térmico a 120 ºC durante 60 min. Las cascarillas de café co-digeridas pre-tratadas dieron un valor máximo de 196 mL CH_4 g^{-1} SV y la co-digestión aumentó en un 17 % el valor teórico de rendimiento de metano, en comparación con ambos sustratos tratados con DA por separado (Passos y Ferrer, 2014).

Además de la co-digestión, el desarrollo de sistemas anaeróbicos de dos etapas mejora el retorno de energía debido a la producción simultánea de hidrógeno, además, proporciona una mejor estabilidad. Los pasos de hidrólisis y acidificación se realizan por separado de la metanización en la configuración de dos etapas. Se utilizan diferentes biorreactores y operan en diferentes condiciones de pH. Las bacterias fermentativas anaerobias de la etapa de acidificación logran hidrolizar la célula rígida del alga en tiempos cortos (TRH cortos), y se fermentan macromoléculas para producir H_2, CO_2 y subproductos de bajo peso molecular como ácidos grasos volátiles, alcoholes, y ácido láctico.

El efluente líquido de este proceso se utiliza como materia prima para las bacterias metanogénicas que producen biogás en el segundo biorreactor. Este proceso también aumenta los rendimientos de metano en comparación con los sistemas de una etapa (Ding *et al.*, 2018). La microalga *C. vulgaris* se utilizó como materia prima en un sistema anaeróbico de dos etapas y dio como resultado 14,46 y 1,46 kJ g^{-1} SV en términos de producción de energía a partir de CH_4 y H_2, respectivamente, mientras que la producción directa de metano en los sistemas de una etapa es de 14,86 kJ g^{-1} SV (Wieczorek *et al.*, 2014). En otro estudio, la macroalga *Laminaria digitata* y la cianobacteria *Arthrospira platensis* fueron los sustratos del sistema anaeróbico continuo de dos etapas. Los mayores rendimientos alcanzaron los 55,3 mL g^{-1} SV para H_2 y 245,0 mL g^{-1} SV para CH_4. El rendimiento energético global (9,4 kJ g^{-1} SV) fue igual al 77,7 % del obtenido en un sistema tipo *batch* optimizado (Ding *et al.*, 2018).

Un enfoque holístico innovador con respecto a los métodos de producción de biogás es utilizar el digestato de la DA como fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas y mejorar el biogás producido a través de biomasa de microalgas para eliminar el CO_2. Este escenario de circuito cerrado es un proceso prometedor de cero desperdicios que aprovecha todas las corrientes participantes en DA y podría ser la solución clave para una biorrefinería eficiente y factible basada en microalgas (Koutra *et al.*, 2018).

2.3 Microalgas para producción de biohidrógeno

El hidrógeno (H_2) se considera un biocombustible muy prometedor ya que su rendimiento energético (122 kJ g^{-1}) por unidad de peso es tres veces superior al de los combustibles de hidrocarburos. Además, se caracteriza por una alta limpieza debido a la falta de CO_2 y solo a la producción de vapor de agua por su combustión. Hasta la fecha, los métodos

de producción de H_2 encierra el consumo de combustibles fósiles y se definen como procesos de alta huella de gases de efecto invernadero (GEI) que contradicen el concepto de combustible limpio (Ghimire *et al.*, 2015). Un enfoque alternativo a los procesos anteriores se basa en el uso de métodos biológicos para producir el llamado biohidrógeno. Como se presenta en la Figura 3, las microalgas pueden considerarse una plataforma sostenible para la producción de biohidrógeno, ya sea directamente de sus células a través de biofotólisis o indirectamente a través de la fermentación oscura de su biomasa (Buitron *et al.*, 2017).

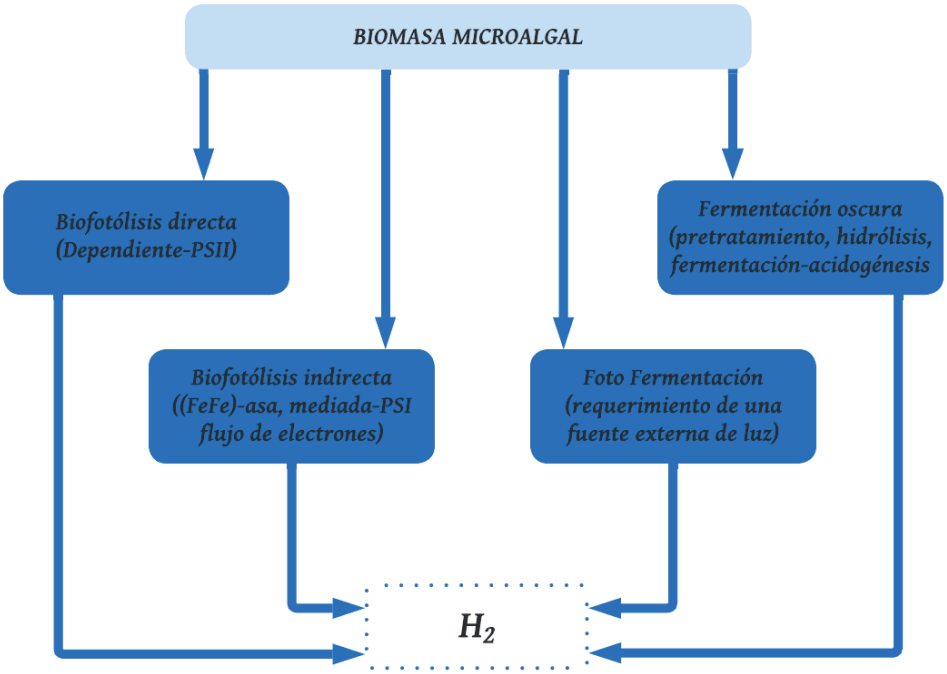


Figura 3. Rutas de producción de biohidrógeno a partir de biomasa de microalgas, adaptado de Buitron *et al.*, 2017.

2.3.1 Biofotólisis

La electrólisis biológica del agua a través de organismos fotosintéticos es la descomposición del agua en oxígeno e hidrógeno. El destino de este hidrógeno es reaccionar con el CO_2 y formar carbohidratos, mientras que el O_2 inicial se libera a la atmósfera. Gaffron y Rubin 1942, publicaron una investigación sobre la capacidad de las algas verdes, como *Scenedesmus obliquus* y *C. reinhardtii*, para liberar H_2 en determinadas condiciones (Gaffron y Rubin, 1942; Shuba y Kifle, 2018). Desde entonces, se han llevado a cabo muchos estudios de investigación para aclarar las vías del fenómeno de biofotólisis que siguen las algas verdes. *C. reinhardtii* se considera un microorganismo modelo para la investigación sobre este tema y una de las especies más prometedora para la producción de H_2 con este

método. Se han realizado intentos de modificación genética de esta especie, con una productividad elevada en comparación con los tipos salvajes. En algunos mutantes se observó una productividad de H_2 de más de 300 mL L^{-1} (Buitron *et al.*, 2017).

La descomposición del agua en la biofotólisis está catalizada por el fotosistema II (PSII) y la hidrogenasa-[FeFe] (contiene un centro conformado por dos átomos de hierro, el número de subunidades pequeñas cambia dependiendo del organismo, pero la subunidad grande siempre contiene al sitio activo bimetálico y un mínimo de cuatro clústeres de Fe-S, este tipo de enzimas se utiliza para la reacción de reducción de los protones.). La falta de azufre minimiza la producción de O_2 del PSII y crea condiciones anóxicas en el cultivo, lo que conduce a la síntesis y actividad de la hidrogenasa. En otras palabras, la regulación de la disponibilidad de azufre para la célula de algas puede interferir con el flujo de oxígeno interno y dar como resultado la producción de H_2 (Buitron *et al.*, 2017; Shuba y Kifle, 2018).

Aunque la biofotólisis es un método de producción de biocombustibles ecológico, su eficiencia es bastante baja (menos del 1 %) y el costo operativo es relativamente alto con las tecnologías y los conocimientos actuales. Vargas *et al.* (2018) estudiaron dos cepas de *Chlamydomonas* sp. cultivadas bajo privación de azufre en dos etapas: aeróbica y anaeróbica. Informaron una producción máxima de H_2 de C. *reinhardtii* de 5,95 ± 0,88 mmol mg^{-1} con una productividad de H_2 de 17,02 ± 3,83 mmol L^{-1} h^{-1}.

Un enfoque innovador para superar el efecto inhibitorio del O_2, que juega un papel crucial en la actividad de la hidrogenasa, es el uso de soportes de inmovilización o materiales de encapsulación para proteger las células de las algas (Antal *et al.*, 2015; Stojkovic *et al.*, 2015). En un estudio de las vías metabólicas de *C. reinhardtii*, se utilizó una fina película de alginato como vehículo de inmovilización. Se observó que el atrapamiento de las células elevó la ruta de producción de H_2 independiente del PSII y mantuvo altas tasas de productividad (Antal *et al.*, 2014).

Con la investigación continua y la evolución tecnológica, los métodos y condiciones de cultivo óptimos de cepas específicas y el desarrollo de fotobiorreactores eficientes pueden permitir una producción rentable de H_2 mediante biofotólisis para aplicaciones comerciales (Vargas *et al.*, 2016).

2.3.2 Bio-H_2 vía fermentación oscura

La fermentación oscura (*DF-Dark Fermentation*) es un método simple para la producción de H_2 a través de la valorización de varios desechos orgánicos que pueden usarse como materia prima. Los polímeros de cadena larga, como los carbohidratos, las proteínas y los lípidos, se hidrolizan mediante cultivos mixtos o puros que producen hidrógeno a través de dos vías principales:

6. La vía del acetato que tiene un rendimiento teórico de 4 mol H_2 a partir de 1 mol de glucosa y,
7. La vía del butirato con un rendimiento teórico de 2 mol H_2 a partir de 1 mol de glucosa (Sambusiti *et al.*, 2015).

Los microorganismos implicados en la *DF* son bacterias anaerobias facultativas u obligadas, como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter intermedius*, *Enterobacter cloacae*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium paraputrificum* (Mutanda *et al.*, 2011; Bharathiraja *et al.*, 2015).

La biomasa de microalgas se considera una materia prima atractiva para la *DF* debido a su alto contenido de carbohidratos, ya que estos últimos se han correlacionado con una alta productividad de H_2 (Ghimire *et al.*, 2017). La *DF* de las microalgas presenta una mayor tasa de producción que la fotofermentación, la biofotólisis y la electrólisis microbiana (Shobana *et al.*, 2017). Los esfuerzos de investigación sobre el uso de microalgas en *DF* se resumen en tres categorías principales:

1. Biomasa sin tratar,
2. Biomasa pre-tratada y,
3. Biomasa extraída de lípidos.

El tipo de biomasa tiene un efecto directo en la producción de H_2 ya que puede influir severamente la biodegradabilidad a través de la presencia de barreras químicas (Neves *et al.*, 2016). Los pretratamientos, como la disrupción celular con enzimas, la hidrólisis ácida, el tratamiento térmico e incluso la ultrasonicación, pueden aumentar el rendimiento final de H_2 y alcanzar entre el 50-70 % del valor teórico (Shobana *et al.*, 2017).

Las especies de microalgas más estudiadas para la producción de H_2 vía *DF* son *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Saccharina* sp., y dependiendo del pre-tratamiento de la biomasa, los rendimientos de hidrógeno van desde 0,37 mL H_2 g^{-1} SV para microalgas no tratadas hasta 338 mL H_2 g^{-1} SV para biomasa pre-tratada térmicamente e incluso 958 mL H_2 g^{-1} SV para *Chlorella* sp. después de combinar la hidrólisis ácida y el tratamiento térmico (Wang y Yin, 2018). En la Tabla 1 se presenta una comparación entre los dos procesos de producción de H_2, biofotólisis y fermentación oscura.

Tabla 1. Comparación de la producción de H2 de la Foto- y Fermentación oscura.

Parámetro	Fotofermentación	Fermentación oscura
Demanda de luz	+	-
Demanda de O2	-	-
Fórmula	$CH_3COOH + 2H2O + luz$ ® $4H_2 + 2CO_2$	$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O$ ® $12H_2 + 6CO_2$
Enzimas relacionadas	PSII, [Fe]-hidrogenasa	CoA, acetil-CoA
Microorganismos	Especies de algas y bacterias fotosintéticas (Anabaena variabilis, Rhodobacter sphaeroides)	Bacterias anaeróbicas (Escherichia coli, Clostridium, Sporolactobacillus)
Ventajas	Amplia gama de materias primas, amplio espectro de luz	Alta rentabilidad, altos rendimientos, amplia gama de materias primas
Desventajas	Fotobiorreactores costosos, dependencia de la luz, baja conversión de la eficiencia de la energía solar	Necesidad de tratamiento de efluentes, subproductos gaseosos adicionales (H2S, CO2, CO, CH4)

Microalgas para producción de bioetanol

El bioetanol se considera la alternativa más destacada a los combustibles fósiles, siendo Estados Unidos y Brasil, como se muestra en la Tabla 2, los países con los mayores volúmenes producidos hasta la presente (Doan *et al.*, 2012).

Tabla 2. Países productores del combustible bioetanol, 2018.

País (Región)	Producción (Millones Litros)	Materia prima
Estados Unidos	60.945	Maíz, trigo
Brasil	30.094	Caña de azúcar
Unión Europea	5.413	Maíz, trigo, remolacha azucarera, caña de azúcar, otros cereales, material lignocelulósico
China	4.467	Maíz, yuca, arroz
Canadá	1.817	Maíz, trigo
Tailandia	1.476	Caña de azúcar, melaza, yuca
India	1.249	Caña de azúcar, melaza
Argentina	1.098	Caña de azúcar
Resto del mundo	2.082	Varios

La biomasa de microalgas constituye un excelente sustituto de la materia prima de bioetanol de primera y segunda generación, como los cultivos comestibles y los materiales lignocelulósicos. Es un sustrato prometedor para el bioetanol de tercera generación, ya que enfrenta los desafíos de la materia prima de las generaciones anteriores (El-Dalatony *et al.*, 2017). El proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa de microalgas se presenta en la Figura 4.

La investigación sobre el tema aún está en sus inicios, aunque las microalgas presentan potenciales prometedores con respecto a la producción de energía renovable (Jambo *et al.*, 2016). El contenido de carbohidratos de los organismos marinos que podrían valorizarse puede alcanzar hasta el 50% del peso de la célula seca (Kim *et al.*, 2017).

Varios parámetros afectan el contenido intracelular total en carbohidratos, como las limitaciones de nutrientes, la temperatura de cultivo, los niveles de O_2, CO_2, la intensidad lumínica, el pH, la salinidad y la presencia de compuestos con efectos tóxicos (Jambo *et al.*, 2016). En general, las limitaciones de N y P parecen aumentar la acumulación de carbohidratos (Koutra *et al.*, 2020). Las especies de microalgas utilizadas para la producción de bioetanol juegan el papel más importante en la eficiencia del proceso, ya que el contenido de carbohidratos varía significativamente entre ellas. Según la literatura, *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Chlamydomonas* presentan una mayor acumulación de carbohidratos bajo condiciones y métodos de cultivo específicos (Jambo *et al.*, 2016; El-Dalatony *et al.*, 2017; Phwam *et al.*, 2018).

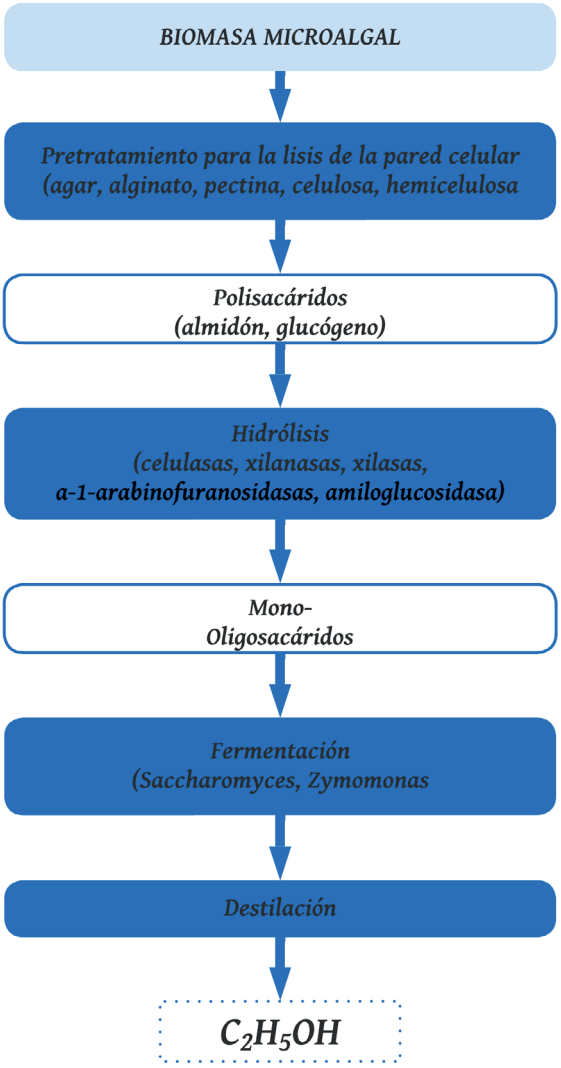


Figura 4. Producción de bioetanol a partir de biomasa de microalgas utilizada como materia prima.

Diferentes tipos de carbohidratos están presentes en la célula de microalgas. El agar, el alginato, la pectina, la celulosa y la hemicelulosa son elementos estructurales de la pared celular, mientras que el almidón y el glucógeno son los productos de almacenamiento en las microalgas y las cianobacterias, respectivamente (Martin-Juarez *et al.*, 2017). La ausencia de lignina en la biomasa de microalgas hace que esta última sea más susceptible a su conversión a monosacáridos, en comparación con otros materiales, como plantas o cultivos, de naturaleza lignocelulósica (Sanchez *et al.*, 2017). Además del contenido total

de carbohidratos, el método de extracción eficaz de este contenido juega un papel crucial en el rendimiento final de los azúcares que se fermentarán para producir etanol y debe elegirse minuciosamente para evitar una mayor degradación de los productos o un aumento de los costos operativos. Varios métodos de pretratamiento tienen como objetivo la lisis de la célula de alga y la hidrólisis de los polímeros de carbohidratos que se dividen en tres categorías principales: métodos de pretratamiento mecánico (físico), químico y enzimático o combinaciones de ellos (Phwam *et al.*, 2018).

2.3.3 Métodos mecánicos

Estos métodos se basan en el uso de fuerzas físicas para romper la pared celular. Se consideran métodos menos invasivos que los enfoques químicos o enzimáticos; así, se preserva la funcionalidad de los materiales de algas y se evita cualquier contaminación de la biomasa con otras sustancias. Los métodos mecánicos incluyen la ultrasonicación, la ruptura con perlas, y la homogeneización a alta presión. El ajuste térmico a altas temperaturas (superiores a 50 ºC) y la molienda generalmente se informan como métodos de pretratamiento para la extracción de lípidos y el aumento de biogás en los procesos de DA (Passos *et al.*, 2015).

Kim *et al.* (2017), evaluaron pretratamientos térmicos (autoclave a 121 ºC, 120 kPa durante 20 min), molienda (golpe de perlas) a 15 Hz durante 30 s y sonicación (24 kHz en 40 % de amplitud durante 15 min) en combinación con hidrólisis enzimática para producción de bioetanol a partir de *C. vulgaris* usando *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada. Los azúcares reductores producidos difirieron significativamente, la biomasa tratada con autoclave y sonicación no presentaron diferencias entre las células tratadas y no tratadas, en contraste con las muestras molidas. El último pretratamiento mostró un aumento del 25% en la tasa de conversión de azúcar (Kim *et al.*, 2017). Del mismo modo, un pretratamiento de 45 min con molienda de perlas utilizando perlas de zirconio dio como resultado una liberación del 68% de azúcares de las células de *N. oleoabundans* (Günerken *et al.*, 2016). La sonicación de *Chlamydomonas mexicana* en condiciones óptimas (a 40 kHz, 2,2 kW, 50 ºC durante 15 min) cuadriplicó los azúcares reductores totales (El-dalatony *et al.*, 2016).

La disminución de temperatura en los puntos de enfriamiento (4 ºC) y congelación (-20 ºC) y liofilización ha sido estudiada y evaluada como métodos de almacenamiento de biomasa de *Acutodesmus obliquus* en combinación con pretratamiento térmico (100 ºC durante 60 min), molienda, ultrasonidos, enzimas y combinaciones de ellos (Gruber-brunhumer *et al.*, 2015).

Los inconvenientes de los métodos mecánicos son los altos requisitos de energía que conducen a aumentos en los costos de producción y la falta de métodos específicos entre las diferentes fracciones de las células de algas (Martin-Juarez *et al.*, 2017).

2.3.4 Métodos químicos

Los reactivos químicos utilizados en estos métodos son ácidos que hidrolizan los enlaces glicosídicos o álcalis que saponifican los lípidos de la membrana celular y, por lo tanto, rompen la pared celular. Los parámetros claves que dictan el rendimiento final de los azúcares reductores producidos son: además, del tipo de reactivo utilizado, su concentración, la duración del tratamiento, la concentración de biomasa, así como las especies de microalgas y la temperatura (Lam y Lee, 2015). Los métodos químicos son relativamente fáciles de realizar, rentables y requieren tiempos relativamente cortos.

Entre los ácidos, el H_2SO_4 es utilizado comúnmente para la hidrólisis ácida de la biomasa de microalgas (Jambo *et al.*, 2016). *C. reinhardtii* se pre-trató con ácido sulfúrico al 3 % a 110°C durante 15 a 20 min y se logró una liberación de glucosa de hasta el 58 % (Nguyen *et al.*, 2014). Varias combinaciones de concentraciones de H_2SO_4 (0 %, 0,5 %, 1 %, 2 % y 4 % v/v), temperaturas (60, 90 o 120 ºC), duración (0, 15, 30 o 60 min), y la carga de biomasa (2,5 %, 5 % o 10 % p/v) se probaron para optimizar el pretratamiento de microalgas nativas de América del Sur con respecto a la extracción de azúcares (Sanchez *et al.*, 2017). Otros ácidos, como HNO_3, HCl y H_3PO_4, se han analizado como posibles reactivos de pretratamiento (Markou y Nerantzis, 2013).

Los tratamientos alcalinos se basan principalmente en el uso de NaOH. Hamouda *et al.* (2018), estudiaron la hidrólisis de *C. vulgaris* con métodos químicos y enzimáticos. En cuanto a la eficiencia de sacarificación, se compararon diferentes concentraciones de H_2SO_4 o NaOH y α-amilasa. Las mejores condiciones determinadas para la hidrólisis de *C. vulgaris* fueron una ronda de autoclave (20 min) y H_2SO_4 al 5%, donde se obtuvieron 382 mg g^{-1} de azúcares en peso seco. También se utilizó NaOH para el pretratamiento de *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*, cultivadas en aguas residuales municipales tratadas y evaluadas para la producción de bioetanol (Reyimu y Ozçimen, 2017).

El cuello de botella de estos métodos es la posible corrosión del equipo (dependiendo de la concentración del reactivo), la necesidad de modificar el pH antes de la fermentación y, lo que es más importante, la formación de compuestos tóxicos para las levaduras, como el furfural o el 5-hidroximetilfurfural, que podrían tener un efecto inhibitorio sobre el posterior proceso de fermentación (Martin-Juarez *et al.*, 2017). Las sustancias anteriores son el resultado de la degradación prolongada de los azúcares debido a las altas temperaturas y presiones, junto con las concentraciones de ácido o álcali utilizadas. Por lo tanto, elegir los valores óptimos de concentración, temperatura y presión del reactivo de reacción es esencial para lograr la eficiencia operativa (Lam y Lee, 2015).

2.3.5 Métodos enzimáticos

Las enzimas tienen la ventaja de la selectividad en el enlace que hidrolizan y requieren condiciones más suaves que los métodos químicos. La formación de subproductos se minimiza de esta manera, mientras que se obtienen altos rendimientos de azúcares reductores. Desde un punto de vista tecnoeconómico, los métodos enzimáticos se consideran más costosos que la hidrólisis química porque las enzimas no se pueden recuperar de manera efectiva, lo que lleva a un proceso inviable a gran escala, aunque con un consumo de energía significativamente menor (Lam y Lee, 2015).

Debido a los diversos polisacáridos en la célula de alga, se deben aplicar diferentes enzimas para su conversión a monómeros simples. Las celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y β-glucosidasa), xilanasas, xilasas, α-1-arabinofuranosidasa y amiloglucosidasa son las principales enzimas necesarias para la hidrólisis de las macromoléculas de carbohidratos que se encuentran en las células de las algas (Lam y Lee, 2015; Martin-Juarez *et al.*, 2017).

En un estudio se utilizó celulasa comercial de *Trichoderma reesei* para desarrollar un modelo cinético que describe la hidrólisis enzimática de celulosa a partir de biomasa mixta de microalgas para la producción de bioetanol. La temperatura, la concentración de biomasa y el pH fueron los parámetros investigados (Shokrkar *et al.*, 2018).

Hamouda *et al.*, informaron que la α-amilasa de *Bacillus subtilis* SH04 era más eficiente en términos de contenido final de azúcar obtenido de *C. vulgaris* que la α-amilasa de *B. cereus* SH06. El uso de la primera enzima dio como resultado una concentración de azúcares reductores de 220,46 ± 2,57 mg g^{-1} de biomasa, mientras que la última dio 107,34 ± 1,83 mg g^{-1} de biomasa (Hamouda *et al.*, 2018). *C. mexicana* se pre-trató enzimáticamente con celulasa para obtener un rendimiento total de azúcares reductores de 445,5 mg g^{-1} de biomasa y una concentración de etanol de 10,5 g L^{-1} (El-dalatony *et al.*, 2016).

El paso de la hidrólisis es seguido por la fermentación hacia la producción de bioetanol. La conversión de monómeros de azúcar en etanol por levaduras como *Saccharomyces* y bacterias como *Zymomonas* puede tener lugar en el mismo recipiente (fermentador) donde se realiza la hidrólisis (hidrólisis y fermentación simultáneas [SSF-*Simultaneous Hydrolysis and Fermentation*]) o en recipientes diferentes (hidrólisis y fermentación separadas [SHF-*Separated Hydrolysis and Fermentation*]) (Lam y Lee, 2015). Ambas estrategias presentan ventajas y desventajas. Con el *SHF* es más fácil controlar parámetros tanto de hidrólisis como de fermentación que afectan el producto final, como tiempo, temperatura y pH, y así optimizar cada proceso por separado.

También es factible ejecutar un modo de fermentación continua con reciclaje celular. Los inconvenientes de *SHF* incluyen la inhibición de la actividad enzimática del producto durante la hidrólisis; se necesitan concentraciones de enzima más altas y concentraciones de biomasa más bajas para lograr un rendimiento adecuado de bioetanol, lo que conduce a un aumento de los costos operativos; y finalmente, la hidrólisis separada requiere un tiempo más prolongado (hasta 4 días), y el riesgo de contaminación microbiana es relativamente alto (Sirajunnisa y Surendhiran, 2016).

El método *SSF* simplifica el proceso con un menor costo de capital requerido ya que solo se necesita un reactor para la hidrólisis (sacarificación) y la fermentación y se requiere menos tiempo operativo que el *SHF*. Sin embargo, como se indicó anteriormente, este enfoque hace que sea más difícil optimizar las condiciones, y la recuperación de enzimas y células de levadura es difícil. Por lo tanto, la operación de un sistema de escalado es compleja desde un punto de vista económico y técnico (Martin-Juarez *et al.*, 2017).

La estequiometria de la producción de etanol a partir de glucosa muestra que 0,511 $g_{etanol}/g_{glucosa}$ es el rendimiento máximo que se puede lograr:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

$$1g \rightarrow 0{,}511g + 0{,}489g$$

Singh *et al.* (2018), obtuvieron 0.116 $g_{etanol}/g_{biomasa\ algal}$ (0,305 $g_{etanol}/g_{glucosa}$) a través del proceso *SSF* usando *S. cerevisiae* para fermentar carbohidratos obtenidos de *Chlorella* sp. después del tratamiento con cicloheximida para aumentar su contenido de almidón (Singh *et al.*, 2018). La fermentación del medio de azúcar concentrado preparado después de la hidrólisis de la biomasa mixta de microalgas dio un rendimiento de etanol de 0,46 g $g_{glucosa}$ (Shokrkar *et al.*, 2018). Se obtuvo un valor teórico máximo del 87,4% con dos nuevas cepas, *Desmodesmus* sp. FG y una microalga verde aún no identificada (cepa SP2-3). El etanol alcanzó 24 $g_{etanol}/L_{hidrolizado}$ en *SHF* utilizando *S. cerevisiae* (Sanchez *et al.*, 2017).

2.4 Sub-productos de la biomasa de microalgas procesada

2.4.1 Microalgas para la formulación de biofertilizantes

Las microalgas se pueden utilizar como fertilizantes microbianos, también conocidos como biofertilizantes. Pueden actuar como fertilizantes de liberación lenta (Coppens *et al.*, 2016), liberando nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) de forma gradual. Esta liberación de nutrientes está comparativamente alineada con el patrón de demanda de nutrientes de la planta y, por lo tanto, se pueden prevenir las pérdidas de nutrientes, especialmente cuando se compara con fertilizantes de síntesis química (Mulbry *et al.*, 2007). Además, las microalgas contienen sustancias que promueven el crecimiento de las plantas y compuestos antifúngicos que pueden beneficiar aún más a las plantas (Spolaore *et al.*, 2006).

Aunque los fertilizantes de microalgas presentan valores comparativamente bajos de N, P y K, pueden ser muy eficientes debido a su mayor contenido de micronutrientes (Tabla 3). Wuang *et al.* (2016), informaron que el contenido de micronutrientes (calcio (Ca), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn) y selenio (Se)) de *Arthrospira platensis* (Spirulina) era mayor que en los fertilizantes comerciales. Estos micronutrientes juegan un papel esencial en el desarrollo de la planta: el calcio está involucrado en la producción de nuevas raíces y puntos de crecimiento; el hierro es un componente enzimático estructural; el manganeso juega un papel fundamental en la síntesis de clorofila y activa enzimas relacionadas con la asimilación de nitrógeno, el zinc contribuye a la síntesis de enzimas, y finalmente, el selenio, aunque no es esencial para la planta en sí, juega un papel vital en el metabolismo de humanos y animales herbívoros (Koutra *et al.*, 2020).

Las pruebas de mineralización en una población mixta de microalgas cultivadas en efluentes de estiércol de cerdo y lácteos mostraron que aproximadamente el 5% del N microalgal está en forma fitodisponible. Por el contrario, este valor aumentó hasta un 29% y un 41% después de 21 y 63 días de cultivo (Mulbry *et al.*, 2007). En el mismo estudio, los experimentos de fertilización con plántulas de maíz (*Zea mays* L.) presentaron un rendimiento similar al de los fertilizantes comerciales. Además del excelente patrón de mineralización, los fertilizantes microbianos ayudan a reducir las pérdidas de nutrientes.

En este sentido, Das *et al.*, utilizaron *Tetraselmis* sp. y *Nannochloropsis* sp. cultivadas en aguas residuales municipales para probar sus efectos en la fertilización del trigo. El fertilizante microbiano presentó mejor desempeño que el fertilizante comercial utilizado, posiblemente debido al lavado de nutrientes debido al riego, e igual cantidad de nitrógeno. Sin embargo, los autores recomiendan que se debe prestar atención cuando se utilizan microalgas marinas, ya que la aplicación recurrente puede aumentar la salinidad del suelo (Das *et al.*, 2019).

Tabla 3. Contenido de nutrientes de la biomasa de varias microalgas utilizadas como fertilizantes microbianos. Se presenta la composición de un fertilizante químico para comparación.

	Arthrospira platensis	Tetraselmis sp.	Nannochloropsis sp.	Chlorella sp.	Scenedesmus sp.	Nannochloropsis oculata	Flóculos de microalgas y bacterias	Fertilizante químico (NPK: 15-15-15)
N (%)	7,80	6,85	7,43	4,82	5,08	8,07	2,44	12,4
P (%)	0,80	0,82	0,75	0,28	0,36	1,29	0,59	6,6
K (%)	1,60	1,33	1,17	0,73	0,76	1,36	0,18	12,5
N:P:K	9,8:1:2	8,3:1:1,6	9,2:1:1,6	18:1:2,6	14:1:2,1	6,3:1:1,1	4,1:1.0,3	1,9:1:1,9
Ca (%)	0,40	2,54	1,49	0,68	0,66	0,20	20,4	0,10
Fe (ppm)	1057	1830	1370	2540	3190	328	143	455
Mn (ppm)	42	176	154	570	230	42,5	113	26,1
Zn (ppm)	155	63	41	1290	380	143	67	n/d
Se (ppm)	0,018	-	-	-	-	-	-	n/d
Referencia	Wuang *et al.*, 2016	Das *et al.*, 2018	Das *et al.*, 2018	Das *et al.*, 2018	Das *et al.*, 2018	Coppens *et al.*, 2016	Coppens *et al.*, 2016	Wuang *et al.*, 2016

"-", indica valores no disponibles; n/d, no detectado

La microalga marina *N. oculata*, así como los flóculos de microalgas y bacterias (flóculos *MaB*), se han probado como fertilizantes orgánicos de liberación lenta en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Maxifort y *Solanum lycopersicon* cv. Merlice) (Coppens *et al.*, 2016). El contenido de nitrógeno de las hojas fue superior al del fertilizante orgánico comercial, lo que demuestra las buenas propiedades fertilizantes nitrogenadas de los fertilizantes de microalgas. Por otro lado, la provisión de flóculos de *MaB* resultó en un menor contenido de potasio y magnesio. Esto último, sin embargo, rara vez resultó en una reducción del rendimiento del tomate. Finalmente, el tratamiento con *N. oculata* indujo deficiencia de calcio debido al estrés hídrico por aumento de la salinidad.

Además del aumento del rendimiento de la planta, se ha informado que las microalgas reducen el tiempo de germinación. García-González y Sommerfeld (2016) suministraron el cultivo y el extracto acuoso al 50% (tratamientos individuales) de *Acutodesmus dimorphus* sobre semillas de tomate Roma (*Solanum lycopersicum* var. Roma), la germinación fue en dos días más rápida que el control. Al mismo tiempo, el rendimiento de la planta aumentó, ya que una pulverización foliar de extracto acuoso de *A. dimorphus* al 50 % dio como resultado un mejor rendimiento de crecimiento (aumento de la altura de la planta y del número de flores y ramas por planta). Finalmente, la aplicación de biomasa seca 22 días antes del trasplante de las plántulas resultó en un mejor desempeño del crecimiento.

Wuang *et al.* (2016), determinaron que la eficacia de los fertilizantes de microalgas depende de la especie vegetal. El efecto de los fertilizantes a base de *Spirulina* se probó en rúcula (*Eruca vesicaria*), espinaca roja (*Amaranthus tricolor*), *Pak Choy* (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*), col china (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*), *Kai Lan* (*Brassica oleracea alboglabra*), y *White Crown* (*Brassica rapa* spp. *chinensis*, F1 híbrido). En general, este estudio demostró la mejora significativa del crecimiento de la espinaca roja, rúcula y *Pak Choy*, que presentaron un rendimiento similar al de las plantas cultivadas con fertilizante de síntesis química. Por su parte, la germinación de la col china y *Kai Lan* aumentó notablemente (en peso seco de planta). El

desempeño de crecimiento de la espinaca roja mejoró (58% - 156%) en parámetros de crecimiento como altura de la planta, peso fresco y seco, en comparación con el control.

Al mismo tiempo, el rendimiento general del crecimiento fue comparable con el fertilizante comercialmente disponible probado (Triple NPK 15-15-15), únicamente el pesos fresco y seco de las plantas cultivadas con *Spirulina* fueron inferiores. La rúcula cultivada con *Spirulina* presentó resultados prometedores, con todos los parámetros de crecimiento comparables con las plantas cultivadas con fertilizante comercial. *Pak Choy* cultivado con Spirulina presentó raíces más largas que el control, similar a las plantas cultivadas con fertilizante comercial. La germinación de semillas, un indicador esencial para el rendimiento de campo de la planta, en todas las plantas probadas excepto *White Crown*, se incrementó significativamente mediante el uso del fertilizante Spirulina (Wuang *et al.*, 2016).

Varios estudios informan el aumento en el rendimiento y la calidad de los cultivos mediante el uso de fertilizantes de microalgas. Por ejemplo, dos consorcios de microalgas, uno (MC_1) compuesto por microalgas unicelulares (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlorococcum* y *Chroococcus* sp.) y el segundo (MC_2) compuesto por cepas filamentosas (*Phormidium*, *Anabaena*, *Westiellopsis*, *Fischerella* y *Spirogyra* sp.), fueron probados como fertilizante microbiano en el cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Renuka *et al.*, 2016). Ambos fertilizantes de microalgas dieron como resultado un aumento notable en el contenido de N, P y K de las raíces, brotes y granos, mientras que aumentaron en un 7,4 %-33 % el peso seco de la planta. Lo relevante, el peso de 1000 granos aumentó hasta un 8,4 % en comparación con la provisión de una dosis completa de fertilizante de síntesis química.

Esto fue confirmado por Dineshkumar *et al.* (2017), quienes observaron un aumento del 7% al 21% en el rendimiento del arroz al suministrar fertilizante microbiano en base de *C. vulgaris* y *A. platensis*. Los autores de este estudio encontraron que la adición de biomasa seca de microalgas presenta mejores resultados que la aplicación de una solución al suelo.

En el estudio de Coppens *et al.* (2016), los fertilizantes de microalgas presentaron resultados comparables con el fertilizante orgánico comercial y mejoraron la calidad de la fruta del tomate al aumentar el contenido de azúcar y carotenoides hasta un 18% y 44%, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en el número de frutos; sin embargo, se observó un menor rendimiento a través de los tratamientos con algas. Esto podría atribuirse a la mayor salinidad, que limita la entrada de agua de la fruta, o al suministro de amonio como fuente de nitrógeno (en lugar de nitrato, que es la fuente preferida de nitrógeno). Cuando se probó la Spirulina en plantas de frijol mungo (*Vigna radiata* L.), los resultados mostraron una alta tasa de crecimiento del cultivo, materia seca, índices de cosecha y rendimiento (Aung, 2011).

Otros autores evaluaron el uso de un biofertilizante en base de *C. vulgaris* en lechuga (*Lactuca sativa*), los resultados mostraron que la aplicación de esta microalga aumenta significativamente el crecimiento de la lechuga (peso fresco y seco) y el contenido de pigmentos (Faheed y Abd-El Fattah, 2008). Safinaz y Ragaa (2013) estudiaron el efecto del uso de algas marinas rojas en plantas de maíz (*Z. mays* L.), las microalgas analizadas fueron *Laurencia obtusa*, *Corallina elongata* y *Jania rubens*. Todos los tratamientos presentaron resultados promisorios, con la aplicación de *L. obtusa* y *C. elongata* aumentando el peso fresco de la planta en un 90,9%. El contenido de fósforo de la planta aumentó hasta un 74,0 %, mientras que la aplicación en *J. rubens* resultó en un aumento de nitrógeno del 129 %.

Se espera que se produzcan grandes cantidades de biomasa extraída de lípidos a través de la producción de biodiesel de microalgas a gran escala. Un enfoque sostenible requiere una mayor valorización de esta biomasa. En ese contexto, Maurya *et al.* (2016), probaron el uso de *Chlorella variabilis* mediante extracción de lípidos y biomasa de *Lyngbya majuscula* como fertilizante para maíz (*Z. mays* L.). Ambos tratamientos incrementaron el rendimiento de grano, mientras que *L. majuscul*a resultó en un mayor contenido de P y K en el grano. Por otro lado, el tratamiento con *C. variabilis* resultó en el mayor contenido de carbohidratos y grasa cruda (Maurya *et al.*, 2016).

Aunque los fertilizantes de microalgas presentan resultados prometedores, se deben realizar más investigaciones para dilucidar su efecto sobre el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos y establecer la composición óptima del fertilizante. En este sentido, Coppens *et al.* (2016), recomendaron que la mezcla óptima de fertilizantes para lograr buenos rendimientos de fruta de alta calidad estaría compuesta principalmente por una mezcla de fertilizantes inorgánicos (que contienen nitrato) y un porcentaje menor de fertilizante de microalgas. Sin embargo, las composiciones de los ingredientes aún no se han identificado. Además, la investigación debe centrarse en establecer el efecto de las diferentes dosis y formas de fertilizante microbiano suministrado (p. ej., células viables frente a células no viables). Finalmente, se requieren ensayos de campo para evaluar los efectos a largo plazo del fertilizante microbiano en el campo y las propiedades del suelo (Koutra *et al.*, 2020).

2.4.2 Microalgas para piensos animales

Las microalgas han ganado reconocimiento como complemento alimenticio debido a su alto valor nutricional y su integridad como fuente de alimento. Presentan el potencial para sustituir ingredientes de uso común como la harina de soja y, por lo tanto, pueden aliviar la competencia entre alimento/pienso/biocombustible (Madeira *et al.*, 2017). Son nutricionalmente completas (García-Garibay *et al.*, 2014; Hayes *et al.*, 2017) por las siguientes razones:

1. Contienen altas cantidades de proteína. Esta proteína a menudo se denomina proteína unicelular o proteína microbiana, y el contenido de microalgas puede oscilar entre el 8 % y el 71 % (Tabla 4).
2. El perfil de aminoácidos está bien equilibrado, a excepción de los aminoácidos que contienen azufre, la metionina y la cisteína. Específicamente, los aminoácidos se pueden clasificar en aminoácidos nutricionalmente esenciales (*EAA-Essential Amino Acid*) y aminoácidos nutricionalmente no esenciales (*NEAA-Non-Essential Amino Acid*). Los *EAA* no se pueden sintetizar de novo y, para los animales, incluyen cisteína (Cys), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), tirosina (Tyr) y valina (Val). Por el contrario, los *NEEA* incluyen arginina (Arg), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), glicina (Gly) y prolina (Pro). Los *NEAA* son esenciales para el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la salud y la supervivencia y, por lo tanto, deben incluirse en la alimentación animal (Wu, 2014). Todos estos aminoácidos son producidos por microalgas (García-Garibay *et al.*, 2014).

3. Contienen lípidos en un porcentaje que varía entre el 16% y el 75%, siendo los más importantes los PUFA, específicamente el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido araquidónico (AA) y el ácido γ-linolénico (Safinaz y Ragaa, 2013).
4. Contienen 8%-57% (Tabla 4) de carbohidratos, como almidón, azúcares, celulosa y polisacáridos, caracterizados por una excelente digestibilidad. Estos carbohidratos contienen una cantidad significativa de fibra dietética, lo que beneficia al sistema digestivo de los animales. Dado que los carbohidratos constituyen la parte esencial de la alimentación del ganado y la fuente de energía, esta característica los convierte en un ingrediente de alimentación animal de enorme interés (Madeira *et al.*, 2017).
5. Encierran pigmentos en sus células, es decir, clorofilas, carotenos, xantofilas y ficobiliproteínas que actúan como antioxidantes (Koutra *et al.*, 2020).
6. Son una fuente esencial de vitaminas (A, grupo B, C, D y E), incluyendo tiamina, riboflavina y ácido fólico, mientras que también contienen B_{12} (cianocobalamina).
7. Finalmente, la investigación ha demostrado que, debido a otros compuestos bioactivos contenidos dentro de las células, pueden tener propiedades antivirales, antitumorales, antiinflamatorias, antialergénicas, antidiabéticas y antibacterianas (de Jesus Raposo *et al.*, 2013), así como efectos hipocolesterolémicos e hipotrigliceridémicos (Navarro *et al.*, 2016).

Tabla 4. Contenido proteico y de carbohidratos en microalgas comúnmente utilizadas como piensos/fuente alimenticia, se presentan en porcentaje (%) de base de peso seco.

	Contenido proteico (%)	Contenido de carbohidratos (%)
Arthrospira maxima (Spirulina)	46 – 71	13 – 16
Arthrospira platensis (Spirulina)	46 – 70	8 – 14
Chlorella vulgaris	38 – 58	12 – 17
Chlorella sp.	40 – 58	–
Haematococcus pluvialis	45 – 52	–
Nannochloropsis oculata	22 – 49	–
Porphyridium cruentum	8 – 58	40 – 57
Referencias	Becker, 1994; García-Garibay *et al.*, 2014; Safi *et al.*, 2014	

"–", indica valores no disponibles

Sin embargo, existen algunas limitaciones con respecto al uso de microalgas como alimento (García-Garibay *et al.*, 2014; Navarro *et al.*, 2016):

1. La composición celular varía según las condiciones de cultivo y la composición del medio; por lo tanto, la investigación debe centrarse en establecer el efecto de estos parámetros de proceso para lograr resultados comparativos (Koutra *et al.*, 2020).
2. Los aminoácidos metionina y cisteína que contienen azufre se encuentran comúnmente en concentraciones limitantes y, por lo tanto, necesitan ser suministrados externamente; La pared celular rígida hace que las microalgas no sean digeribles para algunos animales, especialmente los monogástricos (Madeira *et al.*, 2017).

Esto requiere la implementación de técnicas de pretratamiento, como el tratamiento mecánico o térmico, para que las células se rompan y los nutrientes encerrados estén biodisponibles para los consumidores potenciales. Madeira *et al.* (2017), señalaron que se espera que las enzimas activas en carbohidratos (CAZymes-*Carbohydrate Active Enzymes*) aumenten la eficiencia de las microalgas en las dietas de animales monogástricos al inducir la ruptura de la pared celular. Estas enzimas ya son aceptadas como aditivos alimentarios para aves y cerdos (Madeira *et al.*, 2017). Finalmente,

3. El alto contenido de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de alimentos puede conducir a la formación de gota y cálculos renales, debido a la acumulación de ácido úrico debido al metabolismo de las purinas. El contenido de ácidos nucleicos puede oscilar entre el 2,9% y el 5% para algas eucariotas y entre el 1% y el 17% para cianobacterias. Este último requiere pasos de procesamiento posteriores, por ejemplo, tratamiento de choque térmico, para reducir el contenido de ácido nucleico (Trevelyan, 1978).

Las microalgas han demostrado ser nutritivas cuando se incluyen en la alimentación en acuicultura, cerdos, aves, ovejas, vacas y mascotas (Madeira *et al.*, 2017). Algunos requisitos específicos para el uso de microalgas como alimento o ingredientes de alimentos son (Hayes *et al.*, 2017):

1. Aceptación por parte del animal;
2. Nutricionalidad y digestibilidad del producto;
3. Ausencia de toxinas;
4. Efecto sobre el aumento de peso de los animales;
5. Olor y sabor del producto. Sin embargo, cada animal presenta diferentes respuestas a los alimentos que contienen microalgas y, por lo tanto, la aplicación se centrará en diferentes categorías de animales (Koutra *et al.*, 2020).

2.4.2.1 Piensos para acuacultura y camarón

Dada la proyección de que la biomasa de microalgas es muy demandada en aplicaciones acuícolas (Anemaet *et al.*, 2010), se ha puesto un fuerte enfoque en esta aplicación de microalgas. Las cepas comúnmente utilizadas en la alimentación acuícola pertenecen a los géneros *Haematococcus*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum* y *Tetraselmis* (Chauton *et al.*, 2015), así como a las diatomeas *Skeletonema* y *Thalassiosira* (Ghosh *et al.*, 2016).

Las microalgas se pueden utilizar como alimento para herbívoros (Hayes *et al.*, 2017), carnívoros (Patterson y Gatlin, 2013), y peces juveniles omnívoros (Barone *et al.*, 2018). Aparte de la nutrición de los peces, las microalgas también se utilizan como alimento para moluscos (almejas, ostras y vieiras) (Ghosh *et al.*, 2016), y camarones (Harun *et al.*, 2010). Las algas *Hypnea cervicornis* y *Cryptonemia crenulata* se utilizaron con éxito en ensayos de alimentación de camarones, lo que resultó en un aumento significativo en la tasa de crecimiento de los camarones (Harun *et al.*, 2010). Se pueden suministrar en forma de pasta, polvo, gránulos (Hayes *et al.*, 2017), vivas o deshidratadas (Ghosh *et al.*, 2016).

Los parámetros críticos para el éxito de las microalgas como alimento para la acuicultura son el contenido de PUFA y pigmentos, ya que ambos comprenden ingredientes que

son esenciales para la nutrición de peces y camarones (Yaakob *et al.*, 2014). Algunos peces marinos no pueden convertir los ácidos grasos C18 en C20 y C22; por lo tanto, las microalgas pueden reemplazar potencialmente los PUFAs (EPA y DHA) esenciales de la harina de pescado (Tocher, 2015). Las microalgas marinas *Pavlova viridis* y *Nannochloropsis* sp. mostraron resultados prometedores como fuente de PUFAs como el EPA y DHA en la alimentación de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax* L.), en sustitución del aceite de pescado (Haas *et al.*, 2016).

En cuanto a los pigmentos, la astaxantina presenta efectos beneficiosos en los peces; específicamente, además del aumento de la pigmentación, aumenta la supervivencia y mejora el rendimiento del crecimiento, la reproductividad y la resistencia a las enfermedades. Una microalga conocida por su alto contenido de astaxantina es *Haematococcus pluvialis* (Lim *et al.*, 2017). La clorofita *H. pluvialis* ha sido aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) como ingrediente de alimentos que mejoran el color de los salmónidos (FDA, 2018). Finalmente, la harina de microalgas extraída de lípidos obtenida de *Navicula* sp., *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis salina* mostró resultados prometedores en ensayos de alimentación con juveniles de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) (Patterson y Gatlin, 2013). Patterson y Gatlin demostraron que es posible sustituir el 10 % de la proteína cruda de harina de soja o harina de pescado, y señalaron que toda la biomasa de microalgas es más nutritiva y apetecible.

2.4.2.2 Piensos de microalgas para animales monogástricos

Las microalgas de los géneros *Chlorella*, *Dunaliella*, *Desmodesmus*, *Nannochloropsis*, *Oocystis*, *Porphyridium*, *Scenedesmus*, *Arthrospira* (Spirulina) y *Staurosira* han mostrado resultados prometedores en la alimentación de animales monogástricos (Hayes *et al.*, 2017). Sin embargo, hay datos limitados disponibles sobre el efecto de las inclusiones de microalgas en el pienso para este tipo de animales (Koutra *et al.*, 2020).

Las aves de corral ha sido el objetivo para la utilización de piensos de microalgas, ya que presentan excelentes usos comerciales; por ejemplo, ya se pueden encontrar en el mercado huevos enriquecidos con DHA derivados de la alimentación con microalgas (Madeira *et al.*, 2017). Las características más influenciadas por la incorporación de microalgas en el alimento, son la piel de las aves y el color de la yema (Yaakob *et al.*, 2014).

Las microalgas proporcionadas en un contenido de hasta el 10 % en el alimento para aves de corral han presentado resultados prometedores, que incluyen una mayor resistencia a las enfermedades, una disminución del colesterol y un mejor color de la yema (más oscuro) (Hayes *et al.*, 2017). Este último se atribuye principalmente al β-caroteno y otros carotenoides producidos por microalgas, especialmente *Dunaliella* sp. Además, se ha informado que la suplementación con *A. platensis* en el alimento aumenta el contenido de EPA y DHA en la carne del muslo (Bonos *et al.*, 2016). Otros estudios informan carne de pechuga enriquecida con PUFAs (EPA y DHA) a través de la alimentación con *Schizochytrium* sp. (Madeira *et al.*, 2017). Finalmente, las aves alimentadas con *Porphyridium* sp. produjeron yema de huevo con colesterol reducido y color mejorado (Ginzberg *et al.*, 2000).

Los trabajos sobre la inclusión de microalgas en la alimentación porcina presentan resultados prometedores. Los ensayos de alimentación con *Laminaria digitata* revelaron que la inclusión de algas en el forraje podría aumentar el peso diario de los cerdos hasta

en un 10 % (He *et al.*, 2002). Además, *Desmodesmus* sp. que contenían proteasa y enzimas que degradan polisacáridos diferentes del almidón (NSPase-*Non Starch Polysaccharide Enzymes*) dieron como resultado un rendimiento comparable al de los alimentos de control en cerdos (Ekmay *et al.*, 2014). Cuando *Schizochytrium* sp. se utilizó como aditivo para piensos, el contenido de DHA de la carne de cerdo aumentó (Vossen *et al.*, 2017), mientras que la inclusión de *A. platensis* en los piensos para cerdos dio lugar a un aumento de hasta un 26 % en la ganancia de peso diaria media (Simkus *et al.*, 2013).

Igualmente se ha evaluado la alimentación con microalgas a animales no para la producción de proteína, así, Skrede *et al.* (2011), evaluaron las microalgas *Nannochloropsis oceanica*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana*, se alimentaron a 60, 120 y 240 g kg^{-1}, reemplazando la harina de pescado en la alimentación del visón (*Mustela vison*). Las microalgas *N. oceanica* y *P. tricornutum* tuvieron un contenido de proteína cruda (PC) similar (47,7 y 49,0 %, respectivamente), composición de aminoácidos y contenido de lípidos (8,4 y 7,4 %, respectivamente), mientras que *I. galbana* contenía un 20,1 % PC y 16,2% de lípidos. Concluyeron que, de las especies de microalgas evaluadas, *P. tricornutum* era la fuente preferible de nutrientes digeribles.

2.4.2.3 Piensos de microalgas para animales poligástricos (rumiantes)

El sistema digestivo de los rumiantes los convierte en los candidatos más aptos para digerir las microalgas. Su complejo sistema digestivo es adecuado para la digestión de las paredes celulares recalcitrantes que pueden contener celulosa (Hayes *et al.*, 2017). Sin embargo, la literatura sobre el efecto de una dieta de microalgas en rumiantes es bastante limitada. Digestibilidad *in vitro* de extractos de lípidos de *Nannochloropsis* sp. o *Chlorella* sp. presentó un comportamiento similar a la harina de soja (Lodge-Ivery, 2014). Además, los ensayos de alimentación de ganado con *Arthrospira* sp. dio como resultado un mayor aumento de peso y peso final, una mejor ingesta de alimento y fertilidad mejoró el sistema inmunológico y aumentó la producción de leche y el contenido de proteínas (Hayes *et al.*, 2017).

La investigación muestra que *A. platensis* muestra resultados prometedores cuando se suministra como ingrediente de alimentos para promover el crecimiento en el ganado (Yaakob *et al.*, 2014; Madeira *et al.*, 2017). Los resultados también mostraron que la incorporación de PUFAs en su dieta da como resultado un mayor contenido de EPA y DHA en su carne (Madeira *et al.*, 2017). Finalmente, proporcionando *Schizochytrium* sp. en vacas lecheras redujo la grasa de la leche y aumentó el ácido linolénico conjugado (Boeckaert *et al.*, 2008).

En vacas, la cantidad máxima de microalgas ingeridas sin efectos sobre el consumo de alimento varía en diferentes estudios en un rango bastante amplio de 4 a 79 g de microalgas kg^{-1} de materia seca en la dieta (Weatherly, 2015; Stamm, 2015). La disminución depende del tipo de alimento, por ejemplo, se aceptan productos a base de harina de algas en vacas lecheras hasta inclusiones de 10-11g kg^{-1} de materia seca ingerida (Boeckaert *et al.*, 2008; Moate *et al.*, 2011), mientras que la harina compuesta por microalgas desgrasadas y cascarilla de soja, parecen ser mejor toleradas, hasta 92 g kg^{-1} de materia seca (da Silva *et al.*, 2016). Por otro lado, estudios sobre la suplementación con aceite de algas han demostrado que no afecta el consumo en vacas si se integra hasta 194 g $día^{-1}$ por cabeza (Stamey *et al.*, 2012). En ovejas, se observó una reducción en

la ingesta de concentrado con una suplementación de biomasa de algas de aproximadamente 12 g kg^{-1} (valor estimado) de la ración (Papadopoulos *et al.*, 2002).

En general, el efecto más destacado de la suplementación con microalgas en el forraje se refiere al aumento de PUFAs, por ejemplo, EPA y DHA, en la carne, la leche y los huevos. Sin embargo, se requiere más investigación para determinar el efecto de cada elemento nutricional de microalgas en una dieta animal.

2.4.3 Microalgas para elaborar compuestos bioactivos

Las microalgas han sido ampliamente reconocidas como productoras destacadas de muchos productos naturales, aplicables en varios sectores, incluidos energético, nutrición, farmacéutico y cosmético. La actividad de los ingredientes de microalgas extraídos o liberados de las células de microalgas se ha probado y confirmado durante mucho tiempo, como se ha descrito ampliamente en varias investigaciones (Caporgno y Mathys, 2018; Bule *et al.*, 2018). En el marco de un enfoque integrado de biorrefinería, los compuestos bioactivos pueden mejorar significativamente la economía de la tecnología de microalgas debido a sus altos valores de mercado (Koller *et al.*, 2014).

Entre los componentes de la biomasa más prevalentes, aunque en una fracción menor en comparación con los lípidos, los carbohidratos y las proteínas, los pigmentos han recibido un gran interés biotecnológico e industrial debido a sus propiedades nutricionales y farmacéuticas, principalmente neuroprotectoras, antibióticas y antiinflamatorias (Begum *et al.*, 2016).

Los pigmentos de microalgas, incluidas las clorofilas, los carotenoides y las ficobilinas, son de vital importancia para el metabolismo fotosintético que poseen estos microorganismos, y que se basa en el aprovechamiento de la luz y la disipación del exceso de energía, manteniendo el funcionamiento adecuado y la integridad de las células de las algas. Debido a su alta actividad antioxidante y su uso como pigmentos naturales, suplementos nutricionales e ingredientes cosméticos, los pigmentos más conocidos incluyen clorofilas, β-caroteno, astaxantina, violaxantina, luteína y fucoxantina. La acumulación de los pigmentos fotosintéticos y las clorofilas a y b más abundantes depende de varios factores, incluidas las especies utilizadas y varias condiciones ambientales (da Silva Ferreira y Sant´Anna, 2017).

Generalmente se observa un aumento en la concentración de clorofila con una baja intensidad lumínica, debido a la adaptación a la sombra. En contraste, la reducción de clorofila se puede mantener bajo el agotamiento de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, una tendencia que también se observa durante la deficiencia de micronutrientes (Koutra *et al.*, 2020).

La acumulación de pigmentos fotosintéticos accesorios, los carotenoides, se desencadena por condiciones ambientales desfavorables, que incluyen una alta intensidad lumínica y temperaturas más altas, así como estrés osmótico (Markou y Nerantzis, 2013). Los extractos de carotenoides de *H. pluvialis*, como fuente principal de astaxantina natural, y *Dunaliella salina*, una microalga conocida por la producción de β-caroteno, se evaluaron en términos de actividad antitumoral, lo que sugiere su alto papel protector de la salud (El-Baz *et al.*, 2018). Además, los carotenoides extraídos de *N. oleoabundans*, compuestos principalmente de luteína, violaxantina y monoésteres, se probaron de manera efectiva

contra las células de cáncer de colon, y la actividad antitumoral se correlacionó principalmente con los monoésteres de carotenoides (Castro-Puyana *et al.*, 2017).

Otro pigmento objetivo es la fucoxantina, que es producida principalmente por algas pardas. La fucoxantina es bien conocida por su alta actividad antioxidante, que contribuye a la prevención de muchas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, mientras que la actividad antidiabética, antitumoral y la quimioprevención se han atribuido al consumo de fucoxantina (Mikami y Hosokawa, 2013). Mediante la regulación adecuada de las condiciones de cultivo, la productividad de fucoxantina de *Phaeodactylum tricornutum* alcanzó 2,3 mg L^{-1} d^{-1} (McClure *et al.*, 2018).

Los PUFAs, incluidos EPA, DHA, γ-linolénico y ácido araquidónico (AA), representan productos objetivo valiosos de la biomasa de microalgas como alternativas prometedoras al aceite de pescado (Borowitzka, 2013). El cultivo de microalgas para la producción de PUFAs debe estar bien determinado, ya que el contenido de ácidos grasos de cadena larga se ve significativamente afectado por las especies utilizadas, las condiciones ambientales como la intensidad y calidad lumínica, la temperatura y el suministro de carbono, así como por la fase de crecimiento del cultivo (Boelen *et al.*, 2017).

El consumo de PUFAs ofrece numerosos beneficios para la salud contra las enfermedades cardiovasculares, el deterioro cognitivo y los trastornos mentales como la depresión (Shahidi y Ambigaipalan, 2018). Bajo condiciones fotoautotróficas optimizadas, la máxima productividad de EPA de la diatomea marina *Fistulifera solaris* alcanzó hasta un valor de 136 mg L^{-1} d^{-1}, lo que sugiere su uso potencial para la producción de EPA a gran escala (Tanaka *et al.*, 2017). Además, el EPA y el ácido araquidónico producidos por *Koliella antarctica*, cultivados a bajas temperaturas, representaron el 4,9 % y el 3,5 % del total de AG, respectivamente (Suzuki *et al.*, 2018).

Los polímeros generalmente excretados para inducir la adhesión celular y mantener la vitalidad celular en condiciones de estrés también son productos de microalgas cotidianos con varios usos potenciales. Las sustancias poliméricas extracelulares, EPS, comúnmente compuestas por polisacáridos, proteínas, lípidos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, están involucradas en múltiples procesos biológicos y aplicaciones tanto médicas como industriales (Xiao y Zheng, 2016).

La producción de EPS por la clorofita *Netrium digitus* inmovilizada, aumentó en condiciones de alta intensidad lumínica, concentración de nitrógeno y acidez (Ekelhof y Melkoniam, 2017). Además, las condiciones óptimas de luz y nitrógeno dieron como resultado una producción de EPS de 2 mg mL^{-1} en cultivos de *Botryococcus braunii* (Cepák y Pribyl, 2018). Extractos de EPS de *Gloeocapsa* sp. han mostrado una alta actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias Grampositivas, Gramnegativas y hongos, con concentraciones inhibidoras de extractos que varían de 0,125 a 1 mg mL^{-1} (Najdenski *et al.*, 2013).

Dependiendo del solvente utilizado para producir extractos de microalgas (acetona, metanol, etanol, cloroformo, agua, hexano), se entregan diferentes compuestos, incluidos fenoles, flavonoides, taninos, ácidos grasos y pigmentos, y se pueden evaluar en cuanto a su potencial. actividad antimicrobiana. El extracto acuoso de *C. vulgaris* no logró inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, mientras que las sustancias extraídas con etanol, en una concentración de 3,12 mg mL^{-1}, inhibieron la proliferación de *E. coli* (Annamalai *et al.*, 2012).

Por último, muchas vitaminas (incluidas A, B, C), minerales (como Ca, Mg y K) y compuestos químicos, incluidos fenoles y esteroles, brindan múltiples opciones de valorización de la biomasa producida durante el cultivo de microalgas.

En el caso de los esteroles, que se asocian a la prevención de enfermedades cardiovasculares, las microalgas tienen un alto potencial como productoras de fitoesteroles llegando hasta el 5,1% de PS (Luo *et al.*, 2015). Además, la actividad antioxidante de las microalgas se puede atribuir a varios compuestos fenólicos (ácidos gálicos, cinámico, salicílico, cafeico, ferúlico y p-cumárico) identificados en diferentes especies de microalgas (Safafar *et al.*, 2015).

3. La investigación sobre biorrefinerías de microalgas en Ecuador

3.1 Antecedentes

El uso extensivo de fuentes energéticas tradicionales, como el petróleo, carbón y gas natural que han sido considerados la base de la economía global, ha generado un impacto trascendental porque constituyen una fuente no renovable de energía, generan gases tóxicos que incrementan el efecto invernadero, causan daños en el ecosistema por su extracción y obtención, incrementan la temperatura media del planeta, etc., (Pulyaeva, Kharitonova & Kharitonova, 2020); es por ello que, la creciente búsqueda de alternativas energéticas sostenibles se ha enfocado en sistemas renovables que mejoren la seguridad energética mundial, incrementen el acceso general a la energía, estimulen el desarrollo rural y frenen las emisiones de gases de efecto invernadero (Maltsoglou, Koizumi & Feliz, 2013), cubriendo la demanda energética de la población que se estima incrementará a $8{,}5 \times 10^9$ y 9.7×10^9 para el 2030 y 2050, respectivamente (Orejuela-Escobar, Landázuri & Goodell, 2021).

Es así como surgen los biocombustibles (Figura 5), fuentes que han logrado un incremento en el desarrollo de la bioenergía en países europeos, EE.UU. y Brasil, aunque en regiones de África, Asia y América Latina se continúan trabajando en estrategias y políticas que mejoren su producción. Los esfuerzos recientes de los países se han orientado en los biocombustibles líquidos como el bioetanol y el biodiésel, generalmente para el transporte (Maltsoglou *et al.*, 2013).

De los combustibles biológicos se recalca la producción de bioetanol y biodiésel, siendo cerca del 82 y 18% de participación en la economía global y aportando al sector transporte con mejores aprovechamientos (1,5% de uso biodiésel, 90% bioetanol) según la Agencia Internacional de Energía (AIE). Tan solo para el sector transporte, se estima que para el 2030 incrementará la demanda de biocombustibles en comparación a su consumo en el 2004 (Morelos, 2016).

Figura 5. Esquema de la clasificación de las biorrefinerías según el uso de biomasa de primera, segunda, tercera y cuarta generación.

En Latinoamérica, el bioetanol constituye los mayores porcentajes de bicombustibles producidos, tal es el caso de Brasil, con una participación de 34% y una producción mayor a 26 billones de litros, que ha tenido un buen desarrollo industrial comparable con Estados Unidos y su producción de más de 41 billones de litros (54% de participación) (Sawin *et al.*, 2009).

Las nuevas tecnologías han permitido la exploración de sustratos renovables que resulten atractivos en rendimiento y sostenibilidad, como Velázquez-Martí *et al.*, (2018) que caracterizaron los residuos de poda del árbol *Euphorbia laurifolia* para generar biocombustibles de un poder calorífico de 10 MJ kg^{-1} con la ventaja de residuos cercanos a 10 kg $año^{-1}$; Guerrero & Muñoz (2018) que afirman la obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos de banano, cultivo que alcanza más de 115 millones de toneladas globales y con producción mayoritaria en América Latina; Acosta *et al.*, (2018) con transformación del 50% de los residuos

de cacao en biogás con un 60% de metano, cultivo de relevancia en regiones tropicales que genera de entre 10 a 15 toneladas de residuos húmedos de cacao; entre otros.

Uno de los biocombustibles más estudiados actualmente son las Microalgas, materia prima sostenible de la tercera generación que está generando interés por su amplio potencial energético: tasa de crecimiento rápida, alta capacidad fotosintética, producción de biomasa de alto valor agregado, capacidad de fijar CO_2 industrial, no competencia con cultivos alimentarios por el espacio, uso de espacios no cultivables, etc., (Maliha & Abu-Hijleh, 2022; Olguín *et al.*, 2022)

3.2 Producción mundial de biomasa microalgal y perspectivas

Las microalgas han contribuido ampliamente al desarrollo de la bioeconomía circular, aportando en la sostenibilidad y economía global a través del procesamiento y obtención de biomasa con interesante composición bioquímica y variedad de usos, como la generación de bioplásticos, biorremediación de residuos, producción de biogás y biohidrógeno, biocombustibles, entre otros (Show, 2022). El esquema de obtención de biomasa consta de dos principales procesos, el Build-Up (cepa, cultivo) y Pull-Down (cosecha, secado, extracción), mismos que potencializan el mercado establecido en los sistemas productivos.

Se estima que el mercado mundial de microalgas que se consideró en $939,4 millones en el año 2020, se proyecte con un crecimiento de 5,3% anual durante el periodo 2020-2027 alcanzando un total de $1300 millones en el 2027; particularmente, con la *Spirulina*, se espera una tasa anual compuesta del 6.2% logrando los $578 millones al final del periodo y con *Chlorella*, del 4.5% (Global Industry Analysts, 2022).

La primera economía más grande del mundo, EE.UU., tuvo un mercado de microalgas estimado de $274 millones para el 2020, mientras que China para el 2027 alcanzará un tamaño de mercado de $268 millones. Otros mercados geográficos importantes constituyen Japón y Canadá, mientras que, en Europa, se prevé un crecimiento cerca del 5% para Alemania (Global Industry Analysts, 2022; Show, 2022). Estos datos indican que las microalgas están emergiendo rápidamente como los siguientes recursos con potencial prometedor para resolver las necesidades más urgentes de los sectores agrícola e industrial.

Respecto a los biocombustibles, la Agencia Internacional de Energía (International Energy Agency) estima que el biogás a partir de algas marinas puede alcanzar los 20.800 m^3 ha^{-1} por año, en comparación con cultivos terrestres que rinden 6624 m^3 ha^{-1} por año (Laurens, 2017), sin embargo, estas cifras pueden incrementar por las actuales limitaciones como el desarrollo y mejora de tecnologías en los sistemas productivos.

Particularmente con el biodiésel, que se empezó a investigar y a adoptarse en los años 1978-1996, investigaciones afirman que la biomasa algal ofrece una solución favorable para las dificultades relacionadas con la biomasa de generaciones previas para producción de diésel, como la gran cantidad de tierras cultivables que se requiere en la 2da generación.

De forma general, la productividad promedio anual de biomasa de algas es de 25 g m^{-2} $día^{-1}$ para los fotobiorreactores (PBR) cerrados, representando el doble de la

producción en estanques abiertos que oscilan de 8 a 12 g m^{-2} $día^{-1}$; aunque se ha comprobado en un estudio experimental que los PBR de capa ultrafina de malla (MUTL) producen hasta tres veces más biomasa que un PBR tubular común, con 6,6 g L^{-1} y 2,1 g L^{-1}, respectivamente, lo que incrementa la posibilidad del uso de fotobiorreactores menos costosos con mejores rendimientos (Maliha & Abu-Hijleh, 2022).

Es claro que las Biorrefinerías a partir de microalgas tienen grandes beneficios a la economía global, es por ello que se ha investigado el uso de medios menos costosos y con mayor rentabilidad, tal es el caso del uso de aguas residuales desde hace décadas. Algunos estudios han utilizado efluentes o digestatos tratados como fuente de nutrientes, siguiendo un concepto de economía circular que pretende utilizar eficientemente la biomasa para una obtención sostenible de productos de alto y bajo valor agregado, como alimentos, piensos, biocombustibles, biomateriales, biofertilizantes y bioestimulantes, reduciendo la huella de carbono y reintegrando los desechos a un sistema de producción (Olguín *et al.*, 2022).

El género *Arthrospira* es el de mayor interés por su alto contenido de proteínas y otros compuestos de alto valor añadido, con una producción mayoritaria en China y Estados Unidos, seguidos por Japón, Taiwán, Tailandia, India y Australia; además, se espera que el mercado de *Arthrospira* alcance una tasa anual compuesta del 13,3% en el 2028, llegando a una valorización de $968,6 y una producción de 98768,5 toneladas en ese año (Meticulous Research, 2021).

De las más de 150000 especies de microalgas en el mundo, la producción mundial de biomasa se enfoca en un 96.5% en *Arthrospira* (Spirulina), mientras que el restante proviene de algas verdes como *Haematococcus pluvialis* (0.43%), *Chlorella vulgaris* (0.008%), *Tetraselmis* (0.003%) y *Duanliella salina* (0.0004%) (Ashour & Omran, 2022).

Un sector poco estudiado es el área de productos farmacéuticos y de cuidado personal o PPCP, que son micro-contaminantes que ocasionan efectos dañinos en los organismos vivos aun cuando se encuentran en concentraciones bajas; sin embargo, el campo de la eliminación de PPCP mediante cultivos algales en el tratamiento de aguas residuales es actualmente novedoso y con gran desarrollo. Por ejemplo, se ha demostrado que *Chlorella vulgaris* remedia la levofloxacina por bioacumulación y por biodegradación, y el metronidazol, por adsorción en sustancias exopoliméricas, con porcentajes de remoción mayores al 97% (Hena, Gutierrez & Croué, 2021).

Otra de las áreas actualmente de interés es la agricultura, que tras años de uso indiscriminado de herbicidas y otros productos de síntesis química ha desencadenado una severa contaminación de suelos y ecosistemas acuáticos. Por ello, los herbicidas biológicos son prometedores para abordar estos problemas, como Stefanski *et al.*, (2020), que evaluaron el uso de biomasa microalgal de *Chlorella* con 56,1% de proteínas, 34,7% de carbohidratos, 1,7% de lípidos y 7,8% de minerales, como sustrato para fermentación del hongo *Trichoderma koningiopsis* y posteriormente, como biocontrol hasta un 100% de *Conyza bonariensis* que es considerada una maleza altamente dañina.

3.3 Producción de energía en Ecuador

En Ecuador, el 86% de la energía producida proviene de fuentes no-renovables, como los combustibles fósiles, país que, por no poseer la capacidad industrial de Refinerías, no

ha podido suplementar la demanda energética poblacional y ha dependido parcialmente de importaciones de gasolina, diesel y GLP (gas licuado del petróleo). Para el 2020, la producción total de energía fue de 203.551 kBEP (miles de barriles equivalentes de petróleo), mientras que la importación de diesel de 18.644 kBEP, gasolinas y naftas de 13.605 kBEP y GLP de 8.320 kBEP, que representan una quinta parte de lo total producido (Ministerio de Energía y Recursos Naturales No Renovables, 2021). Cabe recalcar que la energía proveniente de fuentes renovables tan solo representó un 9,4% en ese año, a diferencia del petróleo con un 86,3% y gas natural con 9,4%.

El sector energético en Ecuador genera la mayor parte de las emisiones de gases de efecto invernadero derivados de los combustibles fósiles y el cambio de uso del suelo, ocupando el cuarto lugar de los sectores productivos y siendo en gran medida dependiente de la energía hidroeléctrica (Villamar *et al.*, 2021). Para el 2018, la energía hidroeléctrica figuró el 84% del total de producción de electricidad, mayormente generado en la región amazónica con 13 GW de potencial tecnoeconómico y ambiental.

A pesar del potencial energético y del alto acceso a la electricidad (97,3%), esta implica menos del 15% del consumo de energía total final en el 2016; siendo los mayores representantes el diesel con un 32% y la gasolina con un 27% (Villamar *et al.*, 2021). Debido a la demanda y al impacto ecosistémico de las actuales fuentes energéticas, se ha implementado en sus primeras etapas en América Latina, tecnologías de conversión de residuos orgánicos en energía como fuentes alternativas, tal como menciona Silva-Martínez *et al.*, (2020): digestión anaeróbica, fermentación, pilas de combustible microbianas, gasificación y pirólisis como tecnologías eficientes para producir bioenergía. En Ecuador se registran trabajos bibliográficos de tecnologías de combustión, gasificación, pirólisis, digestión anaeróbica y fermentación, con tendencia a la diversificación de este tipo de tecnologías.

De forma global, una de las alternativas biológicas ante la demanda actual de energía y alimentos sostenibles que incrementen la seguridad climática, es la producción de microalgas que no compite con el uso de tierras productivas ni con las actuales fuentes de alimentos. En comparativa, otras regiones de América del Sur como Brasil donde el sector de bioenergía ya implementa con éxito tecnologías a base de algas (Figura 6), Ecuador aún está en análisis inicial del potencial de este tipo de estrategias (Vega-Quezada, Blanco & Romero, 2017; Dos Santos *et al.*, 2020). Se considera a Brasil, México y Argentina como los únicos países de Latinoamérica con desarrollo a escala de producción de microalgas, según el reporte de POLARIS MARKET RESEARCH (2022).

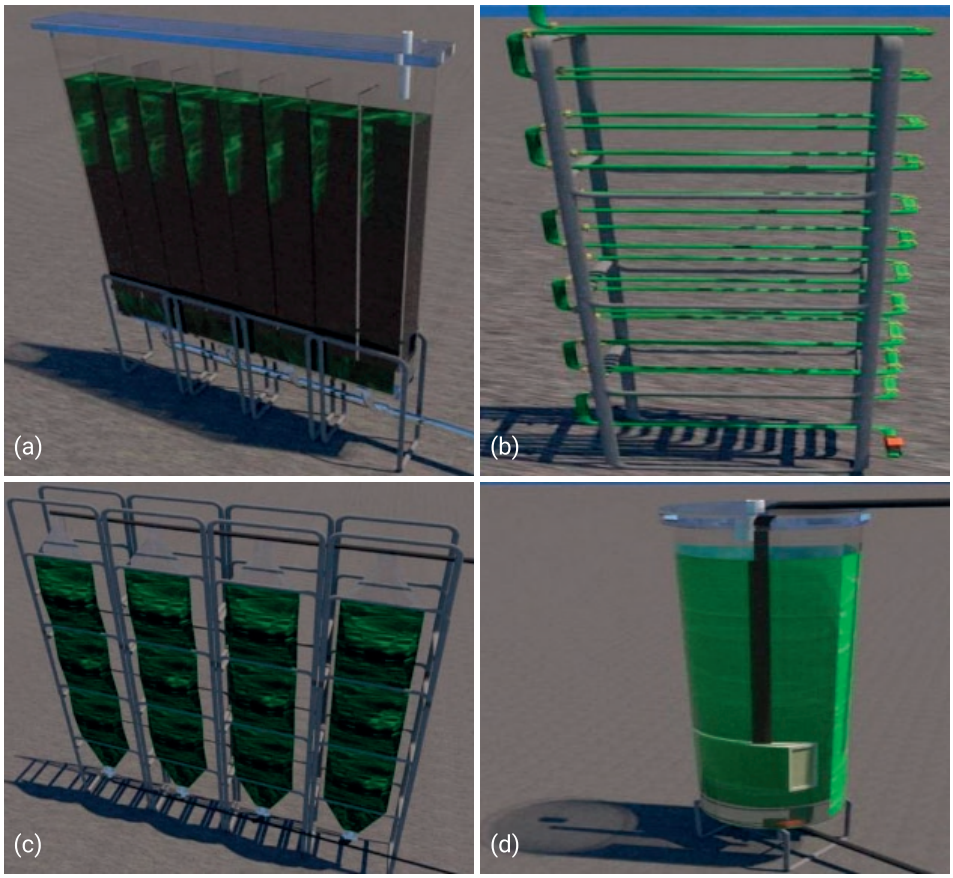


Figura 6. Sistemas de cultivo cerrado utilizados en la producción de microalgas en Brasil (Dos Santos *et al.*, 2020). a) panel plano. b) tubular vertical. c) bolsas plásticas. d) membrana.

En Ecuador se ha analizado a pequeña escala, la diversidad de beneficios que genera el cultivo de microalgas, enfocándose en evaluaciones de biomasa como biofertilizantes/bioestimulantes, producción de lípidos con posible uso como biodiesel, identificación de cepas en lugares de importancia como reservas o cuerpos de agua cercanos a poblados, evaluación de diferentes condiciones de cultivo, y análisis de remoción de nutrientes en sustratos como aguas residuales de toda índole. Estos estudios se detallarán a continuación para identificar los pro y contra de una producción masiva en el país.

3.3.1 Producción de biomasa en aguas residuales

En Ecuador existe poca documentación oficial de estudios sobre microalgas cultivadas en aguas residuales, sin embargo, es una de las temáticas que mayor interés muestra en el ámbito de investigación microalgal. Las cepas mayormente utilizadas por estos trabajos corresponden a los géneros *Arthrospira, Chlorella, Pleurococcus, Scenedesmus,*

Tetraselmis y Thalassiosira, evaluadas en aguas residuales agrícolas, con metales pesados, domésticas, lácteas, porcícolas, rurales y rurales, como se detalla en la Tabla 5.

Los resultados muestran remociones máximas del 97% de fosfatos y 88% de N con *Scenedesmus* (Mercado *et al.*, 2020), 97% de fosfatos y 88% de N con *A. platensis* (Álvarez *et al.*, 2020), 97% de nitratos y 89% de ortofosfatos con *C. vulgaris* (Yerovi, 2020), 85% de N y 96% de fósforo con *Scenedesmus* (Verduga, 2020), 86% de Hg con *Pleurococcus* y del 76, 93 y 97 % de sulfatos, fosfatos, y nitratos con un consorcio (Vela-García, Guamán-Burneo & González-Romero, 2019), 53% de nitrógeno amoniacal y 56% de fosfatos con *Chlorella* (Benítez *et al.*, 2018), y, 85% de As y 82% de Pb con los géneros *Thalassiosira* y *Tetraselmis* (Jaramillo & Romero, 2018).

Tabla 5. Investigaciones sobre microalgas cultivadas en aguas residuales en Ecuador.

Autor/es	Lugar	Microalga	Origen de cepas	Tipo de agua residual	Productividad (g L−1 día−1)
Mercado *et al.*, (2020)	Guayaquil	*Scenedesmus* sp.	Nativo	Agua residual láctea	1,75 ± 0.60
Álvarez *et al.*, (2020)	Guayaquil	*Arthrospira platensis*	Nativo	Agua residual láctea	1,26 ± 0.31
Yerovi (2020), Tesis pregrado	Carcelén	*Chlorella vulgaris*	No nativo	Agua residual de industria porcícola	ND*
Verduga (2020), Tesis pregrado	Guayaquil	*Scenedesmus* sp.	Nativo	Agua residual láctea	1,84 ± 0.54
Vela-García, Guamán *et al.*, (2019)	Andes & Amazonía	*Pleurococcus* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp.	Nativo	Efluente metalúrgico	ND*
Aray-Andrade *et al.*, (2019)	Guayaquil	*Chlorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6, *Scenedesmus* sp. R3	Nativo	Agua residual rural	ND*
Benítez *et al.*, (2018)	Orellana	*Chlorella* sp.	Nativo	Agua residual doméstica	0,43
Jaramillo & Romero (2018), Tesis pregrado	Machala	*Thalassiosira, Tetraselmis*	Nativo	Agua residual agrícola	ND*

*ND: No determinado.

3.3.2 Producción de biofertilizantes/bioestimulantes

Una alternativa sustentable que permita el reemplazo total o parcial del uso tradicional de insumos de síntesis química en el país es la producción de microalgas con características que promuevan el crecimiento de los cultivos, de bioactividad contra patógenos, producción de fitohormonas, restauración de la fertilidad del suelo, entre otras. Estas propiedades han sido ampliamente estudiadas en otros países, por la mejora de la producción agrícola, disminución de la contaminación ambiental e incremento de la salud microbiológica del suelo, sin embargo, en Ecuador aún hay un amplio potencial que descubrir.

Una de las familias de plantas más evaluadas son las Leguminosas, así como Ayón, Veliz y Gabriel (2017), quienes analizaron la respuesta de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (frijol caupí) frente a la aplicación de un fertilizante comercial orgánico compuesto de sílica

activa y extractos de microalgas. Los mejores resultados se dieron con el T8 y T5 para altura de la planta, donde utilizaron 1000 y 500 mL ha^{-1} del extracto respectivamente, con un incremento del 21% en comparación al control. Similar se obtuvo para el diámetro del tallo, donde T5 y T8 tuvieron una incidencia de 1,2 veces mejoría con relación al control; esto repercute en los rendimientos finales, que se estiman en más de 30000 mazos ha^{-1} en comparación al control de 23000 mazos ha^{-1}, siendo un aumento del 37% que influirán directamente en las ganancias obtenidas.

Otros trabajos investigativos, como tesis de pregrado, han mostrado efectos significativamente potenciales al aplicar bioinsumos de origen microalgal. Tal es el caso de Tello (2018) que evaluó la respuesta de *Phaseolus vulgaris* L. a un biofertilizante basado en la mezcla de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. a diferentes concentraciones (50 y 100%) en distintas etapas del cultivo (primer, segundo, tercer, cuarto mes), como se evidencia en la Figura 7. Los autores obtuvieron mejoras significativas en el desarrollo vegetativo del fréjol: altura de la planta con aumento de 4,5 veces, número de flores con 4,1, número de vainas con 5,2, longitud de raíces con 1,1, peso seco de la raíz con 2,1, peso seco parte aérea con 5, longitud de vainas con 1,06 y rendimiento kg ha^{-1} en 1,04 veces en comparación al control.

Figura 7. Desarrollo vegetativo del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) como respuesta a la aplicación de un biofertilizante microalgal (*Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.), Tomado de Tello (2018). De izquierda a derecha: T0: agua, T1: 50% del biofertilizante, T2: 100% del biofertilizante.

También se ha evaluado el efecto promotor del crecimiento vegetal en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), con las cepas nativas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. aisladas de muestras ambientales (Simbaña, 2019). Los resultados fueron favorecedores, obteniendo 14% más germinación de semillas en ambas concentraciones del biofertilizante que el control, sin embargo, en el resto de los parámetros no se observaron diferencias significativas, posiblemente por la baja densidad celular que emplearon.

La acción directa de las microalgas en el sector agrícola se debe principalmente a la composición intracelular las cepas evaluadas, tal como Soto *et al.*, (2020) que caracterizaron las microalgas nativas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. como un biofertilizante formulado, obteniendo en un gramo por cada 100 mililitros: 0,10% de NT, 0,13% de P, 0,19% de K, 0,09% de Ca, 0,02% de Mg y 0,03% de S; además de los siguientes elementos en ppm (mg L^{-1}): 3,4 de B, 0,2 de Zn, 3,2 de Cu, 3,8 de Fe y 6,4 de Mn, sin embargo, estos resultados se encuentran por debajo de los reportados para bioinsumos microalgales y orgánicos, como Uysal, Uysal & Ekinci (2015) que alcanzaron valores de 5% en un biofertilizante producido a base de *Chlorella* sp.

3.3.3 Producción de lípidos con potencial uso como biodiesel

Debido a las ventajas de cultivar microalgas como su alta tasa de crecimiento, contenido de lípidos significativo, capacidad de consumo de CO_2 y alta eficiencia fotosintética, estos microorganismos han sido catalogados como una materia prima atractiva para la generación de biocombustibles amigables con el ecosistema, por esta razón su importancia en Ecuador es alta si se enfoca para fines energéticos. En la Tabla 6 se describen los trabajos realizados en Ecuador y la producción de lípidos alcanzada en los sistemas de cultivo, siendo los géneros *Chlorella y Scenedesmus* los más estudiados.

Tabla 6. Investigaciones en Ecuador sobre la producción de lípidos microalgales con posibles fines energéticos.

Autor/es	Lugar	Microalga	Origen de cepas	Concentración de lípidos	Composición lipídica
Reis & Andrade, 2013	Quito	*Chlorella protothecoides*	No nativo	9,68%	Ácido palmítico, ácidos grasos poliinsaturados, ácido linoléico.
Subía & Rubio, 2018	Limoncocha	*Chlorella & Monoraphidium contortum* *Vischeria & Scenedesmus* sp.	Nativo	42 y 16%	Fosfatidilinositol, Fosfatidilcolina, Fosfatidiletano-lamina
Huilca *et al.*, 2019	Quito	*Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp., *Stichococcus* sp.	No nativo	2,67 mg mL^{-1}	*ND
Mercado *et al.*, 2020	Guayaquil	*Scenedesmus* sp.	Nativo	50,7%	Ácido linolénico, Ác. linoleico, Ác. palmítico, Ác. oleico

*ND: No determinado.

Estas tecnologías de cultivo microalgal para producción de compuestos lipídicos se han comparado con cultivos tradicionales con los mismos fines, como Vega-Quezada, Blanco & Romero (2017) que analizaron escenarios diferentes de producción con aceite de palma, microalgas en estanques abiertos y microalgas en fotobiorreactores laminares, mediante el BCA (Análisis costo-beneficio), VAN (Valor actual neto) y BCR (Relación costo-beneficio).

Referente a la inversión de forma privada, la generación de biodiesel a partir del aceite de palma es más rentable en comparación con las microalgas, esto debido a los actuales sistemas de producción que no son muy sustentables; sin embargo, respecto a la eficiencia y eficacia de los fondos públicos, las microalgas son superiores al aceite de palma, añadiendo que la presión sobre las tierras agrícolas es mucho menor, no compiten con zonas arables y muestran un mejor balance de carbono. Los resultados descritos muestran que, bajo un enfoque de economía circular, el cultivo de microalgas resulta en una alternativa sostenible y rentable a futuro, mencionando que se debe priorizar las mejoras en las tecnologías actuales.

3.3.4 Identificación de la diversidad microalgal

En Ecuador la diversidad, en todas las formas vivientes (macro y microorganismos), es alta, por lo que es considerado uno de los 20 países megadiversos del mundo (Kleemann *et al.*, 2022). Esto se debe principalmente a su alta heterogeneidad ambiental que permite la existencia de ecosistemas diferentes por su posición latitudinal (Cuesta *et al.*, 2017). A pesar de esto, se han realizado pocas publicaciones donde se detallan los géneros encontrados en los sistemas acuícolas del país, tal es el caso de Guamán y González (2016) y Mercado-Reyes y Álvarez-Montero (2022) donde se puede evidenciar la descripción morfológica de los microorganismos fitoplanctónicos observados en sitios de importancia nacional como Reservas y Parques Nacionales (Figura 8).

Guamán y González (2016) describen la presencia de diversos grupos taxonómicos, en los once sitios muestreados: Bacillariophyta con 30 géneros, Chlorophyta 28 géneros, Charophyta 9 géneros, Glaucophyta 1 género, Ochrophyta 2 géneros, Cyanophyta 19 géneros, Euglenophyta 2 géneros, Dinophyta 1 género. Similar se obtuvo en el trabajo de Mercado-Reyes y Álvarez-Montero (2022) en el que se identificó las siguientes taxas en las dos reservas analizadas: Bacillariophyta con 29 géneros, Chlorophyta 18 géneros, Charophyta 6 géneros, Ochrophyta 3 géneros, Cyanophyta 18 géneros, Euglenophyta 4 géneros, Dinophyta 4 géneros.

Figura 8. Catálogos de microalgas y cianobacterias encontradas en Ecuador. Izquierda: Guamán y González (2016), Derecha: Mercado-Reyes y Álvarez-Montero (2022).

3.3.5 Evaluación de condiciones de cultivo

En el país se ha evaluado las variables de cultivo (pH, temperatura, intensidad y fotoperiodo lumínico, nutrientes) en los géneros *Chlorella, Scenedesmus* y *Thalassiosira* que son considerados de relevancia industrial, para la obtención de mejores rendimientos de producción a menor costo. Los trabajos descritos en la Tabla 7, muestran que el análisis de las condiciones específicas de cultivo de cada cepa microalgal permite conocer el requisito particular de las mismas, permitiendo alcanzar incrementos en los parámetros cinéticos y de composición de la biomasa.

Tabla 7. Investigaciones en Ecuador acerca de la evaluación de condiciones de cultivo en cepas microalgales nativas.

Autor/es	Lugar	Microalga	Origen de cepas	Condiciones de cultivo	Respuesta
Sandoval *et al.*, 2015.	Quito	*Chlorella*	Nativo	Fototrofía con medio Guillard f/2 y medio formulado con lixiviado y cenizas de carbón vegetal.	Mayor tasa de crecimiento, productividad biomásica y densidad celular en el medio formulado.

(Tabla 7 continúa en la página siguiente)

(Tabla 7 continúa de la página anterior)

Autor/es	Lugar	Microalga	Origen de cepas	Condiciones de cultivo	Respuesta
Aray-Andrade, Uyaguari-Diaz y Bermúdez, 2018.	Guayaquil	*Chlorella* sp. M2 y M6, *Scenedesmus* sp. R3	Nativo	Uso de antibiótico (cloranfenicol o CAP) y crioconservación (sulfóxido de dimetilo; mezcla de DMSO-sacarosa y glicerol).	Menor tasa de crecimiento con CAP, mayor % de lípidos con crioconservación con glicerol.
Bravo *et al.*, 2020.	Manabí	*Thalassiosira pseudonana*		Incidencia de luces LED y fluorescentes.	Mayor producción de biomasa y peso celular con luces LED.
Mercado-Reyes (2022).	Guayaquil	*Chlorella* sp.	Nativo	Efecto de luz roja en cultivos semicontinuos.	Mayor densidad celular, tasa de crecimiento, producción de biomasa y contenido proteico y lipídico con luz roja.

El potencial biotecnológico de las cepas respecto a bioactividad también ha sido de interés científico en Ecuador, como Acurio *et al.*, (2018), quienes se enfocaron en los compuestos antimicrobianos de *Chlorella* sp. extraídos con etanol, alcohol isopropílico y agua contra cepas de *Staphylococcus*. Los investigadores obtuvieron un halo de inhibición similar a los antibióticos utilizados, ampicilina y oxacilina, lo que infiere que tiene metabolitos secundarios con futuro prometedor en la industria farmacéutica.

4. Referencias Bibliográficas

't Lam, G.P., Vermuë, M.H., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., & Van Den Berg, C. (2018). Multi-product microalgae biorefineries: from concept towards reality. *Trends in biotechnology, 36*(2), 216-227. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.011

Acosta, N., De Vrieze, J., Sandoval, V., Sinche, D., Wierinck, I., & Rabaey, K. (2018). Cocoa residues as viable biomass for renewable energy production through anaerobic digestion. *Bioresource Technology, 265*, 568-572. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.100

Acurio, L.P., Salazar, D.M., Valencia, A.F., Robalino, D.R., Barona, A.C., Alvarez, F.C., & Rodriguez, C.A. (2018). Antimicrobial potential of Chlorella algae isolated from stacked waters of the Andean Region of Ecuador. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 151, No. 1, p. 012040). Iop Publishing. https://doi.org/10.1088/1755-1315/151/1/012040

Álvarez, X., Arévalo, O., Salvador, M., Mercado, I., & Velázquez-Martí, B. (2020). Cyanobacterial biomass produced in the wastewater of the dairy industry and its evaluation in anaerobic co-digestion with cattle manure for enhanced methane production. *Processes, 8*(10), 1290. https://doi.org/10.3390/pr8101290

Anemaet, I.G., Bekker, M., & Hellingwerf, K.J. (2010). Algal photosynthesis as the primary driver for a sustainable development in energy, feed, and food production. *Marine Biotechnology, 12*, 619-629. https://doi.org/10.1007/s10126-010-9311-1

Annamalai, J., Shanmugam, J., & Nallamuthu, T. (2012). Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *International Journal of Current Research and Review, 4*(7), 33-38.

Antal, T.K., Krendeleva, T.E., Tyystjarvi, E. (2015). Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae: relation to hydrogen production. *Photosynth. Res. 125*, 357-381. https://doi.org/10.1007/s11120-015-0157-2 https://doi.org/10.1007/s11120-015-0157-2

Antal, T.K., Matorin, D.N., Kukarskikh, G.P., Lambreva, M.D., Tyystjarvi, E., Krendeleva, T.E., Tsygankov, A.A., Rubin, A.B. (2014). Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized Chlamydomonas reinhardtii cells deprived of sulfur. *Int. J. Hydrog. Energy. 39*, 18194-18203. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.135

Aray-Andrade, M.M., Uyaguari-Diaz, M.I., & Bermudez, J.R. (2018). Short-term deleterious effects of standard isolation and cultivation methods on new tropical freshwater microalgae strains. *PeerJ, 6*, e5143. https://doi.org/10.7717/peerj.5143

Aray-Andrade, M., Moreira, C., Santander, V., Mendoza, L., & Bermúdez, R. (2019). Characterization of three algal strains used as a tertiary treatment for rural wastewater of ecuadorian littoral. In *Eur. Biomass Conf. Exhib. Proc.,* (pp. 241-248).

Ashour, M., & Omran, A.M. (2022). Recent Advances in Marine Microalgae Production: Highlighting Human Health Products from Microalgae in View of the Coronavirus Pandemic (COVID-19). *Fermentation, 8*(9), 466. https://doi.org/10.3390/fermentation8090466

Aung, K.L.N. (2011). Effect of Spirulina biofertilizer suspension on growth and yield of *Vigna radiata* (L.). Wilczek, Univ. Res. J. 4(1), 351-363.

Ayón, F., Veliz, D., & Gabriel, J. (2017). El caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) y su respuesta a la aplicación de ácidos húmicos (AH s) en el Cantón Jipijapa en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere, 5*(1), 4-14. https://doi.org/10.36610/j.jsab.2017.050100004

Barone, R.S.C., Sonoda, D.Y., Lorenz, E.K., Cyrino, J.E.P. (2018). Digestibility and pricing of *Chlorella sorokiniana* meal for use in tilapia feeds. *Sci. Agric., 75*, 184-190. https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0457

Becker, E.W. (1994). Microalgae: *Biotechnology and Microbiology. Cambridge* University Press, 293 p. Cambridge, UK.

Begum, H., Yusoff, F.M.D., Banerjee, S., Khatoon, H., Shariff, M. (2016). Availability and utilization of pigments from microalgae. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 56*, 2209-2222. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841

Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., & Dall'Osto, L. (2018). Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microbial Cell Factories. 17*(173). https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3

Benítez, M.B., Champagne, P., Ramos, A., Torres, A.F., & Ochoa-Herrera, V. (2019). Wastewater treatment for nutrient removal with Ecuadorian native microalgae. *Environmental technology, 40*(22), 2977-2985. https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1459874

Benvenuti, G., Bosma, R., Cuaresma, M., Janssen, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H. (2015). Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. *J. Appl. Phycol., 27*, 1425-1431. https://doi.org/10.1007/s10811-014-0470-8

Bharathijara, B., Chakravarthy, M., Ranjith Kumar, R., Yogendran, D., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J. (2015). Aquatic biomass (algae) as a future feedstock for biorefineries: a review on cultivation, processing, and products. *Renew. Sust. Energy Rev., 47*, 634-653. https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.047

Bhattacharya, M., & Goswami, S. (2020). Microalgae - A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 25*, 101580. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101580

Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Djikstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., Fievez, V. (2008). Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid compositions of dairy cows. *J. Dairy Sci*., 91, 4714-4727. https://doi.org/10.3168/jds.2008-1178

Boelen, P., van Mastrigt, H.H., van de Bovenkamp, Heeres, H.J., Buma, A.G.J. (2017). Growth phase significantly decreases the DHA-to-EPA ratio in marine microalgae. *Aquacult. Int., 25*, 577-587. https://doi.org/10.1007/s10499-016-0053-6

Bohutskyi, P., Phan, D., Kopachevsky, A.M., Chow, S., Bouwer, E.J., Betenbaugh, M.J. (2018). Synergistic co-digestion of wastewater grown algae-bacteria polyculture biomass and cellulose to optimize carbon-to-nitrogen ratio and application of kinetic models to predict anaerobic digestion energy balance. *Bioresour. Technol., 269*, 210-220. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.085

Bonos, E., Kasapidou, E., Kargopoulos, A., Karampampas, A., Christaki, E., Florou-Paneri, P., & Nikolakakis, I. (2016). Spirulina as a functional ingredient in broiler chicken diets. *South African Journal of Animal Science, 46*(1), 94. https://doi.org/10.4314/sajas.v46i1.12

Borowitzka, M.A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialization. *J. Appl. Phycol., 25*, 743-756. https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9

Bravo, M., Lodeiros, C., Zapata, E., & Alió, J. (2020). Efecto de luces LED y fluorescentes sobre el crecimiento y la biomasa de *Thalassiosira pseudonana* (Cleve, 1873). *La Técnica: Revista de las Agrociencias,* (24), 01-08. https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i24.2992

Buitron, G., Carrillo-Reyes, J., Morales, M., Faraloni, C., Torzillo, G. (2017). Biohydrogen production from Microalgae. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts Feedstock Cultivation to End-Products*. González-Fernández, C., Muñoz, R. Elsevier Ltd. pp. 209-234. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00009-1

Bule, M.H., Ahmed, I., Maqbool, F., Bilal, M., Iqbal, H.M.N. (2018). Microalgae as a source of high-value bioactive compounds. *Front. Biosci., 10*, 197-216. https://doi.org/10.2741/S509 https://doi.org/10.2741/s509

Caporgno, M.P., Mathys, A. (2018). Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Front. Nutr., 5*, 1-10. https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00058

Castro-Puyana, M., Pérez-Sánchez, A., Valdés, Ibrahim, O.H.M., Suarez-Álvarez, S., Ferragut, J.A., Micol, V., Cifuentes, A., Ibañez, E., García-Cañas, V. (2017). Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with antiproliferative activity against human colon cancer cells. *Food Res. Int., 99*, 1048-1055. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.021

Cepák, V., Pribyl, P. (2018). Light intensity and nitrogen effectively control exopolysaccharide production by the green microalga *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae). *Genet. Plant Physiol., 8*, 24-37. http://hdl.handle.net/11104/0287332

Chai, M., Tu, Q., Lu, M., Yang, Y.J. (2014). Esterification pretreatment of free fatty acid in biodiesel production, from laboratory to industry. *Fuel Process. Technol., 125*, 106-113. https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.03.025

Chandra, R., Rohit, M.V., Swamy, Y.V., Mohan, S.V. (2014). Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. *Bioresour. Technol., 165*, 279-287. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.102

Chauton, M.S., Reitan, K.I., Norsker, N.H., Tveteràs, R., Kleivdal, H.T. (2015). A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: research challenges and possibilities. *Aquaculture, 436*, 95-103. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.038

Chen, Y., Ho, S.H., Nagarajan, D., Ren, N., Chang, J.S. (2018). Waste biorefineries - integrating anaerobic digestion and microalgae cultivation for bioenergy production. *Curr. Opin. Biotechnol., 50*, 101-110. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.017

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv., 25*, 294-306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., Mishra, S. (2017). Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. *Bioresour. Technol., 244*, 1376-1383. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.003

Chung, Y.S., Lee, J.W., Chung, C.H. (2017). Molecular challenges in microalgae towards cost-effective production of quality biodiesel. *Renew. Sustain. Energy Rev., 74*, 139-144. https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.048

Coppens, J., Grunert, O., Van Den Hende, S., Vanhoutte, I., Boon, N., Haesaert, G., De Gelder, L. (2016). The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels. *J. Appl. Phycol., 28*, 2367-2377. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0775-2

Cuesta, F., Peralvo, M., Merino-Viteri, A., Bustamante, M., Baquero, F., Freile, J.F.,... & Torres-Carvajal, O. (2017). Priority areas for biodiversity conservation in mainland Ecuador. *Neotropical Biodiversity, 3*(1), 93-106. https://doi.org/10.1080/23766808.2017.1295705

da Silva Ferreira, V., y Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. Word J. Microbiol. Biotechnol. 33, 20. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6 https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6

da Silva, G.G., Ferreira de Jesus, E., Takiya, C.S., Del Valle, T.A., da Silva, T.H., Vendramini, T.H.A., Yu, E.J., Rennó, F.P. (2016). Short communication: Partial replacement of ground corn with algae meal in a dairy cow diet: Milk yield and composition, nutrient digestibility, and metabolic profile. J. Dairy Sci. 99, 8880-8884. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11542 https://doi.org/10.3168/jds.2016-11542

Das, P., Quadir, M.A., Thaher, M.I., Alghasal, G.S.H.S., Aljabri, H.M.S.J. (2019). Microalgal nutrients recycling from the primary effluent of municipal wastewater and use of the produced biomass as bio-fertilizer. Int. J. Environ. S ci. Technol. 16, 3355-3364. https://doi.org/10.1007/s13762-018-1867-8 https://doi.org/10.1007/s13762-018-1867-8

de Jesus Raposo, M.F., de Morais, R.M.S.C., de Morais, A.M.M.B. (2013). Health applications of bioactive compounds from marine Microalgae. Life Sci. 13, 479-486. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002 https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002

Dineshkumar, R., Kumaravel, R., Gopalsamy, J., Sikder, M.N.A., Sampathkumar, P. (2017). Microalgae as bio-fertilizer for rice growth and seed yield productivity. Waste Biomass Valor. 9, 793-800. https://doi.org/10.1007/s12649-017-9873-5 https://doi.org/10.1007/s12649-017-9873-5

Ding, L., Gutierrez, E.C., Cheng, J., Xia, A., O'Shea, R., Guneratnam, A.J., Murphy, J.D. (2018). Assessment of continuous fermentative hydrogen and methane coproduction using macro- and micro-algae with increasing organic loading rate. Energy. 151, 760-770. https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.03.103 https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.03.103

Doan, Q.C., Moheimani, N.R., Mastrangelo, A.J., & Lewis, D.M. (2012). Microalgal biomass for bioethanol fermentation: implications for hypersaline systems with an industrial focus. Biomass and Bioenergy, 46, 79-88. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.08.022

Dos Santos, M.G.B., Duarte, R.L., Maciel, A.M., Abreu, M., Reis, A., & de Mendonça, H.V. (2020). Microalgae Biomass Production for Biofuels in Brazilian Scenario: A Critical Review. BioEnergy Research. https://doi.org/10.1007/s12155-020-10180-1 https://doi.org/10.1007/s12155-020-10180-1

Ehimen, E.A., Connaugthon, S., Sun, Z., Carrigton, G.C. (2009). Energy recovery from lipids extracted, transesterified and glycerol co-digested microalgae biomass. Glob. Change Biol. Bioenergy. 1, 371-381. https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01029.x https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01029.x

Ekelhof, A., Melkonian, M. (2017). Enhanced extracellular polysaccharide production and growth by microalga Netrium digitus in a porous substrate bioreactor. Algal Res. 28, 184-191. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.003 https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.003

Ekmay, R., Gatrell, S., Lum, K., Kim, J., & Lei, X.G. (2014). Nutritional and metabolic impacts of a defatted green marine microalgal (Desmodesmus sp.) biomass in diets for weanling pigs and broiler chickens. Journal of agricultural and food chemistry, 62(40), 9783-9791. https://doi.org/10.1021/jf501155n

El-Baz, F.K., Hussein, R.A., Mahmoud, K., Abdo, S.M. (2018). Cytotoxic activity of carotenoid rich fraction from Haematococcus pluvialis and Dunaliella salina microalgae and the identification of the phytoconstituents using LC-DAD/ESI-MS. Phytother. Res. 32, 298-304. https://doi.org/10.1002/ptr.5976 https://doi.org/10.1002/ptr.5976

El-Dalatony, M.M., Kabra, A.N., Hwang, S.P., Govindwar, S.P., Kim, K.H., Kim, H., Jeon, B.H. (2016). Pretreatment of microalgal biomass for enhanced recovery/extraction of reducing sugars and proteins. Bioproc. Biosys. Eng. 39, 95-103. https://doi.org/10.1007/s00449-015-1493-5 https://doi.org/10.1007/s00449-015-1493-5

El-Dalatony, M.M., Salama, E.S., Kurade, M.B., Hassan, S.H.A., Oh, S.-E., Kim, S., Jeon, B.H. (2017). Utilization of microalgal biofractions for bioethanol, higher alcohols, and biodiesel production: a review. Energies. 10, 2110. https://doi.org/10.3390/en10122110 https://doi.org/10.3390/en10122110

Eppink, M.H.M., Olivieri, G., Reith, H., van den Berg, C., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H. (2017). From current algae products to future biorefinery practices: a review. In: Biorefineries. K. Wageman, N. Tippkötter (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg, 2017. 99-123. https://doi.org/10.1007/10_2016_64 https://doi.org/10.1007/10_2016_64

Faheed, F.A., Abd-El Fattah, Z. (2008). Effect of Chlorella vulgaris as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. ISSN OnlineAWB, J. Agri. Soc. Sci. 4, 1813-2235. https://www.fspublishers.org/published_papers/71170_..pdf

FDA. (2018). CFR-Code of Federal Regulations Title 21, Volume 1, Chapter I-Part 73-Listing of Color Additives Exempt from Certification, Subpart A-Foods, Sec. 73.185 Haematococcus algae meal. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=73.185

Fernández-Rodríguez, M.J., Rincón, B., Fermoso, F.G., Jimenez, A.M., Borja, R. (2014). Assessment of two-phase olive mill solid waste and microalgae co-digestion to improve methane production and process kinetics. Bioresour. Technol. 157, 263-269. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.096 https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.096

Gaffron, H., Rubin, J. (1942). Fermentation and photochemical products of hydrogen in algae. J. Gen. Physiol. 26, 219-240. https://doi.org/10.1085/jgp.26.2.219 https://doi.org/10.1085/jgp.26.2.219

García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A.E., Bárzana. (2014). E. Single cell protein: the algae. In: Encyclopedia of Food Microbiology Second Edition. C.A. Batt, M.L. Tortorello (eds.). Elsevier, Amsterdam. vol. 3, pp. 425-430. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00309-8 https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00309-8

Garcia-Gonzalez, J., Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga Acutodesmus dimorphus. J. Appl. Phycol. 28, 1051-1061. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0625-2 https://doi.org/10.1007/s10811-015-0625-2

Gerardo, M.I., Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Cowarda, T., Skill, S.C. (2015). Harvesting of microalga within a Biorefinery approach: a review of the developments and case studies from pilot-plants. Algal Res. 11, 248-262. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.019 https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.019

Gerken, H.G., Donohoe, B., Knoshaug, E.P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuel production. *Planta, 237*, 239-253. https://doi.org/10.1007/s00425-012-1765-0

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.I., Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. *Appl. Energy, 144*, 73-95. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045

Ghimire, A., Kumar, G., Sivagurunathan, P., Shobana, S., Saratale, G.D., Kim, H.W., Luongo, V., Esposito, G., Munoz, R. (2017). Bio-hythane production from microalgae biomass: key challenges and potential opportunities for algal bio-refineries. *Bioresour. Technol., 241*, 525-536. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.156

Ghosh, S., Xavier, B., Edward, L., Dash, B. (2016). *Live Feed for Marine Finfish and Shellfish Culture*. http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/10857

Ginzberg, A., Cohen, M., Sod-moriah, U., Shany, S., Rosenshtrauch, A., Arad, S.M. (2000). Chicken fed with biomass of the red microalga Porphyridium sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *J. Appl. Phycol., 12*, 325-330. https://doi.org/10.1023/A:1008102622276

Giraldo-Calderón, N.D., Romo-Buchelly, R.J., Arbeláez-Pérez, A.A., Echeverri-Hincapié, D., & Atehortúa-Garcés, L. (2018). Microalgae biorefineries: applications and emerging technologies. *DYNA, 85*(205), 219-233. https://doi.org/10.15446/dyna.v85n205.68780

Global Industry Analysts. (2022). Microalgae Global Market. Report. Obtenido de Research and Markets: https://www.researchandmarkets.com/reports/5140359/microalgae-global-market-trajectory-and

Golueke, C.G., Oswald, W.J., & Gotaas, H.B. (1957). Anaerobic digestion of algae. *Applied microbiology, 5*(1), 47-55. https://doi.org/10.1128/am.5.1.47-55.1957

Gong, Y., & Jiang, M. (2011). Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnol. Lett., 33*, 1269-1284. https://doi.org/10.1007/s10529-011-0574-z

González-González, L.M., Zhou, L., Astals, S., Thomas-Hall, S.R., Eltanahy, E., Pratt, S., Jensen, P.D., & Schenk, P.M. (2018). Biogas production coupled to repeat microalgae cultivation using a closed nutrient loop. *Bioresour. Technol., 263*, 625-630. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.039

Gonzalo, M.P.S., Orellana, Y.G., Simbaña, A.G., Tello, E.G., Borges, J.B., & Rodríguez, D.T. (2020). Propuesta de un protocolo para la obtención de fertilizante orgánico a partir de microalgas. *Agroindustria, Sociedad y Ambiente, 1*(14), 92-109.

Gruber-brunhumer, M.R., Jerney, J., Zohar, E., Nussbaumer, M., Hieger, C., & Bochmann, G. (2015). *Acutudesmus obliquus* as a benchmark strain for evaluating methane production from microalgae: influence of different storage and pretreatment methods on biogas yield. *Algal Res., 12*, 230-238. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.022

Guamán, M., & González, N. (2016). Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador. Corporación Para La Investigación Energética, 143.

Guerrero, A.B., & Muñoz, E. (2018). Life cycle assessment of second generation ethanol derived from banana agricultural waste: Environmental impacts and energy balance. *J. Cleaner Production, 174,* 710-717. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.298

Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M., Elst, K., & Wijffels, R. (2016). Influence of nitrogen depletion in the growth of *N. oleoabundans* on the release of cellular components after bead milling. *Bioresour. Technol., 214*, 89-95. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.072

Haas, S., Bauer, J.L., Adakli, A., Meyer, S., Lippmeier, S., Schwarz, K., & Schulz, C. (2016). Marine microalgae *Pavlova viridis* and *Nannochloropsis* sp. as n-3 PUFA source in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Appl. Phycol,. 28*, 1011-1021. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0622-5

Hamouda, R.A., Sherif, S.A., & Ghareeb, M.M. (2018). Bioethanol production by various hydrolysis and fermentation processes with micro and macro green algae. *Waste Biomass Valor. 9*, 1495-1501. https://doi.org/10.1007/s12649-017-9936-7

Hariskos, I., & Posten, C. (2014). Posten, Biorefinery of microalgae e opportunities and constraints for different production scenarios. *Biotechnol. J. 9*, 739-752. https://doi.org/10.1002/biot.201300142

Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., & Danquah, M.K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sustain. Energy Rev. 14*, 1037-1047. https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004

Hayes, M., Skomedal, H., Skjanes, K., Mazur-Marzec, H., Torunska-Sitarz, A., Catala, M., Isleten Hosoglu, M., & García-Vaquero, M. (2017). Microalgal Proteins for Feed, Food and Health. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts Feedstock Cultivation to End-Products*. González-Fernández, C., Muñoz, R. Elsevier Ltd. pp. 347-368. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00015-7

He, M.L., Hollwich, W., & Rambeck, W.A. (2002). Supplementation of algae to the diet of pig: a new possibility to improve the iodine content in the meat. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 86*, 97-104. https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2002.00363.x

Hena, S., Gutierrez, L., & Croué, J.P. (2021). Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from wastewater using microalgae: A review. *Journal of hazardous materials, 403*, 124041. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124041

Herrmann, C., Kalita, N., Wall, D., Xia, A., & Murphy, J.D. (2016). Optimized biogas production from microalgae through co-digestion with carbon-rich co-substrates. *Bioresour. Technol., 214*, 328-337. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.119

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerol as feedstocks for biodiesel production: perspectives and advances. *Plant J., 54*, 621-639. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x

Huilca, G., Licto, L., & Flores, R. (2019). Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel. *Revista Vínculos ESPE, 4*(1). https://doi.org/10.24133/vinculosespe.v4i1.1538

Jambo, S.A., Abdulla, R., Azhar, S.H.M., Marbawi, H., Gansau, J.A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renew. Sustain. Energy Rev., 65*, 756-769. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064

Jankowska, E., Ahu, A.K., & Oleskowicz, P. (2017). Biogas production from microalgae: review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev., 75*, 692-709. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.045

Jaramillo, R., & Romero, H. (2018). Tratamiento de las aguas del sector Las Katyas del estero El Macho en Machala mediante la *Thalassiosira* y *Tetraselmis*. Tesis de pregrado.

Jordaan, E., Roux-van der Merwe, M.P., Badenhorst, J., Konthe, G., & Botha, B.M. (2018). Evaluating the usability of 19 effluents for heterotrophic cultivation of microalgal consortia as biodiesel feedstock. *J. Appl. Phycol., 30*, 1533-1547. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1341-x

Karpagam, R., Raj, K.J., Ashokkumar, B., & Varalakshmi, P. (2015). Characterization and fatty acid profiling in two freshwater microalgae for biodiesel production: lipid enhancement methods and media optimization using response surface methodology. *Bioresour. Technol., 181*, 177-184. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.053

Kendir, E., & Ugurlu, A. (2018). A comprehensive review on pretreatment of microalgae for biogas production. I. *J. Energy Res., 42*, 3711-3731. https://doi.org/10.1002/er.4100

Kim, H.M., Oh, C.H., & Bae, H.-J (2017). Comparison of red microalgae (*Porphyridium cruentum*) culture conditions for bioethanol production. *Bioresour. Technol., 233*, 44-50. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.040

Kleemann, J., Koo, H., Hensen, I., Mendieta-Leiva, G., Kahnt, B., Kurze, C.,... & Fürst, C. (2022). Priorities of action and research for the protection of biodiversity and ecosystem services in continental Ecuador. *Biological Conservation, 265*, 109404. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109404

Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res., 6*, 52-63. https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002

Koutra, E., Economou, C.N., Tsafrakidou, P., & Komaros, M. (2018). Bio-based products from microalgae cultivated in digestates. *Trends Biotechnol., 36*, 819-833. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.015

Koutra, E., Tsafrakidou, P., Sakarika, M., & Kornaros, M. (2020). Microalgal Biorefinery. In: Yousuf, Abu (eds.). *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Elsevier Inc., 2020; 1-9. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1

Kwietniewska, E., & Tys, J. (2014). Process characteristics, inhibition factors and methane yield of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. Renew. Sustain. *Energy Rev., 34*, 491-500. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.041

Lam, M.K., & Lee, K.T. (2015). Bioethanol production from microalgae. In: *Handbook Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. S.K. Kim (eds.). Janice Audet, USA. pp. 197-208. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00012-1

Laurens, L. (2017). IEA: State of Technology Review-Algae *Bioenergy*. Task 39. ISBN: 978-1-910154-30-4.

Lavric, L., Cerar, A., Fanedl, L., Lazar, B., Zitnik, M., & Logar, R.M. (2017). Thermal pretreatment and bioaugmentation improve methane yield of microalgal mix produced in thermophilic anaerobic digestate. *Anaerobe, 46*, 162-169. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.02.001

Levine, R.B., Constanza-Robinson, M.S., & Spatafora, G.A. (2011). *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass Bioenergy, 35*, 40-49. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.035

Lim, K.C., Yusoff, F.M., Shariff, M., & Kamarudin, M.S. (2017). Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Rev. Aquacult., 10*, 738-773. https://doi.org/10.1111/raq.12200

Lodge-Ivey, S.L., Tracey, L.N., & Salazar, A. (2014). Ruminant nutrition symposium: The utility of lipid extracted algae as a protein source in forage or starch-based ruminant diets. *J. Anim. Sci., 92*, 1331-1342. https://doi.org/10.2527/jas.2013-7027

Luo, X., Su, P., & Zhang, W. (2015). Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications. *Mar. Drugs, 13*, 4231-4254. https://doi.org/10.3390/md13074231

Madeira, M.S., Cardoso, C., Lopes, P.A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N.M., & Prates, J.A.M. (2017). Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: a review. *Livest. Sci., 205*, 111-121. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.09.020

Mahdy, A., Mendez, L., Tomás-Pejó, E., del Mar Morales, M., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2016). Influence of enzymatic hydrolysis on the biochemical methane potential of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. *J. Chem. Technol. Biotechnol., 91*, 1299-1305. https://doi.org/10.1002/jctb.4722

Maliha, A., & Abu-Hijleh, B. (2022). A review on the current status and post-pandemic prospects of third-generation biofuels. *Energy Systems*, 1-32. https://doi.org/10.1007/s12667-022-00514-7

Maltsoglou, I., Koizumi, T., & Felix, E. (2013). The status of bioenergy development in developing countries. *Global Food Security, 2*(2), 104-109. https://doi.org/10.1016/j.gfs.2013.04.002

Mandotra, S.K., Kumar, P., Suseela, M.R., Nayaka, S., & Ramteke, P.W. (2016). Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresour. Technol., 201,* 222-229. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.042

Maneein, S., Milledge, J.J., Nielsen, B.V., & Harvey, P.J. (2018). A Review of Seaweed Pre-Treatment Methods for Enhanced Biofuel Production by Anaerobic Digestion or Fermentation. *Fermentation, 4*(100), 1-31. https://doi.org/10.3390/fermentation4040100

Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high value compounds and biofuel production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnol. Adv., 31*, 1532-1542. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011

Martin-Juarez, J., Markou, G., Muylaert, K. Lorenzo-Hernando, A., & Bolado, S. (2017). Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: solving the hurdles. In: Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts Feedstock Cultivation to End-Products. González-Fernández, C., Muñoz, R. Elsevier Ltd. pp. 209-234. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00008-X

Maurya, R., Chokshi, K., Ghosh, T., Trivedi, K., Pancha, I., Kubavat, D., Mishra, S., & Ghosh, A. (2016). Lipid extracted microalgal biomass residue as a fertilizer substitute for *Zea mays* L. *Front. Plant Sci., 6*, 1266. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01266

McClure, D.D., Luiz, A., Gerber, B., Barton, G.W., & Kavanagh, J.M. (2018). An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res., 29*, 41-48. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.015

Mercado, I., Álvarez, X., Verduga, M. E., & Cruz, A. (2020). Enhancement of biomass and lipid productivities of *Scenedesmus* sp. cultivated in the wastewater of the dairy industry. *Processes, 8*(11), 1458. https://doi.org/10.3390/pr8111458

Mercado-Reyes, I. (2022). Efecto de la luz roja (λ= 600-680 nm) en el cultivo semicontinuo de *Chlorella* sp.: crecimiento, productividad y composición bioquímica de la biomasa. Tesis. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15097.95848

Mercado-Reyes, I., & Álvarez-Montero, X. (2022). Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de las Reservas Buenaventura y Jorupe, Jocotoco, Ecuador. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. ISBN: 978-84-15413-51-6

Meticulous Research. (2021). Spirulina Market by Distribution Channel (Consumer Channel, Business Channel), Product Type (Powder, Tablets, Capsules, Flakes, Phycocyanin Extract), Application (Nutraceuticals, Food and Beverages, Agriculture, Animal Feed) - Global Forecast to 2028. Reporte. Obtenido de https://www.meticulousresearch.com/product/spirulina-market-5070

Mikami, K., & Hosokawa, M. (2013). Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in Brown seaweeds. *Int. J. Mol. Sci., 14*, 13763-13781. https://doi.org/10.3390/ijms140713763

Milano, J., Ong, H.C., Masjuki, H.H., Chong, W.T., Lam, M.K., Loh, P.K., & Vellayan, V. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renew. Sustain. Energy Rev., 58*, 180-197. https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.150 ht

Ministerio de Energía y Recursos Naturales No Renovables. (2021). Balance Energético Nacional 2020. https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2021/09/Balance-Energetico-Nacional-2020-Web.pdf

Miranda, A.M., Hernández-Tenorio, F., Ocampo, D., Vargas, G.J., & Sáez, A.A. (2022). Trends on CO_2 Capture with Microalgae: A Bibliometric Analysis. *Molecules, 27*(15), 4669. https://doi.org/10.3390/molecules27154669

Moate, P.J., Williams, S.R.O., Grainger, C., Hannah, M.C., Ponnampalam, E.N., & Eckard, R.J. (2011). Influence of cold-pressed canola, brewers grains and hominy meal as dietary supplements suitable for reducing enteric methane emissions from lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol., 166-167*, 254-264. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.069

Montingelli, M.E., Tedesco, S., & Olabi, A.G. (2015). Biogas production from algal biomass: a review. Renew. *Sustain. Energy Rev., 43*, 961-972. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.052

Morelos Gómez, J. (2016). Análisis de la variación de la eficiencia en la producción de biocombustibles en América Latina. *Estudios Gerenciales, 32*(139), 120-126. doi:10.1016/j.estger.2016.01.001

Mulbry, W., Kondrad, S., & Pizarra, C. (2007). Biofertilizers from algal treatment of dairy and swine manure effluents: Characterization of Algal Biomass as a Slow Release Fertilizer. *J. Veg. Sci., 12*(4), 107-125. https://doi.org/10.1300/J484v12n04_08

Murphy, J.D., Drosg, B., Allen, E., Jerney, J., Xia, A., & Herrmann, C.A. (2015). Perspective on Algal Biomass. IEA Bioenergy. https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2015/09/AD_of_Algae_ebook_end.pdf

Mussgnug, J.H., Klassen, V., Schulüter, A., & Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol., 150*, 51-56. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030

Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., & Bux, F. (2011). Bioprospecting for hyperelipid producing microalgal strain for sustainable biofuel production. *Bioresour. Technol., 102*, 57-70. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.077

Najdenski, H.M., Gigova, L.G., Illiev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavsky, J., Tsetkova, I.V., Ninova, M.S., & Kussovski, V.K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *Int. J. Food. Sci. Technol., 48*, 1533-1540. https://doi.org/10.1111/ijfs.12122

Navarro, F., Forján; E., Vázquez, M., Montero, Z., Bermejo, E., Castaño, M.A., Toimil, A., Chagüaceda, E., García-Sevillano, M.A., Sánchez, M., Domínguez, E., Pásaro, R., Garbayo, I., Vílchez, C., & Vega, J.M. (2016). Microalgae as a safe food source for animals: nutritional characteristics of the acidophilic microalgae *Coccomyxa onubensis*. *Food Nutr. Res., 60*, 30472. https://doi.org/10.3402/fnr.v60.30472

Neves, V.T.D.C., Andrade, E., & Perelo, L.W. (2016). Influence of lipid extraction methods as pre-treatment of microalgal biomass for biogas production. *Renew. Sustain. Energy Rev., 59*, 160-165. https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.303

Nguyen, C.M., Nguyen, T.N., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Park, Y.J., & Kim, J.C. (2014). Acid hydrolysis of *Curcuma longa* residue for ethanol and lactic acid fermentation. *Bioresour. Technol., 151*, 227-235. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.039

Olguín, E.J., Sánchez-Galván, G., Arias-Olguín, I. I., Melo, F.J., González-Portela, R.E., Cruz, L.,... & Adessi, A. (2022). Microalgae-based biorefineries: Challenges and future trends to produce carbohydrate enriched biomass, high-added value products and bioactive compounds. *Biology, 11*(8), 1146. https://doi.org/10.3390/biology11081146

Orejuela-Escobar, L.M., Landázuri, A.C., & Goodell, B. (2021). Second generation biorefining in Ecuador: Circular bioeconomy, zero waste technology, environment and sustainable development: The nexus. *Journal of Bioresources and Bioproducts, 6*(2), 83-107. https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.01.004

Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S.K., Ghosh, A., & Mishra, S. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour. Technol., 189*, 341-348. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017

Papadopoulos, B.G., Goulas, C., Apostolaki, E., & Abril, R. (2002). Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes. *J. Dairy Res., 69*, 357-365. https://doi.org/10.1017/s0022029902005599

Passos, F., Ferrer, I. (2014). Microalgae conversion to biogas: thermal pretreatment contribution on net energy production. *Environ. Sci. Technol., 48*, 7171-7178. https://doi.org/10.1021/es500982v

Passos, F., Uggetti, E., Carrere, H., & Ferrer, I. (2015). Algal biomass: physical pretreatment. In: *Pretreatment of Biomass*. A. Pandey, S. Negi, P. Binod, C. Larroche (eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 195-226. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00011-6

Patterson, D., & Gatlin, D.M. (2013). Evaluation of whole and lipid-extracted algae meals in the diets of juvenile red drum (Sciaenops ocellatus). Aquacult., 416-417, 92-98. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.033 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.033

Perez-Garcia, O. Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res., 45*, 11-36. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037

Phwam, C.K., Ong, H.C., Chen, W.H., Ling, T.C., Ng, E.P., & Show, P.I. (2018). Overview: comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. *Energy Convers. Manag., 173*, 81-94. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.07.054

Polaris Market Research. (2022). Microalgae Market Share, Size, Trends, Industry Analysis Report, By Product Type (*Dunaliella Salina*, *Spirulina*, *Chlorella*, others), Microalgae Strain (*Haematococcus pluvialis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, *Nannochloropsis*, others), Grade (Food Grade, Feed Grade, Fuel Grade, Cosmetics Grade, Others), Application, By Region; Segment Forecast, 2022 - 2030. Report ID: PM2246.

Pribyl, P., Cepák, V., & Zachleder, V. (2012). Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol., 94*, 549-561. https://doi.org/10.1007/s00253-012-3915-5

Pulyaeva, V.N., Kharitonova, N.A., & Kharitonova, E.N. (2020). Advantages and Disadvantages of the Production and Using of Liquid Biofuels. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 976(1), p. 012031). IOP Publishing. https://doi.org/10.1088/1757-899X/976/1/012031

Rangabhashiyam, S., Behera, B., Aly, N., & Balasubramanian, P. (2017). Biodiesel from microalgae as a promising strategy for renewable bioenergy production - a review. *J. Environ. Biotechnol. Res., 6*, 260-269.

Rashid, N., Rehman, M.S.U., Sadiq, M., Mahmood, T., & Han, J.I. (2014). Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. Renew. Sustain. *Energy Rev., 40*, 760-778. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.104

Renuka, N., Prasanna, R., Sood, A., Ahluwalia, A., Bansai, R., Babu, S., Singh, R., Shivay, Y., Nain, L. 2016. Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. Environ. *Sci. Pollut. Res., 23*, 6608-6620. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5884-6

Reyimu, Z., & Ozçimen, D. (2017). Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production. *J. Clean. Prod., 150*, 40-46. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.189

Rincón, B., Fernández-Rodríguez, M.J., de la Lama-Calvente, D., & Borja, R. (2018). The influence of Microalgae Addition as Co-substrate in Anaerobic Digestion Processes. In: *Microalgal Biotechnology*. E. Jacob-Lopes, L. Queiroz Zepka, M.I. Queiroz (eds.). https://doi.org/0.5772/intechopen.71228

Ruiz, J., Olivieri, G., de Vree, J., Bosma, R., Willems, P., Hans Reith, J., Eppink, M.H.M., Kleinegris, D.M.M., Wijffels, R.H., & Barbosa, M.J. (2016). Towards industrial products from microalgae. *Energy & Environmental Sci., 9*, 3036-3043. https://doi.org/10.1039/C6EE01493C

Safafar, H., van Wagenen, J., Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. Mar. *Drugs, 13*, 7339-7356. https://doi.org/10.3390/md13127069 https://doi.org/10.3390/md13127069

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35*, 265-278. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007

Safinaz, A.F., & Ragaa, A.H. (2013). Effect of some red marine algae as biofertilizers on growth of maize (*Zea mays* L.) plants. *Int. Food. Res. J., 20*, 1629-1632. http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20(04)%202013/17%20IFRJ%2020%20(04)%202013%20Ragaa%20(421).pdf

Sambusiti, C., Belluci, M., Zabaniotou, A., Beneduce, L., & Monlau, F. (2015). Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review. Renew. *Sust. Energy. Rev., 44*, 20-36. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.12.013

Sanchez Rizza, L., Sanz Smachetti, M.E., Do Nascimento, M., Salerno, G.I., & Curatti, L. (2017). Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. *Algal Res., 22*, 140-147. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.021

Sandoval, M.A., Flores, M., Narváez, R.., & López-Villada, J. (2015). Phototrophic culture of *Chlorella* sp. using charcoal ash as an inorganic nutrient source. *Algal Res., 11*, 368-374. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.008

Sankaran, R., Show, P.L., Nagarajan, D., & Chang, J.S. (2018). Exploitation and Biorefinery of Microalgae. In: *Waste Biorefinery, Potential and Perspectives*. T. Bhaskar, A. Pandey, S. Venkata Mohan, D, Lee, S. Kumar Khanal (eds.). Elsevier Inc. 571-601. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00019-7

Sawin, L., Martinot, E., Mastny, L., Lempp, P., Sonntag-O'Brien, V., Foulon, S., Roussell, J., & Welker, B. (2009). Renewables global status report - 2009 Update (INIS-FR--15-0644). France

Schwede, S., Kowalczyk, A., Gerber, M., & Span, R. (2011). Influence on Different Cell Disruption Techniques on Mono Digestion of Algal Biomass. *World Renewable Energy Congress*, Sweden (Linköping). https://ep.liu.se/ecp/057/vol1/006/ecp57vol1_006.pdf

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol., 9,* 345-381. https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850

Sharma, K.K., Schuhmann, H., & Schenk, P.M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies, 5*, 1532-1553. https://doi.org/10.3390/en5051532

Shin, Y.S., Jeong, J., Nguyen, T.H.T., Kim, J.Y.H., Jin, E., & Sim, S.J. (2019). Targeted knockout of phospholipase A2 to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production. *Bioresour. Technol., 271*, 368-374. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.121

Shobana, S., Saratale, G.D., Pugazhendhi, A., Arvindnarayan, S., Periyasamy, S., Kumar, G., & Kim, S.H. (2017). Fermentative hydrogen production from mixed and pure microalgae biomass: key challenges and possible opportunities. *Int. J. Hydrog. Energy, 42*, 26440-26453. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.050

Shokrkar, H., Ebrahimi, S., & Zamani, M. (2018). Enzymatic hydrolysis of microalgae cellulose for bioethanol production, modeling and sensitivity analysis. *Fuel, 228*, 30-38. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.04.143

Show, P. L. (2022). Global market and economic analysis of microalgae technology: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 127329. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127329

Shuba, E.S., Kifle, D. (2018). Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. Renew. *Sust. Energy Rev., 81*, 743-755. https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.042

Silva-Martínez, R.D., Sanches-Pereira, A., Ortiz, W., Goméz, M.F., & Coelho, S.T. (2020). The state-of-the-art of organic waste to energy in Latin America and the Caribbean: Challenges and opportunities. *Renewable Energy*. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.056

Simbaña, A.G. (2019). Evaluación de un fertilizante microalgal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

Simkus, A., Simkiené, A., Cemauskiené, J., Kvietkuté, N., & Cemauskas, A. (2013). The effect of blue green algae *Spirulina platensis* on pig growth performance and carcass and meat quality. *Vet. Med. Zoot., 61*(83), 70-74. https://vetzoo.lsmuni.lt/data/vols/2013/61/pdf/simkus.pdf

Singh, S., Chakravarty, I., Pandey, K.D., & Kundu, S. (2018). Development of a Process Model for Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Algal Starch to Third Generation Bioethanol. *Biofuels, 11*(7), 847-855. https://doi.org/10.1080/17597269.2018.1426162

Sirajunnisa, A.R., & Surendhiran, D. (2016). Algae quintessential and positive resource of bioethanol production: a comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev., 66*, 248-267. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.024

Skrede, A., Mydland, L.T., Ahlstrøm, Ø., Reitan, K.I., Gislerød, H.R., & Øverland, M. (2011). Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *J. Anim. Feed Sci., 20*, 131-142. https://doi.org/10.22358/jafs/66164/2011

Slade, R., & Bauen, A. (2013). Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass Bioenergy, 53*, 29-38. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.019

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng., 101*, 87-96. https://doi.org/10.1263/jbb.101.87

Srinuanpan, S., Cheirsilp, B., & Asyraf, M. (2020). Oleaginous Microalgae Cultivation for Biogas Upgrading and Phytoremediation of Wastewater. In: *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Yousuf, Abu (eds.). Elsevier Inc., 2020; 1-9. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1

Srivastava, G., Nishchal, & Goud, V.V. (2017). Salinity induced lipid production in Microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR_047). *Bioresour Technol., 42*, 244-252. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.175

Stamey, J.A., Shepherd, D.M., de Veth, M.J., & Corl, B.A. (2012). Use of algae or algal oil rich in n-3 fatty acids as a feed supplement for dairy cattle. *J. Dairy Sci., 95*, 5269-5275. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5412

Stamm, M. (2015). Effect of different microalgae supplements on fatty acid composition, oxidation stability, milk fat globule size and phospholipid content of bovine milk. M.Sc. Thesis. ISSN 0355-1180. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/157470/Thesis%20final_Matthias%20Stamm.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Stefanski, F. S., Camargo, A. F., Scapini, T., Bonatto, C., Venturin, B., Weirich, S. N.,... & Treichel, H. (2020). Potential Use of Biological Herbicides in a Circular Economy Context: A Sustainable Approach. *Frontiers in Sustainable Food Systems, 4*, 195. https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.521102

Stojkovic, D., Torzillo, G., Faraloni, C., & Valant, M. (2015). Hydrogen production by sulfur-deprived TiO2-encapsulated Chlamydomonas reinhardtii cells. *Int. J. Hydrog. Energy, 40*, 3201-3206. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.115

Subía, S., & Rubio, J. (2018). Evaluación de biomasa de microalgas de la laguna Limoncocha como materia prima para la obtención de biocombustibles. *Enfoque UTE, 9*(2), 106-116. https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.199

Suzuki, H., Hulatt, C.J., Wijffels, R.H., & Kiron, V. (2019). Growth and LC-PUFA production of the cold-adapted microalga *Koliella antarctica* in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology, 31*(2), 981-997. https://doi.org/10.1007/s10811-018-1606-z

Tanaka, T., Yabuuchia, T., Maedaa, Y., Nojimaa, D., Matsumotob, M., & Yoshino, T. (2017). Production of eicosapentaenoic acid by high cell density cultivation of the marine oleaginous diatom *Fistulifera solaris*. *Bioresour. Technol., 245*, 567-572. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.005

Tello, E.G. (2018). Respuesta agronómica del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) a un biofertilizante con base en microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus*, 2016 (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

Tocher, D.R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquacult., 449*, 94-107. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010

Tran, D.T., Yeh, K.L., Chen, C.L., & Chang, J.S. (2012). Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase. *Bioresour. Technol., 108*, 119-127. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.145

Trevelyan, W.E. (1978). Processing yeast to reduce its nucleic acid content. Induction of intracellular RNase action by a simple heat-shock procedure, and an efficient chemical method based on extraction of RNA by salt solutions at low pH. *J. Sci. Food. Agric., 29*, 141-147. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290211

Uctug, G., Modi, D.N., & Mavituna, F. (2017). Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae: a mass and energy balance approach in order to compare conventional with in situ transesterification. Int. J. Chem. Eng. Appl., 8, 355-360. https://doi.org/10.18178/ijcea.2017.8.6.683 https://doi.org/10.18178/ijcea.2017.8.6.683

Uysal O., Uysal, F.O, & Ekinci, K. (2015). Evaluation of Microalgae as Microbial Fertilizer. *European Journal of Sustainable Development, 4*(2): 77-82. https://doi.org/10.14207/ejsd.2015.v4n2p77

Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., & Eppink, M.H.M. (2013). Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresource Technology, 135*, 142-149. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.135

Vargas, J.V.C., Kava, V., Balmant, W., Mariano, A.B., & Ordonez, J.C. (2016). Modeling microalgae derived hydrogen production enhancement via genetic modification. Int. *J. Hydrog. Energy, 41*, 8101-8110. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.217

Vargas, S.R., dos Santos, P.V., Giraldi, L.A., Zaiat, M., & do Carmo Calijuri, M. (2018). Anaerobic phototrophic processes of hydrogen production by different strains of microalgae *Chlamydomonas* sp. *FEMS Microbiol. Lett., 9,* 365-fny073. https://doi.org/10.1093/femsle/fny073

Vega-Quezada, C., Blanco, M., & Romero, H. (2017). Synergies between agriculture and bioenergy in Latin American countries: A circular economy strategy for bioenergy production in Ecuador. *New Biotechnology, 39*, 81-89. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.730

Veillette, M., Giroir-Fendler, A., Faucheux, N., & Heitz, M. (2018). Biodiesel from microalgae lipids: from inorganic carbon to energy production. *Biofuels, 9,* 175-202. https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1289667

Vela-García, N., Guamán-Burneo, M.C., & González-Romero, N.P. (2019). Biorremediación eficiente de efluentes metalúrgicos mediante el uso de microalgas de la amazonía y los andes del Ecuador. *Revista internacional de contaminación ambiental, 35*(4), 917-929. https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.04.11

Velázquez-Martí, B., Gaibor-Chávez, J., Niño-Ruiz, Z., & Narbona-Sahuquillo, S. (2018). Complete characterization of pruning waste from the lechero tree (*Euphorbia laurifolia* L.) as raw material for biofuel. *Renewable energy, 129*, 629-637. https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.050

Verduga, M.E. (2020). Cultivo en batch de *Scenedesmus* spp., en aguas residuales de industrias lácteas: Crecimiento, Productividad y Composición bioquímica. Tesis de pregrado.

Villamar, D., Soria, R., Rochedo, P., Szklo, A., Imperio, M., Carvajal, P., & Schaeffer, R. (2021). Long-term deep decarbonisation pathways for Ecuador: Insights from an integrated assessment model. *Energy Strategy Reviews, 35,* 100637. https://doi.org/10.1016/j.esr.2021.100637

Vossen, E., Raes, K., Van Mullem, D., & De Smet, S. (2017). Production of docosahexaenoic acid (DHA) enriched loin and dry cured ham from pigs fed algae: nutritional and sensory quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol., 119*, 1600144. https://doi.org/10.1002/ejlt.201600144

Wang, J., & Yin, Y. (2018). Fermentative hydrogen production using pretreated microalgal biomass as feedstock. *Microb. Cell Fact., 17*, 22. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0871-5

Wang, M., Sahu, A.K., Rusten, B., & Park, C. (2013). Anaerobic co-digestion of microalgae Chlorella sp. and waste activated sludge. *Bioresour. Technol., 142*, 585-590. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.096

Weatherly, M.E. (2015). Algae or yeast supplementation for lactating dairy cows. *Theses and Dissertations-Animal and Food Sciences, 47*. https://uknowledge.uky.edu/animalsci_etds/47/

Wieczorek, N., Kucuker, M.A., & Kuchta, K. (2014). Fermentative hydrogen and methane production from microalgal biomass (*Chlorella vulgaris*) in a two-stage combined process. *App. Energy, 132*, 108-117. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.07.003

Wu, G. (2014). Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition. *J. Anim. Sci. Biotechnol., 5*, 34. https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-34

Wuang, S.C., Khin, M.C., Chua, P.Q.D., & Luo, Y.D. (2016). Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal Res., 15*, 59-64. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.009

Xiao, R., & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv., 34*, 1225-1244. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004

Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., & Takriff, M.S. (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *J. Biol. Res., 21*, 6. https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-6

Yerovi Guzmán, R. (2020). Comparación de métodos de desinfección para aguas residuales de porcicultura destinadas al cultivo de *Chlorella vulgaris*. Tesis de pregrado.

Yousuf, A. (2020). Fundamentals of Microalgae Cultivation. In: *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Yousuf, Abu (eds.). Elsevier Inc., 2020; 1-9. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1

Yu, Z., Song, M., Pei, H., Han, F., Jiang, L., & Hou, Q. (2017). The growth characteristics and biodiesel production of ten algae strains cultivated in anaerobically digested effluent from kitchen waste. *Algal Res., 24*, 265-275. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.010

Zhen, G., Lu, X., Kobayashi, T., Kumar, G., & Xu, K. (2016). Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: kinetic modeling and synergistic evaluation. *Chem. Eng. J., 299*, 332-341. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.118

Zhu, L. (2015). Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: an innovative framework. *Renew. Sustain. Energy Rev., 41*, 1376-1384. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.040

Digestión anaeróbica: Perspectivas en Ecuador

Xavier Álvarez Montero[1]*, Ingrid Mercado-Reyes[2]

[1]ESPE-Universidad de las Fuerzas Armadas, sede Santo Domingo. Ecuador.

[2]Laboratorio de Biotecnología Microbiana (LabBiotem S.A.), Ceibos Calle 17, 0210 y Calle Transversa, Guayaquil-Ecuador.

***Autor para correspondencia:** *xgalvarez@espe.edu.ec*

1. Introducción

El metano (CH_4) fue caracterizado por primera vez a finales del siglo XVIII por el físico italiano Alessandro Volta como el gas inflamable contenido en las burbujas que emergían de los pantanos, sin darle la importancia energética que tiene este compuesto en los actuales momentos (FAO, 2011a). Para la producción a escala de metano se comenzó a estudiar el proceso de la digestión anaeróbica (DA), proceso en el que la materia orgánica es descompuesta por la acción de microrganismos para producir una mezcla de gases constituida mayoritariamente por metano y CO_2, con algunas impurezas y contaminantes (entre ellos H_2S).

El principal producto, conocido como biogás, es utilizado como combustible y el otro subproducto, el material digerido, puede ser usado como abono para uso agrícola. La digestión anaeróbica puede ser empleada para procesar aguas residuales, residuos animales y municipales u otros materiales orgánicos industriales, domésticos o comerciales. Previo al proceso, estos materiales son generalmente pre-tratados para mezclar diferentes tipos de materiales, para adicionar agua, o reducir materiales inertes (por ejemplo, plásticos y vidrio) y de esa manera mejorar la eficiencia del proceso (cantidad de metano obtenido respecto a la materia prima original). Los equipos empleados para el proceso son conocidos como biodigestores o reactores anaerobios. La clasificación de estos equipos puede obedecer a la temperatura de trabajo, contenido de humedad de la materia usada, o número de etapas de digestión (Peláez *et al.,* 2015).

El metano durante la segunda guerra mundial resultó importante por la escasez de combustible y el incremento de su demanda, sin embargo, al terminar la guerra y por la abundante disponibilidad de combustibles fósiles, la gran mayoría de instalaciones que producían este biocombustible fueron cerradas. En la década de los 60s India impulsa la tecnología de producción de biogás a partir de estiércol bovino con el objetivo de aprovechamiento energético y obtención de biofertilizante. China a inicios de la década de los 70s

promueve la construcción de digestores, mientras que en los países desarrollados el impulso de la tecnología de la biodigestión corresponde mayormente a motivaciones medioambientales más que a puramente energéticas, constituyendo un proceso de estabilización de lodos activos de las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (*EDAR-Estación Depuradora de Aguas Residuales*) (FAO, 2011a).

2. Situación de la Digestión Anaeróbica en Ecuador

2.1 Historia de la Digestión Anaeróbica

Ecuador incursionó en la tecnología del biogás en el año de 1974, apoyado por la Organización Latinoamericana de Energía (OLADE) y el Cuerpo de Paz de los EE.UU. (Marchaim, 1992). En 1979 se creó el Instituto Nacional de Energía (INE), que en 1980 incursionó en un programa nacional de capacitación y difusión sobre la tecnología de biodigestores (Marchaim, 1992). La fase inicial del programa contó con la colaboración del Cuerpo de Paz, construyéndose 13 biodigestores del tipo hindú. Posteriormente el INE construyó dos digestores, y entrenó a personal en varias zonas rurales del país con la colaboración de otras instituciones ecuatorianas (Maestas *et al.*, 1986). Dentro del programa sobre biodigestores, se elaboró material relacionado al diseño y construcción de biodigestores del tipo hindú, con capacidades de 8 a 51 m^3, con una producción de biogás diaria de 3 a 20 m^3, respectivamente (Acuña, 1984).

El programa sobre biodigestores del INE tuvo en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) un aliado importante, con quien realizó trabajos de investigación en las provincias de Guayas, Manabí y Chimborazo (González Chong *et al.*, 1987). El INE construyó un biodigestor en Manabí (Rancho Ronald), que producía biogás para el funcionamiento de un electrogenerador de 2 kW. En 1982, investigadores de ESPOL diseñaron, construyeron y realizaron el seguimiento de un biodigestor ubicado en La Moya (Chimborazo) que inicialmente produjo un volumen diario de 1,5 m^3 de biogás. Este biodigestor tuvo problemas en su producción debido a la temperatura de la zona, por lo que se acopló un sistema solar de calentamiento de agua que permitió mejorar el rendimiento del sistema hasta en un 50% (González Chong *et al.*, 1987).

Para 1988, Ecuador contaba con alrededor de 65 biodigestores, la mayoría del tipo hindú, pero solamente 23 unidades estaban en funcionamiento (Marchaim, 1992). El mayor problema encontrado fue el financiamiento para continuar con el mantenimiento de los biodigestores instalados. La década de los 90s fue una "década perdida" para los biodigestores, tanto en Ecuador, como en el resto de la región, debido principalmente a que no se lograron cumplir las expectativas generadas con los proyectos de la década anterior (Peláez et al., 2015).

En 2002 que se produce la instalación de los primeros biodigestores tubulares familiares en el valle del Intag (Imbabura) por parte de la Asociación de Campesinos Agroecológicos de Intag (ACAI), habiendo acumulado más de 80 sistemas. Estos sistemas están basados en el llamado modelo CIPAV (Botero y Preston, 1987), desarrollado en 1987 en Colombia por el Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV), del cual toma el nombre. Estos biodigestores están semienterrados,

cuando están en funcionamiento, toman una forma característica de salchicha, como es conocido el modelo en algunos lugares. Para el reactor se utiliza plástico de invernadero (polietileno de baja densidad y filtro UV de espesores en torno a 0,15-0,20 mm) en forma tubular, que se une a dos tuberías de cemento colocadas horizontalmente a la entrada y salida (Figura 1).

Estas tuberías conectan, en ambos extremos del biodigestor, con cámaras construidas en ladrillo o pre-fabricadas en cemento. De esta manera se consigue un sifón que impide que el biogás generado en el biodigestor escape por la entrada o por la salida. Estos biodigestores entran en el concepto de "*low-cost digesters*" (digestores de bajo costo), junto con los biodigestores de domo fijo y cúpula flotante, ya que no requieren de sistemas activos de calefacción ni agitación (Peláez *et al.*, 2015).

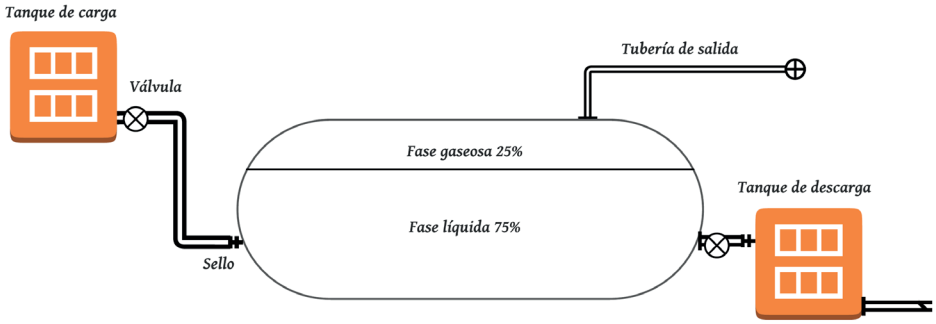


Figura 1. Esquema de un biodigestor modelo CIPAV.

Los biodigestores instalados en el valle del Intag tienen de 8 a 10 m de largo, y utilizan plástico de 4 m de circunferencia, obteniendo un volumen de 7,5 a 9,57 m^3, siendo 6 a 7,5 m^3 correspondientes la fase líquida, todos están vinculados a corrales de cerdos con piso de cemento, con 4 a 15 animales, número que varía a lo largo del año. En todos los casos hay un fuerte aprovechamiento del abono orgánico o biol para los cultivos familiares y del biogás generado para cocinar. En 2012, la ACAI, a través de la Coordinadora Ecuatoriana de Agroecología (CEA) instaló 12 sistemas similares en la Provincia de Azuay, y seis más en Loja, difundiendo la tecnología al sur del país. A partir de la experiencia de Intag, también se ha instalado una docena de estos sistemas en Cayambe, Pichincha, y Napo, siempre bajo el mismo diseño que considera un tiempo de retención en torno a los 40-55 días. En la provincia de Carchi, desde 2009, también se han instalado una decena de biodigestores tubulares en un proceso autónomo.

En la provincia de El Oro, también hay implementación de biodigestores tubulares, en este caso basados en el diseño original de esta tecnología desarrollada por Botero y Preston, y a partir del cual se desarrollaría en los posteriores años el modelo CIPAV (Peláez *et al.*, 2015). La diferencia de estos modelos estriba en la entrada y salida del biodigestor tubular, debido a que, en el diseño original de Botero y Preston, éstas se hacían con baldes sin fondo apilados inclinados (logrando hacer un sifón igualmente) sin necesidad de

cámaras rígidas a la entrada y salida. En El Oro, los biodigestores alcanzan mayor tamaño, hasta los 13 m^3 de volumen líquido (en este caso para tratar las aguas de lavado de un corral de más de 50 cerdos), considerando además que el tiempo de retención en estos casos baja a 25-30 días, debido a que están ubicados en una zona con mayor temperatura que los biodigestores anteriormente comentados (Martí-Herrero, 2013).

En el 2008 la Corporación ENYA realizó una consultoría para el Ministerio de Electricidad y Energía Renovable (MEER), como resultado de este análisis se determinó, que utilizando todas la excretas de ganado porcino producidas a nivel nacional se podría cogenerar alrededor de 1600 GW h^{-1} $año^{-1}$, siendo uno de los sectores importantes por el tamaño y por el escaso uso de este residuo en la agricultura, y que las zonas de mayor potencial son Santo Domingo y Pasaje con 189,3 y 157,6 GW h^{-1} $año^{-1}$, respectivamente. En cuanto al desarrollo de sistemas de biodigestores, se reportó que es un concepto manejado hace algunos años, pero solo a nivel artesanal, y que no se ha explotado la biodigestión a gran escala, algunas empresas han comenzado proyectos de biodigestores grandes (5000-11000 m^3), el objetivo no es la producción de energía, sino el manejo correcto de sus desechos orgánicos (FAO, 2011b).

Para el año 2012 la Empresa Pública Municipal de Aseo de Cuenca (EMAC EP), y la BGP ENGINEERS (Países Bajos), constituyen la empresa EMAC-BGP-ENERGY para la extracción y aprovechamiento de gas metano del Relleno Sanitario de Pichacay, con una generación de 2 MW en el año 2019. Mientras que para el año 2019 se establece un sistema de extracción y quema de biogás del Relleno Sanitario Las Iguanas, esta gas metano se transforma en energía eléctrica, proyecto desarrollado por el Municipio de Guayaquil con fondos del Corporación Andina de Fomento (CAF). Para grandes productores de residuos orgánicos, la tecnología más accesible y adaptable a las infraestructuras existentes de tratamiento de residuos, es la laguna cubierta. Las lagunas cubiertas entran también dentro del concepto de "*low cost digesters"* por la ausencia de sistemas activos de calefacción o agitación. La empresa Productora Nacional de Alimentos C.A. (PRONACA) es un ejemplo del aprovechamiento de biodigestores de laguna cubierta para la producción de biogás y biol.

PRONACA cuenta con seis biodigestores de laguna cubierta localizados en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. PRONACA posee un biodigestor con un volumen de 11.000 m^3 (el más grande del país), el cual recibe 250 m^3 diarios de agua de desechos de aproximadamente 8.000 cerdos. Debido a que el precio de la energía eléctrica tiene un valor menor al que se requiere para invertir en una planta propia, PRONACA quema el biogás generado de este biodigestor (1.000 m^3 $día^{-1}$, equivalente a instalar un generador de 75 kW). El biol es el único producto que esta empresa emplea para el riego de sus plantaciones (Peláez et al., 2015).

2.2 Nuevas tendencias en el diseño de biodigestores

El siguiente paso en el desarrollo de la DA en Ecuador ha sido implementar biodigestores tecnificados que incorporen dispositivos de calefacción o agitación o fases de pre-tratamiento. En 2007 se instaló un biodigestor de laguna cubierta de 1.300 m^3 de volumen líquido en la provincia de Cotopaxi, alimentado principalmente por estiércol de vaca (500 cabezas-20 t $día^{-1}$) en la hacienda de la empresa AGROGANA y diseñado por la empresa *Aqualimpia*. El sistema tiene un tanque de mezcla de 30 m^3 mecanizado que sirve

de pre-tratamiento al sustrato que ingresa al biodigestor. Cuenta con agitación mecánica en el interior del biodigestor mediante palas en eje horizontal y un intercambiador de calor alimentado por biogás. El sistema tiene 43 días de tiempo de retención, y produce 30 m^3 de biol al día, que es la razón de funcionamiento del sistema.

La aplicación de biol en la hacienda ha permitido aumentar rendimientos en el pasto un 20-25%, y reducir un 30 % el uso de agroquímicos en el cultivo de rosas. El biogás no se aprovecha en la actualidad, y estudios realizados para la generación de electricidad muestran que no es factible debido a los precios de venta de energía establecidos en la normativa vigente (*Aqualimpia Engineering*, 2006).

La empresa Latinoamericana de Jugos S.A. (La Jugosa), ubicada en Sangolquí (Pichincha) en el 2013 desarrolló un biodigestor de 30 m^3 para tratar 100 a 1.000 kg de residuos de frutas diarios, produciendo de 5 a 50 m^3 de biogás por día. Es un biodigestor híbrido de flujo ascendente, lecho fijo y recirculación, construido en acero inoxidable y aislamiento de 25 m^3, diseñado por la Universidad San Francisco de Quito. Cuenta con pre-tratamiento del sustrato (trituración y filtrado) y de sistemas automatizados de control de la temperatura (a 35 °C), pH y carga. El biogás se aprovecha en procesos térmicos de la empresa y el biol es utilizado por los productores de frutas que abastecen a la empresa (Araujo, 2014). Se han instalado, además, biodigestores en varios camales, encontrando casos de éxito (Agropesa y Tulcán) y otros con menos éxito (Chunchi, Joya de los Sachas, Catamayo, Quito), mientras que en la actualidad hay dos diseñados y pendientes de construcción (Jipijapa y Santa Elena). Estos biodigestores han usado tecnologías muy variadas, con relativamente alto nivel de tecnificación, pero no se cuenta aún con resultados de su operación (Peláez *et al.*, 2015).

2.3 Perspectivas del desarrollo de la Digestión Anaeróbica en Ecuador

En la actualidad los biodigestores entran en la agenda del gobierno ecuatoriano. Hay cuatro Ministerios del Gobierno involucrados en biodigestores, cada uno con un enfoque complementario a los otros, que desde 2015, están empezando a coordinar sus acciones: El Ministerio de Energía y Minas (MEM) está realizando la difusión de la tecnología en el sector agropecuario y apoyando además la implementación de biodigestores demostrativos. El Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca (MPCEIP) ha apoyado con la asistencia técnica para la implementación de biodigestores en camales. El Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) está produciendo bioles como bioinsumos que desplace fertilizantes agroquímicos. El Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE), a su vez, está apoyando la asistencia técnica a pequeños y medianos porcicultores para el diseño e implementación de biodigestores.

Desde la I+D hay siete universidades con actividad en biodigestores, al menos a nivel de elaboración de tesis de pregrado como son: la Universidad de Cuenca (UC), la Universidad Laica Vicente Rocafuerte (ULVR), la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), la Universidad Técnica del Norte (UTN), la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), y la Universidad Estatal de Bolívar (UEB). Instituciones de Educación Superior (IES) que desarrollan proyectos de diseño e implementación de biodigestores. El Instituto de Investigación Geológico y Energético (IIGE), adscrito al MEM, también está desarrollando actividades de I+D, monitoreando media decena de

biodigestores tubulares existentes, desarrollando, implementado y monitoreando sistemas adaptados al frío (a partir de la experiencias de Bolivia), sistemas *dry digestion* bajo el concepto *low-cost digesters*, y apoyando en la asistencia técnica al MEM, MPCEIP, MAATE, universidades, municipios y proveedores de tecnología.

Si bien en el Ecuador hay un desarrollo incipiente de este proceso biológico, es mayormente para el tratamiento de residuos orgánicos y producción de abonos, que para producir bioenergía, por este motivo la mayoría de sistemas anaerobios son de bajo coste y no tecnificados, los sistemas anaerobios tecnificados que son costosos pero eficientes en el tratamiento de residuos orgánicos de diferentes orígenes, producción de abonos orgánicos, y en la producción de bioenergía, no se han desarrollado masivamente por los altos costos y la falta de políticas definidas para producir y vender electricidad generada con biogás.

3. Digestión anaeróbica: Aspectos microbiológicos

La microbiología de la DA varía de acuerdo de la composición de los materiales orgánicos que serán digeridos anaeróbicamente. Los diferentes componentes de la materia orgánica que puede variar en su composición y concentración son los sustratos para el metabolismo de un sinnúmero de microorganismos en condiciones anaerobias.

En general, la DA de material orgánico demanda la actividad combinada de varios grupos diferentes de microorganismos con diferentes capacidades metabólicas (Gerardi, 2003). La conversión de materia orgánica en metano implica cuatro etapas principales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. La DA puede servir como un proceso para producir productos de alto valor, pero de bajo volumen (productos intermedios dentro de las etapas de degradación anaeróbica) o productos de alto volumen, pero de bajo valor (productos finales, como biometano y biofertilizantes), o ambos en un sistema de biorrefinería. Muchos tipos de microorganismos y vías bioquímicas están involucrados y, en consecuencia, se forman una gran cantidad de bioproductos intermedios (Agler *et al.*, 2011). Esto también condujo a una aplicación actual ampliada de este proceso para la producción de productos químicos de valor agregado a través de biotecnologías de cultivos mixtos (Robles *et al.*, 2018).

En la primera etapa (hidrólisis), los compuestos orgánicos complejos se hidrolizan por la acción de enzimas extracelulares, producidas por bacterias hidrolíticas, lo que da como resultado moléculas solubles simples, a saber, aminoácidos de proteínas, ácidos grasos de cadena larga de lípidos y azúcares simples de carbohidratos complejos (Figura 2) (Li *et al.*, 2011). La hidrólisis puede ocurrir relativamente rápida si los sustratos se degradan fácilmente y existe suficiente contacto físico entre las enzimas y el sustrato (Taherzadeh y Karimi, 2008). Sin embargo, los sustratos con una estructura más recalcitrante requieren más tiempo y la degradación generalmente no es completa (Deublein y Steinhauser, 2008; Nair *et al.*, 2015).

Por lo tanto, para sustratos con estructura compleja, como las lignocelulosas, que son apenas accesibles a las enzimas, el paso de hidrólisis a menudo se considera como el paso limitante de la velocidad de degradación (Taherzadeh y Karimi, 2008; Vavilin *et al.*, 1996).

Las moléculas más pequeñas producidas se convertirán luego en ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta, alcoholes, dióxido de carbono e hidrógeno en el siguiente paso de acidogénesis. La presión parcial del hidrógeno regula los productos esperados en este paso. En general, la ruta más favorable de las bacterias fermentativas primarias es la producción de acetato vía piruvato con producción de hidrógeno. Por tanto, en un proceso bien equilibrado, con baja presión parcial de hidrógeno, los principales productos son acetato, dióxido de carbono e hidrógeno. Sin embargo, si las condiciones ambientales no son óptimas, se forman más intermedios, como otros ácidos grasos volátiles y alcoholes, a alta presión parcial de hidrógeno. Estos productos son más reducidos que los productos generados en condiciones óptimas, por lo que deben modificarse aún más antes de que puedan convertirse en biogás (Schnürer y Jarvis, 2009; Schink, 1997).

En la siguiente etapa, el paso de acetogénesis, las bacterias productoras obligatorias de hidrógeno convierten los AGV de más de dos átomos de carbono y los alcoholes de más de un átomo de carbono, en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono (Schink, 1997; Bryant, 1979). En condiciones estándar, las reacciones realizadas por microorganismos acetogénicos no son exergónicas. En este caso, se necesitan bajas presiones parciales de hidrógeno (inferiores a 5×10^5–10×10^6 Pa) para que las reacciones sean energéticamente viables. La asociación sintrófica que ocurre entre las bacterias productoras de hidrógeno y las arqueas productoras de metano en el siguiente paso metanogénico puede preservar la presión parcial de hidrógeno dentro del rango adecuado para el crecimiento de los microorganismos acetogénicos (Schink, 1997).

En la etapa final de DA, varios grupos de metanógenos consumen el acetato (metanógenos acetoclásticos, Ec. 1.1), hidrógeno y dióxido de carbono (metanógenos hidrogenotróficos, Ec. 1.2) y alcohol metílico y aminas de metilo (metanógenos metilotróficos, Ec. 1.3)., o vía metilotrófica dependiente de H_2 de Methanomassillicoccales, ecuación 1.4), y convertir estos productos intermedios en metano (Robles *et al.*, 2018).

$4CH_3COOH \rightarrow 4CH_4 + CO_2$	(Ec. 1.1)
$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	(Ec. 1.2)
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	(Ec. 1.3)
$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	(Ec. 1.4)

La concentración relativa de bacterias dentro de un digestor anaeróbico típico suele ser superior a 10^{16} células mL^{-1}. Esta población consta de bacterias sacarolíticas (~10^8 células mL^{-1}), bacterias proteolíticas (~10^6 células mL^{-1}), bacterias lipolíticas (~10^5 células mL^{-1}) y metanógenos (~10^8 células mL^{-1}) (Gerardi, 2003). Varios microorganismos con propiedades específicas toman parte en el proceso de DA.

Las características de las especies hidrolíticas típicas, sus sustratos y productos se muestran en la Tabla 1. Debido a que la hidrólisis de moléculas complejas es catalizada por varias enzimas extracelulares como celulasas, proteasas y lipasas, este paso se conoce como la reacción más activa de los consorcios de bacterias involucradas en la DA. La

fase hidrolítica de degradación de compuestos recalcitrantes como la lignina, la celulosa y las paredes de las células viables es relativamente lenta y puede ser limitante en la DA (Polprasert, 1989). Esto, sin embargo, hace necesarios diferentes pretratamientos previos a la DA que facilitan la degradación de este tipo de compuestos recalcitrantes. Algunas de las bacterias hidrolíticas de la DA se están utilizando para producir muchos productos biológicos a partir de efluentes industriales (ver Tabla 1) (Amani *et al.*, 2010).

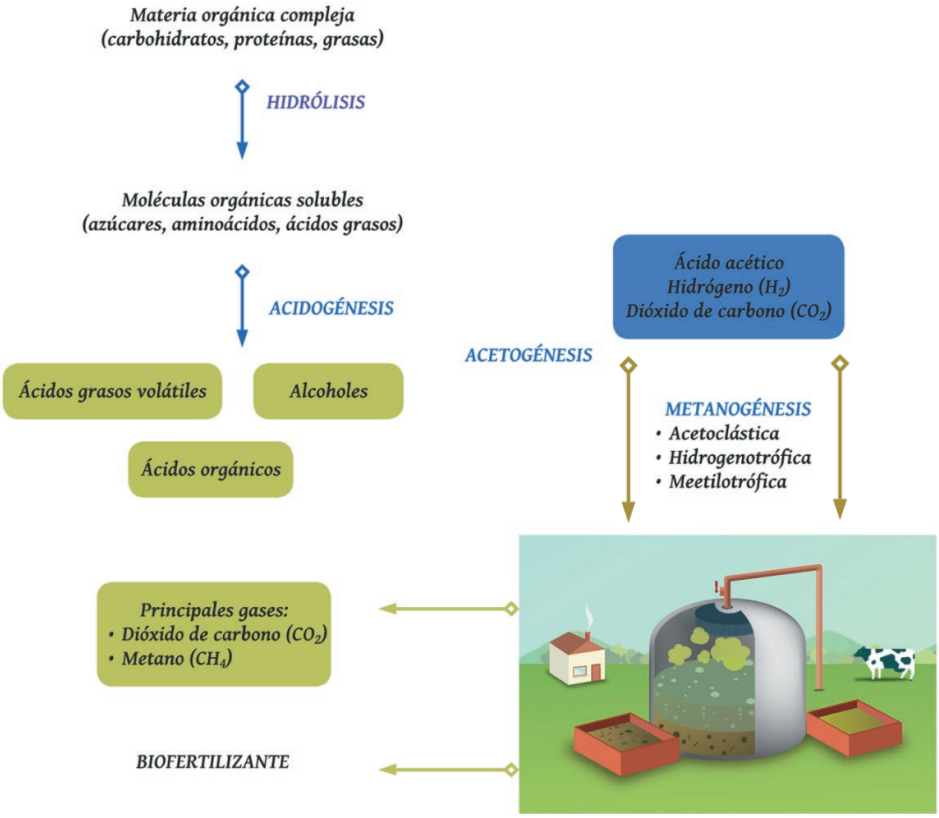


Figura 2. Pasos principales para la producción de biogás a partir de la digestión de material orgánico. Carbohidratos, lípidos y proteínas se encuentran en biomasa orgánica, adaptado de FAO, 2019.

En la Tabla 2 se exponen algunas características biológicas de la acidogénesis (el segundo paso) y algunos de los estudios de aplicación relevantes. Los sustratos y productos de este grupo son muy distintos. Tienen tasas de crecimiento marcadamente altas en comparación con los metanógenos (entre 30 y 40 veces mayores) y pueden sobrevivir en condiciones extremas como pH bajo, temperatura alta y altas tasas de carga orgánica (*OLR-Organic Loading Rate*) (Ahring *et al.*, 2001). Tradicionalmente se presta menor atención a la aplicación de bacterias acidogénicas en el procesamiento industrial; sin embargo,

se pueden emplear eficazmente en la degradación de tintes textiles (Kalyani *et al.*, 2009), la bio-hidrogenación (Nguyen *et al.*, 2008) y la producción de biomoléculas específicas como la vitamina B_{12} (Bainotti *et al.*, 1996) y bacteriocina, esta última son proteínas o péptidos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano (Cheikhyoussef *et al.*, 2009).

Las bacterias acetogénicas, que son responsables de la acidogénesis (el tercer paso), convierten los AGV y los alcoholes en acetato (Ac), H_2, formiato y CO_2, que luego son utilizados por los metanógenos. En vista del crecimiento microbiano, las bacterias acetogénicas (m_{max} = 1 h^{-1}) generalmente crecen mucho más rápido que las metanógenas ((m_{max} = 0,04 h^{-1}) (Shigehisa y Takane, 1994). Algunos de los acetógenos identificados y sus sustratos y productos se enumeran en la Tabla 3. La interacción de acetógenos y metanógenos es crítica para el desempeño de un digestor anaeróbico; esta relación se conoce como interacción sintrófica.

Tabla 1. Productos, sustratos, y aplicaciones de especies de bacterias hidrolíticas típicas, Amani *et al.*, 2010.

Sustrato	Producto	Especie típica	Reacción de Gram	Forma	Motilidad*	Aplicación	Referencia
Proteínas	Aminoácidos, azúcares	*Clostridium* sp.	+	Bacilo	M	Levadura de cerveza Tratamiento de residuos	Kim *et al.*, 2009
		Proteus vulgaris	-	Bacilo	M	Evolución dirigida de una lipasa	Fang *et al.*, 2009
		Peptococcus sp.	-	Bacilo	M	Fermentación de una lipasa	Westlake *et al.*, 1976
		Bacteroides sp.	-	Bacilo	N	Inducción de líneas celulares en linfa periférica	Ochoa Repáraz *et al.*, 2008
		Bacillus sp.	+	Bacilo	M	Cultivo sintrófico con *Clostridium*	Chang *et al.*, 2008
		Vibrio sp.	-	Bacilo	M	Determinar la eficacia de *Vibrio* spp.	Parvez *et al.*, 2008
Carbohidratos	Azúcares	*Clostridium* sp.	+	Bacilo	M	Tratamiento del efluente del proceso del aceite de palma	Chong *et al.*, 2009

(Tabla 1 continúa en la página siguiente)

(Tabla 1 continúa de la página anterior)

Sustrato	Producto	Especie típica	Reacción de Gram	Forma	Motilidad*	Aplicación	Referencia
Carbohidratos	Azúcares	*Acetivibrio cellulolyticus*	+	Bacilo	M	Degradación de celulosa a CH_4	Khan, 1980
		Staphylococcus sp.	+	Coco	N	Co-metabolismo en presencia de glucosa	Ziagova *et al.*, 2009
		Bacteroides sp.	-	Bacilo	N		
Lípidos	Ácidos grasos de cadena larga, alcoholes, aminoácidos	*Clostridium* sp.	+	Bacilo	M	Tratamiento de residuos alimenticios	Jo *et al.*, 2008
		Micrococcus sp.	+	Coco	N	Aislamiento de biosurfactantes	Tuleva *et al.*, 2009
ARN	Azúcares	*Staphylococcus* sp.	+	Coco	N		
ADN	Purinas, pirimidinas	*Bacillus* sp.	+	Bacilo	M		

*M, motil; N, no motil.

Tabla 2. Productos, sustratos, y aplicaciones de especies de bacterias acidogénicas típicas, Amani *et al.*, 2010.

Sustrato	Producto	Especie típica	Reacción de Gram	Forma	Motilidad*	Aplicación	Referencia
Aminoácidos	Valerato, isovalerato, propionato, butirato	*Lactobacillus* sp.	+	Bacilo	N	Producción de ácido g-aminobutírico	Kim *et al.*, 2009
		Escherichia coli	-	Bacilo	M	Síntesis de nitrobenceno ciclofosfamida	Li et al., 2003
	Acetato, H_2, ácidos grasos de cadena larga	*Staphylococcus* sp.	+	Coco	N		
		Bacillus sp.	+	Bacilo	M		
		Pseudomonas sp.	-	Bacilo	M	Biodegradación de un mezcla de tintes textiles	Kalyani *et al.*, 2009
		Micrococcus sp.	-	Coco	N		
		Eubacterium limosum	+	Bacilo	M	Biotransformación de isoflavonas biochanina	Hur y Rafii, 2000

(Tabla 2 continúa en la página siguiente)

(Tabla 2 continúa de la página anterior)

Sustrato	Producto	Especie típica	Reacción de Gram	Forma	Motilidad*	Aplicación	Referencia
Aminoácidos	Acetato, H_2, ácidos grasos de cadena larga	*Clostridium* sp.	+	Bacilo	M	Producción de hidrógeno a partir de la sacarosa	Fritsch *et al.*, 2008
		Zymomonas mobilis	-	Bacilo	M	Producción de etanol	Wilkins, 2009
Azúcares	CO_2, H_2, formiato, acetato, butirato, etanol, lactato	*Eubacterium* sp.	+	Bacilo	M	Producción de hidrógeno	Kalyani *et al.*, 2009
		Escherichia coli	-	Bacilo	M		
		Bifidobacterium sp.	+	Bacilo	N	Producción de bacteriocina	Cheikh-youssef *et al.*, 2009
		Acetobacterium sp.	-	Bacilo	M	Producción de vitamina B_{12}	Bainotti *et al.*, 1996
Ácidos grasos	Valerato, isovalerato, propionato, butirato, acetato, H_2	*Clostridium* sp.	+	Bacilo	M		
Alcoholes		*Syntrophomonas wolfei*	-	Bacilo	M	Oxidación de ácidos grasos	McInerney *et al.*, 1981

*M, motil; N, no motil.

Tabla 3. Sustratos, productos, y características de algunas especies de bacterias acetogénicas identificadas, Amani *et al.*, 2010.

Sustrato	Producto	Especie típica	Reacción de Gram	Forma	Motilidad*	Temperatura °C	Contenido G+C (%mol)
Butirato	Acetato H_2/CO_2, formiato	*Syntrophobacter wolinii*	-	Bacilo	M	35-40	56,7-60,6
		S. fumaroxidans	-	Bacilo	N	35-40	60,6
Propionato	H_2/CO_2, formiato	*Syntrophomonas wolfei*	-	Bacilo	M	35-40	44,9
		Pelotomaculum thermopropionicum	+	Bacilo	N	50-60†	52,8
		P. schinkii	+	Bacilo	M	32-37	53,7
	Butirato, acetato	*Smithella propionica*	-	Bacilo	M	35-40	49,0
H_2, CO_2	Acetato	*Clostridium aceticum*	-	Bacilo	M	30-37	42,3

*M, motil; N, no motil. + Acetógeno termofílico.

La mayoría de las bacterias oxidantes de propionato (Pr) sintróficas aisladas pertenecen al grupo *Syntrophobacter* dentro de Deltaproteobacteria (Wallrabenstein *et al.*, 1995). *Smithella propionica*, aislada recientemente, está filogenéticamente relacionada con el género *Syntrophus* (Liu *et al.*, 1999).

La metanogénesis es el último (cuarto) paso. Los metanógenos son parte del Superfilo Euryarchaeota o Euriotas del Dominio Archaea. La mayoría de los miembros de este Superfilo son metanógenos, pero hay otros dos fenotipos que se encuentran en este grupo, a saber, termófilos metabolizadores de azufre y extremófilos (halófilos, acidófilos, hipertermófilos) (Liu *et al.*, 1999). Las características y propiedades de los metanógenos involucrados en un digestor anaeróbico como sustratos y productos se enumeran en la Tabla 4. Existen tres grupos principales de metanógenos: metanógenos hidrogenotróficos, acetoclásticos y metilotróficos (Amani *et al.*, 2010).

La producción de metano que consume hidrógeno da como resultado mayores ganancias de energía para los metanógenos, lo contrario es la degradación de Ac (von Stockar *et al.*, 2006). En esta reacción, el H_2 y el CO_2 se convierten en CH_4; por lo tanto, la entropía disminuye y se libera calor sensible. Por el contrario, la oxidación de Ac es una reacción impulsada por la entropía en cultivos anaeróbicos (aumento de la entropía). Exporta el exceso de entropía convirtiendo una molécula en estado acuoso (Ac) en dos moléculas gaseosas (CH_4 y CO_2), lo que aumenta considerablemente la entropía (Vlyssides *et al.*, 2008). Aunque la producción de metano usando hidrógeno es el proceso más efectivo de captura de energía por metanógenos, menos del 30% del metano producido en un digestor anaeróbico ocurre por este método debido al suministro limitado de H_2 en un digestor anaeróbico (Gerardi, 2003).

Tabla 4. Características de bacterias metanogénicas típicas en los biodigestores anaeróbicos, Amani *et al.*, 2010.

Sustrato	Producto	Especie típica	Condiciones óptimas de crecimiento		Forma	Motilidad*	Reacción de Gram	Contenido G+C (%mol)
			pH	Temperatura °C				
Acetato	CH_4, CO_2	*Methanothrix soehngenii*	7,4-7,8	35-40	Bacilo	N	-	52
		Methanosaeta concilii	7,1-7,5	35-40	Bacilo	N	-	61
		Methanosarcina acetivorans	6,5-7,5	35-40	Coco	N	-	41
H_2, CO_2	CH_4	*Methanobacterium bryantii*	6,9-7,2	37-39	Bacilo	N	+	33-38
		M. thermoautotrophicum	7,2-7,6	65-70[†]	Bacilo	N	+	48-52
		M. alcaliphilum	8,1-9,1[‡]	37	Bacilo	N	-	57
		Methanobrevibacter arboriphilus	7,8-8,0	30-37	Cocobacilo	N	+	28-32
		Methanococcus jannaschii	5,0-7,0	85[§]	Coco irregular	M		31

(Tabla 4 continúa en la página siguiente)

(Tabla 4 continúa de la página anterior)

Sustrato	Producto	Especie típica	Condiciones óptimas de crecimiento		Forma	Motilidad*	Reacción de Gram	Contenido G+C (%mol)
			pH	Temperatura °C				
H_2, CO_2	CH_4	*Methanolacinia paynteri*	6,6-7,2	40	Bacilo irregular	N	-	45
		Methanospirillum hungatei		30-37	Espirilo	M	-	45-49
		Methanoplanus endosymbiosus	6,6-7,2	40	Disco irregular	N	-	39
		M. olentangyi		30-40				
		Methanothermus fervidus	6,5	83§	Bacilo	M	+	33-34
Formiato, H_2, CO_2	CH_4, CO_2	*Methanobacterium formicicum*	6,6-7,8	37-45	Bacilo	N	+	38-42
		Methanobrevibacter smithii	7,0	37-39	Bacilo	N	+	28-31
		M. ruminatium	7,0	37-39	Cocobacilo	N	+	31
		Methanococcus voltae	6,5-8,0	35-40	Coco irregular	M		30
		Methanococcus deltae		37	Coco irregular	N		38
		M. maripaludis	6,5-8,0	35-40	Coco irregular	M		33
		M. thermolithoautotrophicus	6,5-8,0	65†	Coco irregular	M	-	34
		Methanoplanus limicola	7,0	40	Plato	M	-	48
		Methanogenium cariaci	6,2-6,6	20-25	Coco irregular	N	-	49,2
Formiato, H_2, CO_2	CH_4, CO_2	*Methanogenium. marisnigri*	6,8-7,3	20-25	Coco irregular	N	-	51-62
		M. olentangyi		37	Coco irregular	N	-	54,4
		M. tatii	7,0	85§	Coco irregular	N	-	54
		M. thermophilicum	6,5-7,2	55-60†	Coco irregular	N	-	56-60
		M. bourgense	6,3-6,8	35-42	Coco irregular	N	-	59
		Methanocorpusculum aggregans	6,4-7,2	35-37	Coco irregular	N	-	52

*M, motil; N, no motil; + Metanógeno termofílico; ‡ Metanógeno alcalófilo; § Metanógeno hipertermófilo.

3.1 Interacciones de los microorganismos

La granulación es un método común para proteger los microorganismos anaerobios y aumentar el rendimiento del digestor (Hulshoff Pol *et al.*, 2004). La sintrofia es el siguiente concepto que se examinará en esta unidad. Los AGV pueden inhibir el crecimiento de metanógenos si su concentración excede un cierto nivel. Además, diferentes AGV muestran diferentes comportamientos al inhibir metanógenos. Por ejemplo, el Pr se produce menos y apenas se consume, pero su presencia es crucial para la estabilidad de los metanógenos (Van Kuijk *et al.*, 1998; de Bok *et al.*, 2004; Nosrati *et al.*, 2004; Gallert y Winter, 2008).

3.2 Granulación

Con el uso industrial generalizado de reactores de capa de lodo anaeróbico de flujo ascendente (*UASB-Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), se presta una atención cada vez mayor a la granulación del lodo anaeróbico (Fang *et al.*, 1994). La formación de gránulos estables en un reactor *UASB* incrementa la eficiencia de eliminación de la demanda química de oxígeno (DQO) en aproximadamente un 70% (Jeong *et al.*, 2005) y proporciona una *OLR* de más de 50 kg DQO m^{-3} d^{-1} (Hulshoff Pol, 1989). Las ventajas de la granulación, incluyen una estructura microbiana que está lista para operar con diferentes fenómenos de transporte, sedimentabilidad adecuada, tiempo de retención de biomasa alto y resistencia a *OLR* altos y choques tóxicos, hacen que el proceso de granulación sea una buena tecnología del tratamiento de aguas residuales (Speece, 1996). Se han informado varios modelos de acuerdo con diferentes teorías y enfoques para describir la granulación de lodos anaeróbicos, que incluye modelos fisicoquímicos, modelos microbianos y modelos termodinámicos. En la Tabla 5 se proporciona una descripción general de los modelos de granulación y sus secuencias junto con los mecanismos y las principales fuerzas efectivas que construyen la estructura de los gránulos.

La adición de diversos iones en los reactores *UASB* es una tecnología desarrollada para mejorar la tasa de granulación anaeróbica. Los iones calcio (80–200 mg L^{-1}; Uyanik *et al.*, 2002), magnesio (12–120 mg L^{-1}; Grootaerd *et al.*, 1997), aluminio (300 mg L^{-1}; Yu *et al.*, 2001) e iones ferrosos (12–84 mg L^{-1}; Vlyssides *et al.*, 2009) aumentan significativamente la tasa de granulación anaeróbica. Este aumento resulta de la reducción de la repulsión electrostática entre microorganismos cargados negativamente, lo que conduce a mejoras en la granulación de la biomasa anaeróbica ya propuesta por el modelo de "enlace iónico positivo de valencia múltiple" (Mahony *et al.*, 1987). El modelo no permite ningún efecto biológico sobre la granulación anaeróbica. Sin embargo, altas concentraciones de diferentes iones pueden causar problemas operativos severos, por ejemplo, precipitación y acumulación de gránulos anaeróbicos, lo que reduce la actividad microbiana (Guiot *et al.*, 1988).

El enfoque microbiológico de la granulación anaeróbica consta de seis modelos similares, excluyendo cualquier punto de partida de interacciones químicas, físicas o de fuerza-energía entre las células, y se basa en observaciones morfológicas microscópicas de diferentes gránulos. El modelo multicapa es un modelo sencillo que considera un gránulo como una acumulación de diferentes capas bacterianas, que se cubren una a una con *Methanosaeta* spp. en el núcleo y bacterias reductoras de sulfato (*SRB-Sulfate-Reducing Bacteria*) en las capas superiores.

Cuando un gránulo está maduro, permite que pequeños compuestos orgánicos solubles biodegradables (demanda biológica de oxígeno, DBO) se filtren a través del gránulo y

alcancen el núcleo. Por tanto, la mayor parte del alimento es degradado por la capa exterior, seguido de la emisión de olores desagradables debido a la producción de H_2S. Este proceso puede ser la razón de las emisiones que provocan las lagunas de estabilización anaerobia después de un cierto período.

En el enfoque microbiano, el modelo de autómata celular se basa en la movilidad celular para obtener cantidades más significativas de sustrato. Sin embargo, no tiene en cuenta la movilidad celular hacia un recurso y el papel de la comunicación de célula a célula en el desarrollo de la organización espacial de una microcolonia de biopelículas (Tolker-Nielsen y Molin, 2000).

Tabla 5. Revisión de varios modelos de granulación de lodos anaerobios, Amani *et al.*, 2010.

Teoría	Referencia	Mecanismo y principales fuerzas
Modelos fisicoquímicos		
Núcleos inertes	Lettinga *et al.*, 1980	Microorganismos se adhieren a la partícula inerte y forman una biopelícula.
Presión de selección	Hulshoff Pol *et al.*, 1983	Los lodos ligeros y dispersos serán eliminados por presión hidráulica (presión de selección), mientras que más pesado los componentes pueden ser retenidos en el reactor.
Enlace de iones positivos multivalencia	Mahony *et al.*, 1987	Reducción de la repulsión electrostática entre microorganismos cargados negativamente mediante iones positivos multivalencia.
Unión de polímeros extracelulares (*ECPs-Extracellular Polymers*)	Shen *et al.*, 1993	Los *ECPs* intervienen tanto en la cohesión como en la adhesión de las células y jugar un papel crucial en el mantenimiento de la integridad estructural de la matriz microbiana; pueden cambiar la carga negativa de la superficie de la bacteria y, de esa manera, unir físicamente dos células vecinas entre sí, así como con otras partículas inertes.
Unión de polímeros sintéticos y naturales	El-Mamouni *et al.*, 1998	Polímeros sintéticos promueven el aglomerado de las partículas.
Adhesión mínima secundaria	Rouxhet y Mozes, 1990	Interacción total de largo alcance sobre una distancia de más de 1 nm (basado en la teoría DLVO para partículas coloidales).
Deshidratación local e hidrofóbica	Wilschut y Hoekstra, 1984	Se incrementa la hidrofobicidad de la superficie celular; lo que promueve las interacciones de célula a célula; la hidrofobicidad de las superficies celulares puede causar un disminución en la D*G* de la superficie, lo que a su vez mejora la interacción célula a célula.
Modelos microbiológicos		
CapeTown	Sam-Soon *et al.*, 1988	La sobreproducción de *ECPS* es el paso inicial para la granulación; las ECPs son producidas principalmente por hidrogenótrofos y pueden desempeñar un papel importante en la construcción de estructuras espaciales y el mantenimiento de la estabilidad de los gránulos.
Spaghetti	Wu *et al.*, 1996	*Methanosaeta* (los metanógenos filamentosos) se unen a los precursores y forman una red tridimensional (el gránulo).

(Tabla 5 continúa en la página siguiente)

(Tabla 5 continúa de la página anterior)

Teoría	Referencia	Mecanismo y principales fuerzas
Modelos microbiológicos		
Multicapa	Guiot *et al.*, 1992	Los gránulos están compuestos por diferentes capas microbiológicas; la capa interna consiste principalmente en aceticlastos que pueden actuar como centros de nucleación necesarios para iniciar el desarrollo de gránulos. Las bacterias que producen y utilizan H_2 son las especies dominantes en la capa intermedia, y las bacterias de especies mixtas predominan en la capa más externa.
Microcolonia sintrófica	Hirsh, 1984	La complejidad de un proceso anaeróbico y una estrecha relación sinérgica conduciría eventualmente a la formación de microcolonias o consorcios estables.
Autómata celular	Wimpenny y Colasanti, 1997	Definidos como sistemas discretos espacial y temporalmente que están determinados por un conjunto de reglas que actúan localmente, pero se aplican globalmente; este modelo se basa en la movilidad celular para obtener más sustrato y simular el desarrollo dinámico de una microcolonia o biopelícula en condiciones ambientales variables.
Comunicación de célula a célula	Davies *et al.*, 1998	Basado en la comunicación intercelular y la coordinación multicelular; Los mecanismos de señalización de célula a célula son efectivos para desarrollar gránulos anaeróbicos y organizar la estructura espacial de las células asociadas a los gránulos.
Modelos termodinámicos		
Tensión superficial	Thaveesri *et al.*, 1995	La creación de una nueva interfaz es la base principal de este modelo; los microorganismos sólo pueden obtener la máxima energía libre de adhesión posible (DG_{max}, $DG<0$) cuando la tensión superficial del líquido es suficientemente baja o alta; los organismos hidrofóbicos se adhieren y obtienen energía mínima; el modelo fisicoquímico también está involucrado.
Translocación-deshidratación de protones	Tay *et al.*, 2000	Modelo secuencial (deshidratación de superficies bacterianas, formación de gránulos embrionarios, maduración de gránulos y maduración posterior) basado en la translocación de un protón activo en las superficies de la membrana bacteriana.

3.3 Interacciones sintróficas

La sintrofia es un fenómeno exclusivo que ocurre a través de la transferencia de hidrógeno entre especies en la DA. Interrelaciona las actividades microbianas y bioquímicas de acidógenos y metanógenos, y controla la función general de la reacción. Algunos otros aspectos de la sintrofia son lograr una alta tasa de degradación de diferentes sustratos, lograr grandes cantidades y concentraciones apropiadas de CH_4 o H_2 (como producto final), una cantidad más significativa de trifosfato de adenosina (ATP) sintetizado por los acidógenos, mayor crecimiento de una población microbiana y el desplazamiento de equilibrios de reacción desfavorables (Wong *et al.*, 2009). La incapacidad para mantener el equilibrio entre estos dos grupos de microorganismos es la causa principal de la inestabilidad del reactor (Wang *et al.*, 2009a). La respiración anaeróbica no es tan eficiente como la respiración

aeróbica en la síntesis de ATP. En un proceso anaeróbico, los aceptores de electrones alternativos, como nitrato, sulfato o CO_2, tienen menos potenciales de reducción positivos que el oxígeno, es decir, hay menos energía disponible para crear ATP durante la respiración anaeróbica. Por lo tanto, la actividad de translocación de protones a través de una membrana celular en la respiración anaeróbica debería ser mucho menor que en la respiración aeróbica (Prescott *et al.*, 1999).

4. Principales factores de la Digestión Anaeróbica

El proceso de DA ha sido ampliamente investigado durante las últimas décadas tanto para el tratamiento de residuos y aguas residuales, como para la generación de energía renovable en los sectores industrial y agrícola (Lindmark *et al.*, 2014). El crecimiento y la actividad de los microorganismos anaerobios, es decir, la base biológica de la DA y, en consecuencia, la eficiencia del proceso, se ven significativamente afectados por algunos parámetros principales, por lo tanto, es crucial asegurarse de que estos parámetros se optimicen tanto como sea posible. Estos parámetros incluyen valores de temperatura constante que favorecen el crecimiento microbiano, valor de pH, suministro suficiente de nutrientes (composición del sustrato y relación C/N), intensidad de mezcla, tiempo de retención, así como presencia y concentración de inhibidores (por ejemplo, NH_4^+/NH_3 y metales pesados) (Al Seadi *et al.*, 2008).

Entre los diversos grupos de microorganismos anaeróbicos involucrados en el proceso de DA, las arqueas metanogénicas que manejan la última etapa de la producción de biogás (PB) son muy sensibles a cualquier cambio en sus condiciones ambientales (Voicu *et al.*, 2015). Dado que estos microorganismos son el factor limitante de la tasa de todo el proceso de PB, es esencial monitorear cuidadosamente las condiciones ambientales. Por lo tanto, mantener estos parámetros dentro de sus rangos apropiados en lo que respecta al crecimiento y la actividad microbiana es vital para lograr una operación DA estable a largo plazo (Zhang *et al.*, 2014).

4.1 Temperatura

La temperatura es un parámetro crucial que puede afectar marcadamente el proceso de DA (Chen *et al.*, 2016). Los procesos de DA se realizan en condiciones psicrófilas (15 ± 1 °C), mesófilas (37 °C) y termófilas (55–70 °C). Se ha informado que la condición termófila posee las velocidades de reacción más rápidas y la mayor capacidad de carga, lo que en consecuencia conduce a la mayor productividad (Mao *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de las ventajas favorables asociadas con la DA termófila, se supone que la alta temperatura existente intensifica la toxicidad del NH_4^+/NH_3, lo que eventualmente podría resultar en un proceso de digestión inestable y su completa inhibición en casos severos (Weiland, 2010). La Tabla 6 tabula los tiempos de retención típicos requeridos bajo diferentes condiciones térmicas (Al Seadi *et al.*, 2008).

Tabla 6. Condiciones térmicas y sus tiempos de retención típicos (Al Seadi et al., 2008).

Etapa térmica	Temperatura de proceso (°C)	Tiempo de retención mínimo (días)
Psicrófilo	<20	70-80
Mesófilo	30-42	30-40
Termófilo	43-55	15-20

Se ha determinado que la PB en condiciones psicrofílicas y mesófilas utilizando biorreactores anaeróbico de membrana (AnMBR-*Anaerobic Membrane Bioreactor*) condujo a tasas de producción de metano comparables, aunque se observó una pérdida significativa de metano en el permeado en condiciones psicrofílicas (Trzcinski y Stuckey, 2010; Martinez-Sosa *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013). Además, las bajas temperaturas correspondieron a una tasa de ensuciamiento y taponamiento de la membrana ligeramente más alta, posiblemente causada por la acumulación de AGV y la liberación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) compuestas principalmente por proteínas (Gao *et al.*, 2014a).

Además del proceso de DA, también se ha informado que la temperatura es efectiva en el equilibrio de la población microbiana y la PB a través del pretratamiento térmico. En un estudio, Ennouri *et al.*, (2016) emplearon pretratamiento térmico antes de la DA de lodos residuales activados (WAS-*Waste Activated Sludge*). Determinaron que el pretratamiento térmico de los lodos a 120 °C condujo a los mayores rendimientos de biogás 0,42 L g^{-1} de sólidos volátiles (SV) y 0,37 L g^{-1} de SV para muestras de lodos urbanos e industriales, respectivamente. Atribuyeron los impactos positivos del pretratamiento térmico al crecimiento mejorado de los metanógenos que usan hidrógeno (HUMs-*Hydrogen Using Methanogens*) y el consecuente consumo rápido del H_2 generado que conduce a una acetogénesis mejorada (Ennouri *et al.*, 2016).

Las variaciones de temperatura también pueden afectar negativamente a los microorganismos involucrados en el proceso DA y, en consecuencia, la PB. En concordancia con esto, Bowen *et al.*, (2014) mostraron que los valores de temperatura por debajo del nivel óptimo llevaron a una reducción de la utilización del sustrato y a las tasas de producción de AGV. Por el contrario, los aumentos en las temperaturas de funcionamiento generalmente van acompañados de menos efectos adversos, probablemente debido a la mayor capacidad de una comunidad microbiana para adaptarse a tales condiciones de temperatura.

Esto fue confirmado por Kundu *et al.* (2014), que investigaron la recuperación de un reactor anaerobio mesófilo después de aumentar bruscamente la temperatura de operación a 65 °C, determinaron que el choque de temperatura afectó ampliamente a las poblaciones metanogénicas acetoclásticas, lo que provocó un rápido deterioro del rendimiento del sistema de DA. Sin embargo, también observaron una recuperación gradual del sistema y atribuyeron las mejoras en la PB a la aparición de poblaciones metanogénicas termófilas bajo el nuevo régimen de temperatura (Kundu *et al.*, 2014). Westerholm *et al.*, 2017, determinaron condiciones similares y analizaron la adaptación de temperatura, de termófila a mesófila.

En general, cabe señalar que en un sistema DA estable, existe un equilibrio entre las diferentes poblaciones microbianas que contribuyen al proceso. Por lo tanto, no hay

acumulación de productos intermedios, por ejemplo, los productos finales de una población específica. Los cambios repentinos, como variaciones bruscas de temperatura, podrían alterar este equilibrio y poner en peligro toda la estructura microbiana, la concentración de AG y, en consecuencia, el proceso de PB (Kundu *et al.*, 2014; Kwietniewska y Tys, 2014). Se deben considerar varios factores al decidir la elección de la temperatura de un sistema de DA. Existe una compensación entre los pros y contras de los diferentes regímenes de temperatura, por ejemplo, condiciones mesófilas y termófilas.

Así, el aumento de las temperaturas del proceso está, en principio, asociado con un aumento de las tasas metabólicas microbianas, mayores tasas de degradación de materiales orgánicos, eliminación de DQO y mayores potenciales de PB. Sin embargo, las concentraciones más altas de AG y su posible acumulación en caso de deficiencias en el proceso y una mayor susceptibilidad a la inhibición por NH_4^+/NH_3 también son más probables en condiciones termófilas que en condiciones mesófilas (Chen *et al.*, 2008).

Por lo tanto, y como se mencionó anteriormente, para las operaciones de BP a gran escala, se deben investigar diferentes factores, incluidas las condiciones ambientales, el tipo de desechos utilizados, así como el costo y los gastos necesarios para mantener sus condiciones mesófilas, para garantizar la viabilidad económica de la operación de la elección del régimen de temperatura para los sistemas de DA (Khan *et al.*, 2016). Arikan *et al.*, (2015) concluyeron que para un digestor de 400 m^3 en Maryland con una temperatura ambiente de 13 °C, los requisitos de energía podrían reducirse al 70 % si la temperatura de operación se redujera de 35 a 28 °C.

4.2 pH

El crecimiento microbiano en un digestor anaeróbico y la PB dependen en gran medida del pH (Yang *et al.*, 2015). El crecimiento óptimo de los diferentes grupos microbianos involucrados en el proceso de la DA tiene lugar bajo diferentes valores de pH, por ejemplo, acidógenos (5,0–6,0) y metanógenos (6,5–8,0) (Kundu *et al.*, 2017). Esto, junto con otras diferencias existentes, como diferentes tiempos de duplicación (tasa de crecimiento), ha sido el factor impulsor para separar los procesos de acidogénesis y metanogénesis mediante la aplicación de configuraciones de reactores de dos etapas (Chaikasem *et al.*, 2015). Dado que el pH operativo podría afectar directa y significativamente todo el proceso de PB, la optimización de cada etapa en reactores separados podría lograr varios resultados que conduzcan a una acumulación reducida de AGV, una mayor estabilidad del proceso y una mayor capacidad de amortiguación contra la tasa de carga y la toxicidad (Maspolim *et al.*, 2015).

También se debe tener en cuenta que las disminuciones drásticas en el pH podrían conducir a una inhibición irreversible de la PB, es decir, el proceso no se puede recuperar incluso si el pH del digestor se restablece a valores óptimos (Dareioti *et al.*, 2017). Sin embargo, las fases de operación, es decir, la realización de diferentes etapas de DA en reactores separados, impone costos de capital y mantenimiento significativamente más altos.

Si se pretende una operación monofásica, el rango de pH favorable para cumplir parcialmente con los requisitos de los diferentes grupos microbianos involucrados en el proceso DA sería de 6,8 a 7,4. En general, mantener el pH en un digestor anaeróbico monofásico es un desafío debido a la alta actividad de las enzimas hidrolíticas, las altas concentraciones

de AGV que están presentes y, si por algún motivo se altera su absorción, el pH podría disminuir rápidamente a valores en los que la PB total se vería afectada (Jiang *et al.*, 2013).

En un estudio, Hernández y Rodríguez, (2013) analizaron el impacto de los valores de pH bajos (es decir, 5,0, 5,5 y 6,0) utilizando un reactor anaeróbico por lotes y afirmaron que a valores de pH inferiores a 6,0, la producción de metano se situó en valores de >1 %, mientras que, la producción de hidrógeno se registró en niveles altos que muestran la prevalencia de bacterias productoras de ácido en el reactor. Estos hallazgos se alinean con los de Nakasaki *et al.*, (2015), quienes registraron una densidad celular de arqueas significativamente menor a valores de pH bajos en comparación con las bacterias.

Yang *et al.*, (2015) determinaron que la producción de metano aumentó más de siete veces cuando se controló el pH en comparación con las condiciones del grupo de pH no controlado. Esto revela la importancia de diferentes estrategias de control del pH. Entre estas estrategias se encuentra la aplicación de una tasa de carga orgánica controlada (*OLR*) para evitar la acumulación de AGV, también conocida como acidificación. Sin embargo, siempre existe una compensación entre los beneficios de emplear *OLR* altos y el costo asociado con mantener el pH en el rango óptimo para los metanógenos (Mao *et al.*, 2015). Otra estrategia es la extracción de ácido propiónico, por ejemplo, mediante extracción con solvente (Wang *et al.*, 2009b).

Sin embargo, la viabilidad económica de este método en operaciones industriales a gran escala está en duda. También se ha investigado principalmente el control del pH mediante la adición de hidróxido de sodio (Chandra *et al.*, 2012). Sin embargo, la aplicabilidad de este método cuando se trata de digestores a escala industrial está en duda. También se debe mencionar que el exceso de iones de sodio también podría desempeñar un papel de inhibidor del proceso de metanogénesis, por ejemplo, en concentraciones superiores a 3500 mg L^{-1} en condiciones mesófilas (Chen *et al.*, 2008). Otra tecnología en la que no se requieren aditivos es el reciclaje dependiente del pH del efluente de un filtro anaeróbico al reactor de acidificación (Lindner *et al.*, 2015).

Las variaciones bruscas de pH también podrían afectar negativamente a los diseños y configuraciones de los reactores, como los AnMBR. Más específicamente, se ha informado de un ensuciamiento y taponamiento severo de la membrana como resultado de la rotura de los flóculos de lodo y la acumulación de partículas finas en el lodo a granel causada por cambios bruscos de pH (Gao *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015). En base a esto, los AnMBR en fases, en los que los procesos de acidogénesis y metanogénesis se llevan a cabo en reactores separados, son muy recomendables (Lin *et al.*, 2013).

4.3 Tasa de carga orgánica *(OLR)*

La *OLR* se encuentra entre los parámetros más críticos que afectan a las poblaciones microbianas durante la DA, el rendimiento del reactor y la PB (Kundu *et al.*, 2017). La *OLR* es la cantidad de sustrato orgánico que se introduce diariamente en un digestor (Drosg, 2013; Schnurer y Jarvis, 2009). Más específicamente, la *OLR* es la cantidad de SV alimentada por volumen de trabajo de un digestor por día y se expresa como kg SV m^{-3} digestor $día^{-1}$ (Esteves *et al.*, 2013). La *OLR* se calcula usando la siguiente ecuación (Ec. 4.1).

$$OLR\ (kg\ SV/\ m^3\ digestor\ día) = \frac{Total\ diario\ de\ SV\ del\ sustrato\ (kg)}{Total\ del\ volumen\ activo\ del\ digestor\ (m^3)} \quad \text{(Ec. 4.1)}$$

La *OLR* debe ajustarse según el tipo de sustrato (Esteves *et al.*, 2013). El problema crítico al que se puede enfrentar al aumentar este parámetro es la posibilidad de acidificación al sobrecargar un digestor con materiales orgánicos que conducen a una disminución o interrupción de la producción de metano (Drosg, 2013; Moriarty, 2013). En consecuencia, durante la puesta en marcha de un digestor anaerobio, la *OLR* debe incrementarse lentamente para asegurar una adaptación eficiente de los microorganismos involucrados en el proceso de DA. Una *OLR* apropiada en digestores *CSTR* (*Continuous-flow Stirred Tank Reactor*) mesófilos oscila entre 3 y 5 kg SV m^{-3} $día^{-1}$ según el tipo de sustrato (Drosg, 2013), mientras que la microbiota generalmente se inhibe con valores de *OLR* superiores a 6,4 kg SV m^{-3} $día^{-1}$ (Moriarty, 2013).

Para lograr una puesta en marcha exitosa, es recomendable comenzar con una *OLR* tan baja como 0,5 kg SV m^{-3} $día^{-1}$. Siempre que la PB comience a alcanzar un valor constante después de 4 días, la *OLR* se puede aumentar en 0,5 kg VS m^{-3} $día^{-1}$ cada dos semanas hasta alcanzar el rango objetivo en el que se espera que la PB disminuya (Wellinger *et al.*, 2013).

La Tabla 7 presenta la *OLR* óptima y el rango de pH para la producción de metano utilizando diferentes sustratos. Como se mencionó anteriormente, en principio, la *OLR* refleja la cantidad diaria de SV introducida en un digestor en el modo de operación continua (Mao *et al.*, 2015). Por lo tanto, se espera que la PB aumente al aumentar la *OLR*. Sin embargo, esto debería estar dentro de la capacidad de los diversos grupos de la población microbiana que manipula la DA.

En consecuencia, la mayoría de las plantas de biogás funcionan deliberadamente con una carga de material orgánico por debajo de la óptima o, en otras palabras, en condiciones más seguras para minimizar los errores del proceso. Por lo tanto, están obligados a ignorar el potencial existente. Al duplicar la *OLR*, la capacidad de la planta teóricamente podría duplicarse sin necesidad de construir digestores adicionales (Falk, 2012). Las *OLRs* superiores a los óptimos, es decir, la introducción diaria de un gran volumen de materiales orgánicos en un digestor, puede provocar cambios desfavorables en el entorno del digestor, lo que eventualmente podría inhibir la PB. Las *OLR* extremadamente altas fomentan actividades de hidrólisis y acidogénesis altas, lo que lleva a una producción alta de AGV (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico) (Zhang *et al.*, 2014).

En las circunstancias en que la actividad de la metanogénesis no pudo hacer frente a esta alta concentración de AGV (es decir, la absorción de AGV por metanógenos para la generación de metano), la acumulación de AGV, la disminución del pH y, en consecuencia, la acidificación irreversible del digestor sería probable (Palacio-Barco *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013a). La *OLR* debe predecirse con precisión para diferentes casos (Mao *et al.*, 2015) También se debe tener en cuenta que se ha sugerido aplicar condiciones termófilas y recirculación de efluentes para abordar la inhibición de sobrecarga causada por *OLR* altas (Rincón *et al.*, 2008).

Tabla 7. OLR óptimo y rango de pH para la producción de CH4 usando diferentes tipos de sustratos (Khan et al., 2016).

Sustrato	Tipo de reactor	Rango de pH	OLR	Referencia
Tiras finas de remolacha azucarera Estiércol de cerdo	Reactor de tanque con agitación semi-continuo	7,4 – 7,8	11,2 g SV $L_{reactor}$ día	Aboudi *et al.*, 2015
Aguas residuales con alta DQO	AnMBR	>7,4	11,81 kg DQO kg SVS día	Yu *et al.*, 2016
Residuos lácteos	Reactor de lecho inducido de dos etapas	6,8 – 7,5	32,9 g DQO L día	Zhong *et al.*, 2015
Desechos alimenticios	Digestor termofílico y mesófilo con recirculación	7,6 – 8,1	18,5 g SV día	Zamanzadeh *et al.*, 2016
Residuos vegetales	Reactor de tanque completamente agitado (acidogénesis)- Biopelícula de lecho fijo (metanogénesis)	5,1 ± 0,1 (reactor acidogénico) 7,6 ± 0,1 (reactor metanogénico)	3,0 g SV L día	Zuo *et al.*, 2015

OLRs bajas, por otro lado, podrían provocar la inanición de las poblaciones microbianas, el bajo rendimiento general del digestor y, en consecuencia, una baja tasa de PB. Además, desde el punto de vista de la ingeniería, apuntar a una *OLR* por debajo del nivel óptimo al diseñar digestores irá acompañado de una mayor inversión en reactores y costos operativos (Jiang *et al.*, 2012).

La *OLR* también podría afectar fuertemente la dinámica de las comunidades bacterianas. Rincón *et al.*, (2008) revelaron que, con *OLR* bajas, Firmicutes eran las bacterias predominantes, mientras que con *OLR* altas, Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Deferribacteres (Ferrobacterias) eran las principales bacterias presentes en el digestor. Kundu *et al.*, (2013) también observaron cambios significativos en la dinámica de la comunidad de arqueas (metanógenos) en respuesta a variaciones en las cargas orgánicas debido a los diferentes niveles de tolerancia de las diferentes arqueas al choque de cargas orgánicas.

La condición temporal del reactor también podría afectar su resistencia a los choques de carga orgánica. Por ejemplo, en un estudio sobre el efecto de *OLRs* más altas en condiciones mesófilas y termófilas durante la DA de desechos de alimentos en reactores de tanque agitado, Guo *et al.*, (2014) concluyeron que el reactor bajo condiciones mesófilas mostró un desempeño comparativamente mejor bajo el choque de cargas orgánicas debido a la mayor riqueza y uniformidad de la comunidad microbiana.

Como se mencionó anteriormente, se prefieren *OLRs* más altas desde el punto de vista de la ingeniería, ya que se necesitaría menos volumen de reactor para tratar un determinado

volumen de la corriente de desechos. Las limitaciones mencionadas anteriormente que enfrenta el empleo de *OLRs* altas podrían abordarse mediante procesos anaeróbicos de dos etapas, ya que la posible inhibición de la metanogénesis por acidificación podría evitarse de manera eficiente (Khan *et al.*, 2016).

4.4 Tiempos de retención hidráulicos y de sólidos

El tiempo de retención es el tiempo necesario para completar la digestión de los materiales orgánicos introducidos en un digestor y está relacionado directamente con la composición del sustrato y del componente microbiano, así como con una serie de parámetros del proceso, como la temperatura y la *OLR* (Ekama y Wentzel, 2008). Los principales factores que deben tenerse en cuenta al ajustar el tiempo de retención son la composición del sustrato y la temperatura de digestión. Por ejemplo, en el caso de materia vegetal rica en celulosa, la población microbiana necesita más tiempo para degradar la MO, por lo que el tiempo de retención debe prolongarse para garantizar una hidrólisis eficiente (Schnürer y Jarvis, 2009).

El tiempo de retención hidráulica (HRT-*Hydraulic Retention Time*) y el tiempo de retención de sólidos (SRT-*Solid Retention Time*) son dos factores importantes en el diseño y control de procesos de los sistemas de DA. El HRT se refiere a la duración promedio que el material de alimentación permanece dentro del digestor y se calcula como una relación entre el volumen activo del digestor y el volumen diario del material de alimentación (Ec. 4.2) (Drosg, 2013).

$$HRT\ (d) = \frac{Volumen\ activo\ total\ del\ digesto\ (m^3)}{Material\ de\ alimentación\ total\ diario\ (m^3\ d^{-1})} \qquad \text{(Ec. 4.2)}$$

Valores bajos de HRT podrían provocar el lavado de la biomasa activa, incluidos los metanógenos, mientras que los valores altos de HRT podrían provocar una baja productividad de biogás del digestor. Por lo tanto, es esencial asegurarse de que la HRT se ajuste a un valor apropiado para un sustrato dado que se alimenta al digestor (Drosg, 2013; Wolf, 2013).

El SRT se define como el tiempo de residencia que los sólidos permanecen en un digestor. El SRT es un parámetro operativo crítico porque afecta la eficiencia del proceso y controla las características biológicas, la funcionalidad y la estabilidad del digestor (Ec. 4.3) (Schnürer y Jarvis, 2009).

$$SRT\ (d) = \frac{Materia\ seca\ en\ todo\ el\ digestor\ (kg)}{Materia\ seca\ en\ la\ alimentación\ del\ digestor\ (kg\ d^{-1})} \qquad \text{(Ec. 4.3)}$$

En muchos casos, HRT y SRT son iguales, pero en un tanque de digestión donde parte de los residuos se devuelven al proceso, el valor de SRT supera al de HRT (Schnürer y Jarvis, 2009). Si la SRT se prolonga más allá de los valores óptimos, podría dar lugar a una PB baja, mientras que los valores de SRT más cortos podrían provocar una degradación insuficiente de la SV y, en consecuencia, una disminución de la PB (Argyropoulos, 2013). En consecuencia, se han desarrollado algunos diseños de digestores para aumentar la SRT durante el proceso AD (es decir, SRT mucho más altas que las HRT) para evitar la pérdida de biomasa y aumentar la eficiencia de BP.

Estos tipos de reactores incluyen los reactores anaeróbicos de lecho fluidizado (AFBR-*Anaerobic Fluidized Bed Reactor*) en los que los microorganismos se unen a los materiales portadores (Kumar *et al.*, 2008), así como el reactor de manto de lodo anaeróbico de flujo ascendente (UASB-*Up flow Anaerobic Sludge Blanket*) y el reactor de lecho de lodo granular expandido (EGSB-*Expanded Granular Sludge Bed*), reactores en los que los microorganismos se acumulan y agregan en grupos. En tales digestores, a pesar del alto flujo de entrada de sustrato, los microorganismos pueden retenerse efectivamente en el tanque de digestión (Schnürer y Jarvis, 2009). Los sistemas de alta tasa generalmente se ejecutan en HRT de menos de 5 días y se utilizan para el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, en los sistemas CSTR, la biomasa se suspende en la fase líquida y se eliminará con los purines; por lo tanto, la SRT debe ser igual a la HRT (generalmente de 10 a 20 días) en estos sistemas. Esto evita el lavado de biomasa y es fundamental para hacer funcionar el digestor de manera eficiente (Boe y Angelidaki, 2006).

La HRT no solo está asociada con los aspectos económicos de las plantas de biogás, también pueden ejercer un impacto determinante en la comunidad microbiana involucrada en el proceso de DA y, en consecuencia, en el rendimiento del biogás. Más específicamente y desde el punto de vista económico, los HRT más cortos están asociados con reactores de menor volumen, es decir, menos costos de capital y mantenimiento (Stuckey, 2012). Desde el punto de vista microbiano, las HRT cortas favorecen a los grupos microbianos de alta tasa de crecimiento (duplicación) y baja afinidad por el sustrato (Kundu *et al.*, 2017) y podrían aumentar el riesgo de eliminación de biomasa, lo que a su vez podría conducir a deterioro de los rendimientos de DA y biogás (Kwietniewska y Tys, 2014).

Se ha informado que los impactos adversos de los HRT cortos en la población microbiana se intensifican más en los reactores de tanque agitado (STR) en comparación con otras configuraciones de reactores como los AnMBR, en reactores manto de lodo anaeróbico de flujo ascendente (UASB) (Kundu *et al.*, 2017). Esto podría explicarse por el hecho de que literalmente no hay mecanismos específicos en los STR para mantener la biomasa en respuesta a HRT extremadamente cortos, a diferencia de otras configuraciones de reactores donde la membrana y los gránulos sirven como tales, respectivamente.

En general, el valor de la HRT puede variar desde unas pocas horas, como dos horas (Kim *et al.*, 2010), hasta 30 días, como Jeong *et al.*, (2010). Sin embargo, el valor óptimo de HRT debe determinarse caso por caso considerando diferentes parámetros, incluidas las características de alimentación, la hidráulica del sistema, las propiedades del lodo, el diseño/configuración del reactor, etc. (Chen *et al.*, 2016). Por ejemplo, un estudio que usó un MBR de lecho fluidizado anaeróbico integrado (Gao *et al.*, 2014b) redujo la HRT de 8 a 6 h y encontró que la productividad de metano aumentó en respuesta al cambio aplicado. Atribuyeron este hallazgo al consiguiente aumento de *OLR*. Por el contrario, la productividad de metano disminuyó cuando redujeron aún más la HRT, probablemente debido a la acumulación de AGV (Gao *et al.*, 2014b).

En un estudio diferente, Linke *et al.*, (2013) compararon el funcionamiento de 24 plantas de biogás a gran escala en Alemania bajo diferentes regímenes de temperatura. Afirmaron que, a menos de 20°C, se requerían HRT más largas para alcanzar un cierto nivel de degradación en comparación con las operaciones por encima de 35 °C. Por lo tanto, se podría concluir que la HRT debe determinarse en función de parámetros operativos como

la temperatura y el *OLR* en un diseño/configuración de digestor en particular. La Tabla 8 tabula los efectos de diferentes parámetros operativos en PB en AnMBR, incluidas posibles sugerencias para optimizar la PB (Chen *et al.*, 2016).

Tabla 8. Efectos de los factores operativos en la PB en AnMBRs y posibles sugerencias para optimizar la PB* (Chen et al., 2016).

Factor	Efecto en el proceso de PB		Sugerencias posibles para optimizar la PB en AnMBRs
Temperatura	Termófilo	Velocidades de reacción más rápidas/mayor capacidad de carga/mayor productividad de biogás.	AnMBR de dos fases con hidrólisis/acidogénesis termófila y metanogénesis mesófila.
		Posible acidificación/inhibición de PB.	Evitar cambios drásticos de temperatura
		Disminución de la estabilidad y aumento de toxicidad/mala metanogénesis/mayor aporte neto de energía y mayores inversiones.	
		Dificultad en la inmovilización de biomasa anaeróbica/malas características de sedimentación de lodos/actividades metanogénicas reducidas/mala calidad del efluente.	
		Menos enfriamiento requerido/economía de proceso mejorada.	
		Decaimiento de lodo con lodo mesófilo no adaptado/ensuciamiento grave de la membrana.	
		Viscosidad de lodo reducida/un flujo más alto/eficiencia del proceso/velocidades de corte más bajas/requerimiento de energía más bajo.	
		Una menor viscosidad del permeado/mayor permeabilidad de la membrana al disminuir la presión transmembrana.	
		Capa de torta más compacta/mayor resistencia de la capa de torta/problemas de ensuciamiento del servidor/flujo a largo plazo muy bajo/ineficiencia del proceso.	
	Mesófilo	Mejor estabilidad del proceso, mayor riqueza de biomasa, mejor calidad del permeado, pero posiblemente bajos rendimientos de metano y mala biodegradabilidad y desequilibrio de nutrientes.	

(Tabla 8 continúa en la página siguiente)

(Tabla 8 continúa de la página anterior)

Factor	Efecto en el proceso de PB		Sugerencias posibles para optimizar la PB en AnMBRs
Temperatura	Psicrófilo	Mayor solubilidad del metano/pérdida de metano en efluentes/menor recuperación metano.	
		Acumulación de STS y DQO soluble y mayor viscosidad/mayor resistencia a la filtración/mayor ensuciamiento y costo operativo.	
		Eliminación mejorada de la membrana y compensación por la disminución de la actividad metanogénica específica y la eliminación de lodos a granel.	
		El requisito de energía para operar el sistema es menor.	
		Reducción de la reacción y las tasas de hidrólisis/actividad metanogénica reducida.	
	Cambios de temperatura	Disminución de la temperatura/disminución en la tasa de producción de AGV, la concentración de amoníaco, la tasa de utilización del sustrato y la tasa metabólica de los microorganismos/mayores tiempos de inicio/disminución de CH_4 y H_2.	
		Aumento de temperatura/aumento de pH, hidrólisis de partículas orgánicas/aumento del potencial de metano.	
		Aumento de temperatura/concentración de amoníaco libre/inhibición metanogénica.	
		Fluctuación de temperatura/estrés en la biomasa/aumento del ensuciamiento de la membrana y el costo operativo.	
pH		Valor de pH extremadamente bajo/acidificación y acumulación de AGV/reducción del rendimiento de metano.	AnMBR de dos fases con condiciones optimizadas para reactores acidogénicos y metanogénicos para optimizar el rendimiento del biogás.
		Valor de pH extremadamente alto/aumento de la toxicidad del amoníaco e inhibición de los AGV/reducción del rendimiento de metano.	Minimice la carga de choque de pH al neutralizar la alimentación con productos químicos como el bicarbonato de sodio.
		Cambios de pH/dispersión de flóculos de lodo/acumulación de coloides, solutos o biopolímeros en la suspensión de lodo a granel/deterioro del rendimiento de membrana y PB potencial.	

(Tabla 8 continúa en la página siguiente)

(Tabla 8 continúa de la página anterior)

Factor	Efecto en el proceso de PB	Sugerencias posibles para optimizar la PB en AnMBRs
HRT	Existe un *HRT* óptimo, que garantiza la máxima productividad de metano.	Evite el funcionamiento con una HRT demasiado alta o demasiado baja.
	HRT inferior al valor óptimo/Acumulación de AGV/metano reducido/ensuciamiento de membrana.	Operar AnMBR para máxima PB en HRT óptima
	HRT por encima del valor óptimo/utilización insuficiente del componente del digestor de biogás/producción reducida de metano.	
SRT	SRT largo/mejora el proceso de metanogénesis/mejora el rendimiento de metano.	Generalmente se recomienda SRT largos para la operación de AnMBR.
	SRT largo/reduce el metano disuelto/mayor recuperación de metano.	Se requiere cuidado adicional para la mitigación de incrustaciones en SRT largos.
	SRT largo/reduce la eliminación de lodos y por ende costos.	
	SRT largo/reduce el tamaño de partícula de los lodos y liberación de SMP*/ ensuciamiento de membrana.	
	SRT largo/formación y consolidación de tortas/costo por ensuciamiento aumentado.	
	SRT largo/acumulación de sólidos inorgánicos/incrustaciones inorgánicas.	
OLR	Mayor OLR/mayor actividad metabólica de los metanógenos/aumento de la producción de biogás y del contenido de metano en el biogás hasta cierto punto	Operar AnMBR en OLR sostenible para maximizar el rendimiento de metano
	Alta OLR/AGV acumulación/acidificación irreversible/riesgo de un rendimiento de biogás deteriorado	Los sistemas termofílicos y la recirculación de efluentes pueden ayudar a aliviar los problemas de sobrecarga de los sistemas
	Alto OLR o carga de choque orgánico/ liberación de EPS/SMP ajustado y acumulación de partículas finas/ ensuciamiento grave de la membrana	

* Specific Methane Production.

5. La investigación sobre la Digestión Anaeróbica en Ecuador

La investigación sobre la DA en Ecuador ha sido desarrollada por diversos tipos de instituciones, las Instituciones de Educación Superior (IES) han liderado el desarrollo científico de esta temática con la participación de doce IES nacionales, y catorce IES internacionales, de los Institutos de Investigación Públicos solo uno ha desarrollado investigación en este ámbito y son tres los Institutos de Investigación Internacionales que han incursionado en la DA en Ecuador.

En el año 2010 la *Global Methane Initiative* mediante el *Eastern Research Group, Inc.*, realizó una evaluación de residuos ganaderos y agroindustriales en Ecuador para evaluar el potencial de incorporarlos en DA, como un sistema de gestión de residuos para reducir las emisiones de metano y proporcionar una fuente de energía renovable, los resultados obtenidos determinaron el potencial de reducción de metano en 16074 Mt CH_4 año^{-1}, con un reducción de emisiones de carbón en el orden de 386471 Mt CO_{2e} año^{-1}, siendo la industria del etanol la que aportaría con la mayor cantidad de residuos para el proceso de la DA (Eastem Research Group, 2010).

Castelo *et al.*, (2014), utilizaron biodigestores semi-continuos para la DA de residuos de frutas y hortalizas de un mercado municipal, evaluaron tres inóculos microbianos: sedimentos de un lago artificial, lodos activos de una planta de tratamiento de aguas residuales de una cervecería, y el efluente de un digestor, adicionaron estiércol de ganado como parte del inóculo, utilizaron una mezcla de residuos vegetales: manzana 15%, tomate 25%, lechuga 25%, pimiento 20%, y hojas de col 15%. La máxima generación acumulativa de metano fue alcanzada con la carga del 5% de residuos vegetales en el biorreactor, con un valor de 2401,92 L CH_4 kg SV^{-1}. Mientras que Freire *et al.* (2017), realizaron un análisis geográfico de la generación de residuos agropecuarios para potenciar la co-digestión anaeróbica (CoDA) mediante un Sistema de Información Geográfica (SIG), establecieron zonas geográficas con valores altos, >50 t sólidos volátiles (SV), y valores bajos <10 t SV (Freire *et al.* 2017).

Calispa *et al.*, en el 2017, continuaron con el estudio de la CoDA, y evaluaron el proceso con residuos alimenticios y lodos primarios, para la generación de energía y calor. Trabajaron en condiciones mesófilas (35 °C), y termófilas (55 °C), con tres diferentes *OLR*, 2,08; 2,49 y 3,34 g SV L^{-1} día^{-1}, con un tiempo de retención hidraúlica (*HRT-Hydraulic Retention Time*) de 21 días, la producción máxima de metano fue de 205 y 270 mL CH_4 g^{-1} SV para los regímenes mesófilo y termófilo, respectivamente.

La investigación de la DA de aguas residuales empezó en el 2018 con el trabajo de Morales Paredes *et al.*, que desarrollaron un análisis del proceso de DA para las aguas residuales de la industria del café instantáneo, concluyendo que este proceso es el más adecuado para el tratamiento de este tipo de residuales, y que el sistema utilizado debe ser el *UASB* (Morales Paredes *et al.*, 2018). La CoDA de residuos vegetales y animales es una temática pobremente evaluada en Ecuador, ha pesar de su potencial energético, Meneses-Quelal y Velázquez-Martí, en el 2021 evaluaron la producción de metano a partir de la CoDA de residuos de matadero y paja de trigo. Las pruebas fueron en régimen mesófilo (38 °C) y con diferentes concentraciones de SV: 5, 10, y 15 g SV L^{-1}, la producción máxima de metano fue de 320,48 mL CH_4 g^{-1} SV en la concentración de 15 g SV L^{-1}.

Otro material evaluado para la DA es el estiércol porcino, así, Collahuaso Martínez *et al.*, (2018), caracterizaron el proceso de la DA de estiércol porcino en un biodigestor tubular de 11 m^3 construido en geomembrana de polietileno, los valores mínimos y máximos para la producción de biogás fueron: 1,2 m^3 y 4,5 m^3, respectivamente.

Desde otra perspectiva se han desarrollado investigaciones para el uso de la DA como una alternativa de sostenibilidad energética para zonas del Ecuador, así, Matovelle Bustos y Matovelle Romo, (2018), realizaron simulaciones de DA y producción de metano con el programa DESASS 7.1 (*Design and Simulation of Activated Sludge System*), la zona evaluada se ubicó en la Parroquia Tarqui de la ciudad de Cuenca, analizaron la producción de residuos

de 510 animales, entre ellos: vacas de producción lechera, cerdos, ovejas y caballos, la simulación proporcionó un volumen de residuos de 21,06 m^3, y la producción simulada de metano estaría en el orden de 18,5 m^3 $día^{-1}$ (Matovelle Bustos y Matovelle Romo, 2018). La propuesta de modelos matemáticos para la estimación de metano a partir de la DA de residuos orgánicos es otra área de investigación, en este campo Martínez-Balderramo *et al.*, (2022) propusieron un modelo matemático dinámico (MMD) basado en el consumo de SV, utilizaron el software MATLAB® para la implementación del modelo, pudieron representar el proceso de DA de varios tipos de sustratos orgánicos, con el MMD, demostraron que las cáscaras de banano y la paja de arroz pueden alcanzar valores altos de producción de metano en el orden de >460 mL CH_4 g^{-1} SV (Martínez-Balderramo *et al.*, 2022).

Analizando otro enfoque, López-Anchundia *et al.*, (2019) investigaron los aspectos biológicos de la DA de aguas residuales de la industria pesquera, determinaron como factor fundamental la termoestabilidad de las biomoléculas, esto por que el rendimiento celular es inversamente proporcional a la temperatura, concluyeron que las temperaturas adecuadas para la DA es el régimen mesofílico (35 °C), mientras que en el régimen termofílico (50 °C) se alcanzan rendimientos de CH_4 cercanos al rendimiento teórico, sin embargo, en procesos continuos la biomasa disminuye, y por esto no se mantiene la fase de crecimiento celular constante.

También se ha experimentado la DA empleando biomasa de *Escherichia coli*, en un biodigestor tipo *batch* se cargaron residuos de cáscaras de naranja y piña, con un tiempo de retención de 30 días, un porcentaje de sólidos totales (ST) de 8%, y el inóculo bacteriano fue de 15%, alcanzaron rendimientos estables de biogás durante los 30 días de operación (Vera-Loor *et al.*, 2019). Sandoval *et al.*, (2020), analizaron inóculos microbianos con el objetivo de optimizar la producción de biogás, para analizar la carga microbiana se muestreo y caracterizaron fangos residuales de la cisterna colectoras de desechos de un matadero. Obtuvieron un total de 36 cepas microbianas de nueve estratos (15 cm cada uno) del fango residual, siete cepas produjeron biogás, procedentes de los estratos comprendidos entre 90 y 120 cm. Concluyeron que combinar un conjunto de microorganismos metanogénicos posibilita un aumento significativo en la cantidad y la calidad de los productos del proceso de biodigestión siempre que sean compatibles. La manipulación de la dominancia de una determinada especie de un consorcio, no se traduce necesariamente en el aumento de la productividad metabólica del conjunto. La combinación de dos cepas metanogénicas aisladas puede resultar en antagonismo marcado (Sandoval *et al.*, 2020).

Los residuos sólidos urbanos (RSU) es otro sustrato orgánico que ha sido analizado en el proceso de la DA, como un sistema de tratamiento de los RSU. Así, Muñoz-Menéndez *et al.* (2020), proponen un sistema separado para la DA de los RSU, un digestor donde ocurre la hidrólisis y acidogénesis y el efluente de este digestor alimenta otro digestor donde ocurre la metanogénesis, hay un pretratamiento que tritura hasta alcanzar tamaño de partículas de los residuos de 0,3-5,0 mm, estos residuos se caracterizaron en los parámetros ST, SV y pH. La producción de metano estuvo en un mínimo de 310,76 L CH_4 kg^{-1} STV, y un máximo de 527,44 L CH_4 kg^{-1} STV (Muñoz-Menéndez *et al.*, 2020).

Chuquer *et al.*, (2020) determinaron la concentración de los hidrocarburos: metano (CH_4), propano (C_3H_8) y butano (C_4H_{10}) en la DA de desechos de faenamiento mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-*Fourier Transform Infared Spectroscopy*),

asignando bandas de absorción de cada hidrocarburo en el biogás producido. Alcanzaron límites de cuantificación de: 0,36% v/v para el C_3H_8 y C_4H_{10}, y 1,47% v/v para el CH_4. Realizaron pruebas de DA con desechos de faenamiento municipal del Distrito Metropolitano de Quito, determinaron que una mezcla de rumen y estiércol bovino, sometida a 50 °C, generaba hasta un 65,4% v/v de metano luego de 15 días de residencia, además, se produjo digestato sólido y líquido que cumplieron las normativas internacionales para su uso como biofertilizantes.

El análisis técnico, económico y ambiental de la DA de RSU ha sido también un tema desarrollado por investigadores ecuatorianos, así, Muñoz-Menéndez *et al.*, (2021), evaluaron técnica, económica y ambientalmente la gestión de los RSU del cantón Manta, Ecuador a través de la DA. Determinaron con este proceso una remoción promedio de ST de 58,24% con un valor máximo de 71,31%, para los STV el valor promedio fue de 64.83% y un máximo de 78,78%, con una producción de metano de 426 L CH_4 kg^{-1} STV.

Coello *et al.* (2021), determinaron el potencial energético de los residuos orgánicos domésticos (ROD) de hogares de Guayaquil, caracterizaron dichos residuos con los siguientes parámetros: análisis físico, punto de fusión de ceniza, análisis elemental y contenido energético (poder calorífico superior e inferior-PCS & PCI). Determinaron para los ROD un PCS de 3742,21 kcal kg^{-1}, y para el PCI 3309,68 kcal kg^{-1}. La caracterización fisicoquímica de los ROD presentó: humedad (%) 81,5 ± 2,19; pH 4,07 ± 0,34; relación C/N 25,51 ± 4,89; SVT (%) 15,78 ± 1,94; materia seca (%) 17,04 ± 1,94; MO (%) 92,24 ± 3,97. Determinaron que los ROD muestran un potencial energético adecuado para ser utilizados en proyectos de valorización o generación de biocombustibles.

Los residuos orgánicos agrícolas (ROA) han sido ampliamente evaluados en la DA, Gómez-Salcedo *et al.* (2021), determinaron el potencial de los residuos del despulpe del café debido a su alto contenido de MO en base seca (90,5 ± 1,69%) en procesos de DA. Evaluaron sistemas discontinuos (*Batch*) y semicontinuo en régimen mesófilo (37,0 ± 1,0 °C), con un rendimiento máximo de metano en sistema *batch* de 259,80 ± 15,00 mL CH_4 g^{-1} SV.

Un área poco investigada en Ecuador es el aprovechamiento energético del metano que se produces en los rellenos sanitarios. Uno de los pocos trabajos de investigación es el realizado por Poma *et al.*, (2021), que estimaron el biogás generado en dos rellenos sanitarios de la zona centro-sur del Ecuador y que comprenden entre ambos a 221 cantones, el primero denominado "Pichacay", con un sistema de biogás, localizado en la zona centro-sur de los Andes, en la provincia del Azuay del cantón Cuenca y que presta servicio a 417632 habitantes, proyecto que inició en el 2016 y tiene un área de operación de 140 ha, es manejado por la Empresa Pública Municipal (EMAC EP) y la compañía BGP ENERGY CEM.

El segundo relleno sanitario es denominado "Las Iguanas", se caracteriza por la falta de un sistema de biogás, localizado en la región costera sur de la provincia del Guayas, cantón Guayaquil, presta servicio a 2350915 habitantes, inició en 1994 y tiene un área total de 190 ha, manejado por el consorcio ILM-LAS IGUANAS. Para la estimación del biogás de los rellenos sanitarios de Pichacay y Las Iguanas, realizaron una investigación descriptiva que consistió en una visita de campo a los rellenos sanitarios y el levantamiento de información sobre la cantidad de RSU ingresados a los rellenos sanitarios del 2004 al 2020, la proyección de la cantidad de residuos de 2021 a 2052.

Además, 2052 será el último año en el que se estima que los RSU se depositarán en rellenos sanitarios, para obtener el porcentaje de CH_4, CO_2 y H_2S que arrojan los informes de análisis de gases de EMAC EP y el Consorcio ILM-LAS en 2020. Con estas consideraciones utilizaron el modelo matemático *Landfill Gas Emission Model versión 3.03* (*EPA-Environmental Protection Agency*). Determinaron que entre 2004 a 2020 un total de 2,13 x 10^6 t de RSU han sido depositadas en el relleno sanitario de Pichacay, mientras que desde 1994 a 2020 un total de 28,71 x 10^6 t de RSU han sido depositadas en el relleno sanitario de Las Iguanas. Con estos valores el modelo *LandGEM* calculó un máximo de producción de biogás de 76982, 18 m^3 $año^{-1}$ en el relleno sanitario de Pichacay, mientras que para el relleno sanitario Las Iguanas el valor máximo calculado fue de 693975,23 m^3 $año^{-1}$. (Poma *et al.*, 2021).

Un material escasamente utilizado es la biomasa de microalgas, Álvarez *et al.* (2020), evaluaron el proceso de CoDA mesófila de biomasa cianobacteriana con estiércol de ganado. La biomasa, que fue obtenida de la cianobacteria *Arthrospira platensis* cultivada en aguas residuales lácteas y previamente sometida a tratamientos térmicos, mostró altos rendimientos de metano durante la fermentación, con 482,54 ± 8,27 mL CH_4 g^{-1} sólidos volátiles que representan entre el 40 y 60% más de producción en comparación a la mono-digestión de los sustratos utilizados.

La CoDA también ha sido analizada para tratar residuos orgánicos de procesos bioenergéticos, así, Álvarez-Montero *et al.*, (2022) analizaron la CoDA de la torta de semilla de Jatropha (TSJ) y el estiércol de ganado vacuno. Esta TSJ es el producto de la extrusión de las semillas de la especie vegetal *Jatropha curcas*, para la obtención de un aceite vegetal no comestible que se utiliza para la generación de electricidad usándolo en motores adaptados o para la producción de biodiesel, la TSJ no se puede utilizar como alimento de animales o disponerla como un fertilizante por su contenido de compuestos tóxicos. Evaluaron los regímenes mesófilo (30 °C) y termófilo (50 °C) en condiciones tipo *batch*, y tres ratios C/N: 20:1; 25:1; y 30:1 con una concentración final de SV de 7,7 g L^{-1} en todas las condiciones, y un tiempo de residencia de 30 días. La menor producción de metano fue en el régimen mesófilo y con una relación C/N de 20:1 con 208,66 ± 2,61 mL CH_4 g^{-1} SV; y la mayor producción la observaron en el régimen termófilo con una relación C/N de 25:1 con 633,95 ± 5,59 mL CH_4 g^{-1} SV.

6. Conclusiones

La DA es un tecnología que ha alcanzado un grado de desarrollo relativamente alto, y que en paises desarrollados es utilizada para el tratamiento de todo tipo de residuos orgánicos y producción de bioenergía, con objetivos de utilización/valorización de residuos orgánicos, y la comercialización de biocombustibles. Caso contrario ocurre en Ecuador, donde este proceso biológico no muestra un alto grado de tecnificación, y que es utilizada exclusivamente para el tratamiento de residuos orgánicos y en algunos caso el uso del digestato sólido en agricultura, el componente bioenergético no es aprovechado por falta de una regulación en políticas públicas. Esto último impide el completo desarrollo de la DA en Ecuador.

7. Referencias Bibliográficas

Aboudi, K., Álvarez-Gallego, C.J., Romero-García, L.I. (2015). Semi-continuous anaerobic co-digestion of sugar beet byproduct and pig manure: effect of the organic loading rate (OLR) on process performance. *Bioresource Technology, 194*, 283–290. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.031

Acuña, M. (1984). Manual Técnico para Construcción y Mantenimiento de Biodigestores tipo Hindú. Quito: Instituto Nacional de Energía.

Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T. (2011). Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends Biotechnol., 29*(2), 70–78. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.006

Ahring, B.K., Ibrahim, A.A., and Mladenovska, Z. (2001). Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Res., 35*(10), 2446–2452. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00526-1. PMID:11394779

Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., & Janssen, R. (2008). *Biogas handbook*. University of Southern Denmark Esbjerg. ISBN 978-87-992962-0-0.

Álvarez, X., Arévalo, O., Salvador, M., Mercado, I., & Velázquez-Martí, B. (2020). Cyanobacterial Biomass Produced in the Wastewater of the Dairy Industry and Its Evaluation in Anaerobic Co-Digestion with Cattle Manure for Enhanced Methane Production. *Processes, 8*(10), 1290. https://doi.org/10.3390/pr8101290

Álvarez-Montero, X., Mercado-Reyes, I., Valdez-Solórzano, D., Santos-Ordoñez, E., Delgado-Plaza, E., Peralta-Jaramillo, J. (2022). Effect of temperature and the Carbon-Nitrogen (C/N) ratio on methane production through anaerobic co-digestion of cattle manure and Jatropha seed cake. *Renewable Energies and Power Quality Journal, 20*, 364-368. https://doi.org/10.24084/repqj20.312

Amani, T., Nosrati, M., Sreekrishnan, T.R. (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, Chemical, and operational aspects – a review. *Environ. Rev., 18*, 255-278. https://doi.org/10.1139/A10-011

Aqualimpia Engineering. (2006). Aqualimpia Engineering. Retrieved Marzo 27, 2015, from http://www.aqualimpia.com/PDF/ BD-San-Francisco.pdf

Araujo, A.C. (2014). Puesta en marcha de la planta semi-industrial de digestión anaeróbica en Latinoamerica de Jugos S.A. Tesis de grado. Quito: Universidad San Francisco de Quito. http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3276/1/000110348.pdf

Argyropoulos, A. (2013). Soft sensor development and process control of anaerobic digestion. Thesis Doctoral. University of Exeter.

Arikan, O.A., Mulbry, W., & Lansing, S. (2015). Effect of temperature on methane production from field-scale anaerobic digesters treating dairy manure. *Waste Management, 43*, 108–113. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.005

Bainotti, A.E., Setogaichi, M., and Nishio, N. (1996). Kinetics studies and medium improvement of growth and vitamin B_{12} production by *Acetobacterium* sp. in batch culture. *J. Ferment. Bioeng., 81*(4), 324–328. https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)80585-X

Boe, K., & Angelidaki, I. (2006). *Online monitoring and control of the biogas process*. Technical University of Denmark Danmarks Tekniske Universitet, Department of Systems Biology Institut for Systembiologi.

Botero, R., & Preston, T. (1987). *Biodigestor de bajo costo para la producción de combustible y fertilizante a partir de excretas*. Cali: CIPAV. Disponible en: http://www.utafoundation.org/ publications/botero&preston.pdf.

Bowen, E.J., Dolfing, J., Davenport, R.J., Read, F.L., Curtis, T.P. (2014). Low-temperature limitation of bioreactor sludge in anaerobic treatment of domestic wastewater. *Water Science & Technology, 69*(5), 1004-1013. https://doi.org/10.2166/wst.2013.821

Bryant, M.P. (1979). Microbial methane production—theoretical aspects. *J. Anim. Sci., 48*(1), 193–201. https://doi.org/10.2527/jas1979.481193x

Calispa, M., Dong, Y., Roskilly, T., Pathare, P.B., Lamidi, R.O. (2017). Biogas from anaerobic co-digestion of food waste and primary sludge for cogeneration of power and heat. *Energy Procedia, 142*, 70-76. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.12.012

Castelo, P., Peñafiel, R., Ochoa-Herrera, V. (2014). Anaerobic digestion of fruit and vegetable waste in semi-continuous reactors from a municipal market in Tumbaco, Ecuador. *Avances en Ciencias e Ingenierías, 6*(2), 31-39. https://doi.org/10.18272/aci.v6i2.185

Chaikasem, S., Jacob, P., & Visvanathan, C. (2015). Performance improvement in a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor using PVA-gel as biocarrier. *Desalin Water Treat., 53*, 2839–2849. https://doi.org/10.1080/19443994.2014.931531

Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T., & Kumar, R. (2012). Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. *Energy*, 43: 273–282. https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.04.029

Chang, J.J., Chou, C.H., Ho, C.Y., Chen, W.E., Lay, J.J., and Huang, C.C. (2008). Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for biofuels and bio-hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy, 33*(19), 5137–5146. https://doi.org/10. 1016/j.ijhydene.2008.05.021

Cheikhyoussef, A., Pogori, N., Chen, H., Tian, F., Chen, W., Tang, J., and Zhang, H. (2009). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin–like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. *Food Contr., 20*(6), 553–559. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.003

Chen, C., Guo, W., Ngo, H.H., Lee, D.J., Tung, K.L., Jin, P., Wang, J., & Wu, Y. (2016). Challenges in biogas production from anaerobic membrane bioreactors. *Renew Energy, 98*, 120–134. https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.095

Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. (2008). Inhibition of anaerobic process: a review. *Bioresource Technology, 99*, 4044-4064. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057

Chong, M.L., Rahim, R.A., Shirai, Y., and Hassan, M.A. (2009). Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *Int. J. Hydrogen Energy, 34*, 746–771. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.095

Chuquer, D., Torres, D., González, E., Moncayo, J., Astorga, D., & Alcívar, C. (2020). Monitoring of anaerobic waste digestion at Quito slaughterhouse. *InfoANALÍTICA, 8*(2), 97-116. https://doi.org/10.26807/ia.v8i2.136

Coello, M., Rodríguez, B., González, & Hidalgo, J. (2021). Aprovechamiento energético de la biomasa residual: caso de estudio de los restos de comida de familias de estudiantes de la Universidad de Guayaquil, para producción de biogás. *Revista FIGEMPA, 12*(2), 15-25. https://doi.org/10.29166/revfig.v12i2.3251

Collahuaso Martínez, E.M., Pérez-Martínez, A., Herrera-Robledo, M., Diéguez-Santana, K. (2018). The Pig Manure Anaerobic Digestion. A tubular biodigester characterization in the Ecuadorian Amazon. *MOL2NET*. https://doi.org/10.3390/mol2net-04-05880

Dareioti, M.A., Dokianakis, S.N., Zafiri, C., & Kornaros, M. (2017). Enhancement of biogas production by using a two-stage process for the anaerobic digestion of cheese whey. *Linnaeus Eco-Tech*., 130–140. https://doi.org/10.15626/Eco-Tech.2010.013

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., & Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science, 280*(5361), 295–298. https://doi.org/10.1126/science.280.5361. 295. PMID:9535661

de Bok, F.A.M., Plugge, C.M., and Stams, A.J.M. (2004). Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Res., 38*(6), 1368–1375. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003. 11.028. PMID:15016514

Deublein, D., Steinhauser, A. (eds). (2008). *Biogas from waste and renewable resources: an introduction*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Mörlenbach, Germany. https://doi.org/10.1002/9783527621705

Drosg, B. (2013). *Process monitoring in biogas plants*. IEA Bioenergy Task. ISBN: 978-1-910154-03-8

Eastem Research Group. (2010). *Resource Assessment for Livestock and Agro-Industrial Wastes – Ecuador*. Global Methane Initiative.

Ekama, G., & Wentzel, M. (2008). Organic material removal. In: Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA, Brdjanovic D (eds) *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*. Published by IWA Publishing, London, UK, pp 53–86. https://doi.org/10.2166/9781789060362

El-Mamouni, R., Leduc, R., and Guiot, S.R. (1998). Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Sci. Technol., 38*(8-9), 341–347. https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00710-0

Ennouri, H., Miladi, B., Diaz, S.Z., Fernández-Güelfo, L.A., Solera, R., Hamdi, M., & Bouallagui, H. (2016). Effect of thermal pretreatment on the biogas production and microbial communities balance during anaerobic digestion of urban and industrial waste activated sludge. *Bioresource Technology, 214*: 184-191. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.076

Esteves, S., Miltner, M., & Puchas, K. (2013). *Monitoring review and guide: for the optimization of anaerobic digestion and biomethane plants*. University of Glamorgan.

Falk, H.M. (2012). Monitoring the anaerobic digestion process. Thesis Doctoral. Jacobs University. Bremen.

Fang, H.H.P., Chui, H.K., & Li, Y.Y. (1994). Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters. *Water Sci. Technol., 30*, 87–96. https://doi.org/10.2166/wst.1994.0587

Fang, Y., Lu, Y., Lv, F., Bie, X., Zhao, H., Wang, Y., and Lu, A. (2009). Improvement of alkaline lipase from *Proteus vulgaris* T6 directed evolution. *Enzyme Microb. Technol., 44*(2), 84–88. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.10.018

FAO. (2011a). Manual de Biogás. Proyecto CHI/==/G32 "Chile: Remoción de Barreras para Electrificación Rural con Energías Renovables". Varnero Moreno, M.T., Eds; ISBN 978-95-306892-0.

FAO. (2011b). *Estado del Arte y Novedades de la Bioenergía en el Ecuador*. Trávez Peñafiel, D.C. Eds.

FAO. (2019). *Guía teórico-práctica sobre el biogás y los biodigestores*. Colección Documentos Técnicos N° 12. Buenos Aires. 104 pp. ISBN 978-92-5-131559-0

Freire, S., Villamar, C.A., & Ríos, X. (2017). Análisis geográfico para la implementación de sistemas de tratamiento de co-digestión anaerobia de residuos agropecuarios en la provincia de Manabí, Ecuador. *Métodos y Análisis con Tecnologías de la Información Geográfica*.

Fritsch, M., Hartmeier, W., and Chang, J.S. (2008). Enhancing hydrogen production of *Clostridium butyricum* using a column reactor with square-structured ceramic fittings. *Int. J. Hydrogen Energy, 33*(22), 6549–6557. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.070

Gallert, C., and Winter, J. (2008). Propionic acid accumulation and degradation during re-start of a full-scale anaerobic biowaste digester. *Bioresour. Technol., 99*(1), 170–178. https://doi.org/10.1016/j. biortech.2006.11.014. PMID:17197176

Gao, D.W., Hu, Q., Yao, C., Qi-Ren, N. (2014a). Treatment of domestic wastewater by an integrated anaerobic fluidized-bed membrane bioreactor under moderate to low-temperature conditions. *Bioresource Technology, 159*, 193-198. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.086

Gao, D.W., Hu, Q., Yao, C., Ren, N.Q., Wu, W.M. (2014b). Integrated anaerobic fluidized-bed membrane bioreactor for domestic wastewater treatment. *Chem Eng J., 240*: 362–368. https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.012

Gao, W.J., Lin, H., Leung, K., & Liao, B. (2010). Influence of elevated pH shocks on the performance of a submerged anaerobic membrane bioreactor. *Process Biochem., 45*, 1279–1287. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.04.018

Gerardi, M.H. (2003). The microbiology of anaerobic digesters. In: Gerardi MH (ed) *Wastewater microbiology series*. John Wiley & Sons Inc., Wiley Incorporated, Hoboken, NJ. https://doi.org/10.1002/0471468967

Gómez-Salcedo, Y., Baquerizo-Crespo, R., Da Silva, A.J., Oliva-Merencio, D., Pereda-Reyes, I. (2021). Anaerobic digestion of solid wastes from coffee wet processing. *Rev. Int. Contam. Ambie., 37*, 281-292. https://doi.org/10.20937/RICA.53753

González Chong, W., Chao Tung-San, J., Zavala Ortíz, G., & Duque Rivera, J. (1987). Biodigestores y biogás: Recuento de la experiencia en ESPOL. *Encuentro Nacional sobre Biodigestores: Memorias* (pp. 15-22). Machala: Universidad Técnica de Machala - Instituto Nacional de Energía.

Grootaerd, H., Liessens, B., & Verstraete, W. (1997). Effects of directly soluble and fibrous rapidly acidifying chemical oxygen demand and reactor liquid surface tension on granulation and sludge-bed stability in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol., 48*(3), 304–310. https://doi.org/10.1007/ s002530051054

Guiot, S.R., Gorur, S.S., Bourque, D., and Samson, R. (1988). Metal effect on microbial aggregation during up-flow anaerobic sludge bed-filter (UBF) reactor start-up. In *Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology*. Edited by G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis, L.W. Hulshoff Pol. Wageningen, The Netherlands. pp. 187–194.

Guiot, S.R., Pauss, A., & Costerton, J.W. (1992). A structured model of the anaerobic granules consortium. *Water Sci. Technol., 25*, 1–10. https://doi.org/10.2166/wst.1992.0133

Guo, X., Wang, C., Sub, F., Zhu, W., & Wu, W. (2014). A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. *Bioresource Technology, 152*, 420–428. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.012

Hernández, M., & Rodríguez, M. (2013). Hydrogen production by anaerobic digestion of pig manure: effect of operating conditions. *Renewable Energy, 53*: 187–192. https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.11.024

Hirsh, R. (1984). Microcolony formation and consortia. In *Microbial Adhesion and Aggregation*. Edited by K.C. Marshall. Springer, Berlin. pp. 373–393. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70137-5_24

Hulshoff Pol, L.W. (1989). The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. Ph.D. thesis, Agricultural University of Wageningen, Wageningen, The Netherlands.

Hulshoff Pol, L.W., de Castro Lopes, S.I., Lettinga, G., & Lens, P.N.L. (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Res., 38*(6), 1376–1389. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.002. PMID:15016515

Hulshoff Pol, L.W., de Zeeuw, W.J., Velzeboer, C.T.M., & Lettinga, G. (1983). Granulation in UASB reactors. *Water Sci. Technol., 15*, 291–304. https://doi.org/10.2166/wst.1983.0172

Hur, H.G., & Rafii, F. (2000). Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum*. *FEMS Microbiol. Lett., 192*(1), 21–25. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09353.x. PMID:11040423

Jeong, E., Kim, H.W., Nam, J.Y., Shin, H.S. (2010). Enhancement of bioenergy production and effluent quality by integrating optimized acidification with submerged anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology, 101*, S7–S12. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.064

Jeong, H.S., Kim, Y.H., Yeom, S.H., Song, B.K., and Lee, S.I. (2005). Facilitated UASB granule formation using organic-inorganic hybrid polymers. *Process Biochem., 40*(1), 89–94. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.041

Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., & Li, M. (2013). Volatile fatty acids production from food waste: effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresource Technology, 143*, 525–530. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.025

Jiang, Y., Heaven, S., & Banks, C.J. (2012). Strategies for stable anaerobic digestion of vegetable waste. *Renewable Energy, 44*, 206–214. https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.01.012

Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D., and Park, J.M. (2008). Statistical optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by newly isolated *Clostridium tyrobutyricum* JM1. *Int. J. Hydrogen Energy, 33*(19), 5176–5183. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.012

Kalyani, D.C., Telke, A.A., Dhanve, R.S., and Jadhav, J.P. (2009). Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. *J. Hazard. Mater., 163*(2-3), 735–742. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.020. PMID:18718713.

Khan, A.W. (1980). Degradation of cellulose to methane by a co-culture of *Acetibrio cellulolyticus* and *Methanosarcina barkeri*. *FEMS Microbiol. Lett., 9*, 233–235. https://doi.org/10.1016/0378-1097(80)90131-7

Khan, M., Ngo, H.H., Guo, W., Liu, Y., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Deng, L., Wang, J., & Wu, Y. (2016). Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresource Technology, 219*, 738–748. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.073

Kim, J., Kim, K., Ye, H., Lee, E., Shin, C., McCarty, P.L., & Bae, J. (2010). Anaerobic fluidized bed membrane bioreactor for wastewater treatment. *Environ Sci Technol., 45*, c576–581. https://doi.org/10.1021/es1027103

Kim, J.Y., Lee, M.Y., Ji, G.E., Lee, Y.S., & Hwang, K.T. (2009). Production of gamma-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Int. J. Food Microbiol., 130*(1), 12–16. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.028. 12.028. PMID:19167126

Kumar, A., Yadav, A.K., Sreekrishnan, T.R., Satya, S., Kaushik, C.P. (2008). Treatment of low-strength industrial cluster wastewater by anaerobic hybrid reactor. *Bioresource technology, 99*, 3123–3129. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.056

Kundu, K., Bergmann, I., Klocke, M., Sharma, S., & Sreekrishnan, T. (2014). Impact of abrupt temperature increase on the performance of an anaerobic hybrid bioreactor and its intrinsic microbial community. *Bioresource Technology, 168*, 72-79. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.093

Kundu, K., Sharma, S., & Sreekrishnan, T. (2013). Changes in microbial communities in a hybrid anaerobic reactor with organic loading rate and temperature. *Bioresource Technology, 129*, 538–547. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.118

Kundu, K., Sharma, S., & Sreekrishnan, T. (2017). Influence of process parameters on anaerobic digestion microbiome in bioenergy production: towards an improved understanding. *BioEnergy Research, 10*, 288–303. https://doi.org/10.1007/s12155-016-9789-0

Kwietniewska, E., & Tys, J. (2014). Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. Renewable Sustainable *Energy Review, 34*, 491-500. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.041

Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W., & Klapwijk, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng., 22*(4), 699–734. https://doi.org/10.1002/bit.260220402

Li, Y., Park, S.Y., & Zhu, J. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renew. Sustain. Energy Rev., 15*(1), 821–826. https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042

Li, Z., Han, J., Jiang, Y., Browne, P., Knox, R.J., & Hu, L. (2003). Nitrobenzocyclophosphamides as potential prodrugs for bioreductive activation: synthesis, stability, enzymatic reduction, and antiproliferative activity in cell culture. *Bioorg. Med. Chem., 11*(19), 4171–4178. https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00459-0. PMID:12951148

Lin, H., Peng, W., Zhang, M., Chen, J., Hong, H., & Zhang, Y. (2013). A review on anaerobic membrane bioreactors: applications, membrane fouling and future perspectives. *Desalination, 314*, 169–188. https://doi.org/10.1016/j.desal.2013.01.019

Lindmark, J., Thorin, E., Fdhila, R.B., & Dahlquist, E. (2014). Effects of mixing on the result of anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev., 40*, 1030–1047. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.182

Lindner, J., Zielonga, S., Oechsner, H., & Lemmer, A. (2015). Effect of different pH-values on process parameters in two-phase anaerobic digestion of high-solid substrates. *Environ Technol., 36*, 198–207. https://doi.org/10.1080/09593330.2014.941944

Linke, B., Muha, I., Wittum, G., & Plogsties, V. (2013). Mesophilic anaerobic co-digestion of cow manure and biogas crops in full-scale German biogas plants: a model for calculating the effect of hydraulic retention time and VS crop proportion in the mixture on methane yield from digester and from digestate storage at different temperatures. *Bioresource Technology, 130*, 689–695. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.137

Liu, Y.T., Balkwill, D.L., Aldrich, H.C., Drake, G.R., & Boone, D.R. (1999). Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov., and *Syntrophobacter wolinii*. *Int. J. Syst. Bacteriol., 49*(2), 545–556. https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-545. PMID:10319475

López-Anchundia, E., Morales-Paredes, E., Alvarado-Zambrano, S. (2019). Biological aspects in the anaerobic digestion of the fish industry wastewater. *Revista de Ciencias del Mar y Acuicultura "YAKU", 2*(4), 20-27.

Maestas, G., Jones, D.W., Samuels Jr., G., & Younger, D.R. (1986). Final evaluation of USAID Project No. 518-0029/Loan No. 518-w-039, Alternative Energy Sources. Oak Ridge: Oak Ridge National Laboratory.

Mahony, E.M., Varangu, L.K., Cairns, W.L., Kosaric, N., and Mur- ray, R.G.E. (1987). The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up. *Water Sci. Technol., 19*, 249–260. https://doi.org/10.2166/wst.1987.0206

Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev., 45*, 540–555. https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032

Marchaim, U. (1992). *Biogas processes for sustainable development*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). ISBN 92-5-103126-6.

Martí-Herrero, J. (2013). *Intercambio de experiencias en biodigestores entre Ecuador y Bolivia*. Redbiolac. http://redbiolac.org/wp-content/ uploads/Informe_Ecuador_Bolivia_2013.pdf

Martínez-Balderramo, L.A., Cheme-Rodríguez, S.D., Baquerizo-Crespo, R.J., & Riera, M.A. (2022). Simulation of an anaerobic digestion System for agricultural residuals generated in the province of Manabí. *AFINIDAD IQS, 79*(596), 11-16. https://doi.org/10.55815/400722

Martinez-Sosa, D., Helmreich, B., Netter, T., Paris, S., Bischof, F., & Horn, H. (2011). Anaerobic submerged membrane bioreactor (AnSMBR) for municipal wastewater treatment under mesophilic and psychrophilic temperature conditions. *Biores Technol*., 102, 10377–10385. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.012

Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., & Ng, W.J. (2015). Comparison of single-stage and two-phase anaerobic sludge digestion systems—performance and microbial community dynamics. *Chemosphere, 140*, 54–62. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.028

Matovelle Bustos, C.M., & Matovelle Romo, M.M. (2018). Anaerobic biological treatments of organic waste as an alternative for Energy sustainability in Andean areas - Ecuador. *Revista Killkana Sociales, 2*(3), 95-100. https://doi.org/10.26871/killkana_social.v2i3.328

McInerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B., and Costerton, J.W. (1981). *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol., 41*(4), 1029–1039. PMID:16345745.

Meneses-Quelal, W.O., & Velázquez-Martí, B. (2021). Producción de Metano a Partir de Residuos de Matadero y Paja de Trigo: Influencia de la Concentración. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M., 1*(2), 991-997. https://doi.org/10.18502/espoch.v1i2.9518

Morales Paredes, C.A., Rivadeneira Mendoza, B.F., & García Moreira, S.E. 2018. Anaerobic digestion of wastewater from the instant coffee industry. *Revista EspamCiencia, 9*(1), 23-32.

Moriarty, K. (2013). Feasibility study of anaerobic digestion of food waste in St. National Renewable Energy Laboratory-NREL, Bernard, Louisiana-EPA.

Muñoz-Menéndez, M.B., Contreras-Moya, A.M., Santos-Herrero, R.F., Rosa-Domínguez, E.R., & Cárdenas-Ferrer, T. (2021). Evaluación técnica, económica y ambiental de una propuesta para la gestión de los residuos sólido-urbanos en Manta, Ecuador. *Tecnología Química, 41*(3), 601-624. https://doi.org/10.46296/ig.v3i6.0017

Muñoz-Menéndez, M.B., Santos-Herrero, R.F., Contreras-Moya, A.M., Rosa-Domínguez, E.R., Cárdenas-Ferrer, T. (2020). Análisis del proceso de digestión anaeróbica para el tratamiento de residuos sólidos urbanos de Manta, Ecuador. *Revista Científica SAPIENTIAE, 3*(6), 65-83. https://doi.org/10.46296/ig.v3i6.0017

Nair, R.B. Lundin, M., Brandberg, T., Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J. (2015). Dilute phosphoric acid pretreatment of wheat bran for enzymatic hydrolysis and subsequent ethanol production by edible fungi *Neurospora intermedia*. *Ind. Crops Prod., 69*, 314–323. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.038

Nakasaki, K., Kwon, S.H., & Takemoto, Y. (2015). An interesting correlation between methane production rates and archaea cell density during anaerobic digestion with increasing organic loading. *Biomass Bioenerg., 78*, 17–24. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.04.004

Nguyen, T.A.D., Han, S.J., Kim, J.P., Kim, M.S., Oh, Y.K., and Sim, S.J. (2008). Hydrogen production by the hyperthermophilic Eubacterium, *Thermotoga neapolitana*, using cellulose pretreated by ionic liquid. *Int. J. Hydrogen Energy, 33*(19), 5161–5168. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.019

Nosrati, M., Shojaosadati, S.A., Sreekrishnan, T.R., & Mukhopadhyay, S.N. (2004). Inhibition of thermophilic anaerobic digestion of waste food by long chain fatty acids and propionate. *Iran. J. Biotechnol., 2*, 261–268.

Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D., Ditrio, L., & Kasper, L. (2008). F.31. *Bacteroides fragilis* regulates the induction of $FoxP3^{+}CD4^{+}CD25^{+}T_{reg}$ cell populations in peripheral lymph nodes of mice with microflora-depleted guts. *Clin. Immunol., 127*, S53. https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.03.143

Palacio-Barco, E., Robert-Peillard, F., Boudenne, J.L., & Coulomb, B. (2010). On-line analysis of volatile fatty acids in anaerobic treatment processes. *Anal. Chim. Acta, 668*, 74–79. https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.019

Parvez, S., Venkataraman, C., & Mukherji, S. (2008). Toxicity assessment of organic pollutants: reliability of bioluminescence inhibition assay and univariate QSAR models using freshly prepared *Vibrio fischeri*. *Toxicol. In Vitro, 22*(7), 1806–1813. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.07.011. PMID:18701087

Peláez Samaniego, M.R., García Pérez, M.A., Barriga, A., Martí Herrero, J., Montero Izquierdo, A., Meyer, F.D., & García Núñez, J. (2015). Estado de uso de la biomasa para la producción de bioenergía, biocumbustibles y bioproductos en Ecuador. In *Energías Renovables en el Ecuador. Situación Actual, Tendencias y Perspectivas*; Peláez Samaniego, M., Espinoza Abad, J.L., Eds.; Universidad de Cuenca. Gráficas Hernández: Cuenca, Ecuador, 2015; pp. 29–115.

Polprasert, C. (1989). *Organic wastes recycling*. John Wiley & Sons, Chichester, UK. pp. 357 pp.

Poma, P., Usca, M., Polanco, M., Toulkeridis, T., & Mestanza-Ramón, C. (2021). Estimation of Biogas Generated in Two Landfills in South-Central Ecuador. *Atmosphere, 12*, 1365. https://doi.org/10.3390/atmos12101365

Prescott, L.M., Harley, J.P., & Klein, D.A. (1999). *Microbiology*. New York: McGraw-Hill.

Rincón, B., Borja, R., González, J., Portillo, M., & Sáiz-Jiménez, C. (2008). Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue. *Biochem Eng J., 40*, 253–261. https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.12.019

Robles, G., Nair, R.B., Kleinsteuber, S., Nikolausz, M., & Sárvári Horváth, I. (2018). Biogas Production: Microbiological Aspects. In *Biogas: Fundamentals, Process, and Operation*; Tabatabaei, M., Ghanavati, H., Eds.; Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77335-3

Rouxhet, P.G., & Mozes, N. (1990). Physical chemistry of the interaction between attached microorganisms and their support. *Water Sci. Technol., 22*: 1–16. https://doi.org/10.2166/wst.1990.0131

Sam-Soon, P.A., Looewenthal, R.E., Dold, P.L., & Marais, D.V.R. (1988). Pelletization in up-flow anaerobic sludge bed reactors. In *Anaerobic Digestion*. Edited by E.R. Hall and P.N. Hob- son. Pergamon Press, Oxford, UK. pp. 55–60.

Sandoval, A., Santacruz, F., Chuquer, D., & Astorga, D. (2020). Análisis de inóculos microbianos para la optimización de la producción de biogás a partir de fangos residuales. *ALFA Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, 4*(12), 255-284. https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v4i12.88

Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol. Biol. Rev., 61*(2), 262–280. https://doi.org/10.1128/mmbr.61.2.262-280.1997

Schnürer, A., & Jarvis, Å. (2009). *Microbiological Handbook for Biogas Plants*. Swedish Waste Management U2009:03 Swedish Gas Centre Report 207.

Shen, C.F., Kosaric, N., & Blaszczyk, R. (1993). The effect of selected heavy metals (Ni, Co and Fe) on anaerobic granules and their extracellular polymeric substance (EPS). *Water Res., 27*(1), 25–33. https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90191-J

Shigehisa, I., & Takane, K. (1994). *Wastewater treatment with microbial films*. Technomic Publishing Co. Inc.

Smith, A.L., Skerlos S.J., & Raskin, L. (2013). Psychrophilic anaerobic membrane bioreactor treatment of domestic wastewater. *Water Res 47*, 1655–1665. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.028

Speece, R.E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewater*. Archaea Press.

Stuckey, D.C. (2012). Recent developments in anaerobic membrane reactors. *Bioresource Technology, 122*, 137–148. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.138

Taherzadeh, M.J., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol Sci 9*(9), 1621–1651. https://doi.org/10.3390/ijms9091621

Tay, J.-H., He, Y.-X., & Yan, Y.-G. (2000). Anaerobic biogranulation using phenol as the sole carbon source. *Water Environ. Res., 72*(2), 189–194. https://doi.org/10.2175/106143000X137275

Thaveesri, J., Daffonchio, D., Liessens, B., Vandermeren, P., & Verstraete, W. (1995). Granulation and sludge bed stability in up-flow anaerobic sludge bed reactors in relation to surface thermo- dynamics. *Appl. Environ. Microbiol., 61*(10), 3681–3686. https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3681-3686.1995 PMID: 16535149.

Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2000). Spatial organization of microbial biofilms communities. *Microb. Ecol., 40*(2), 75–84. https://doi.org/10.1007/s002480000057 PMID:11029076.

Trzcinski, A.P., & Stuckey, D.C. (2010). Treatment of municipal solid waste leachate using a submerged anaerobic membrane bioreactor at mesophilic and psychrophilic temperatures: analysis of recalcitrants in the permeate using GC-MS. *Water Res 44*, 671–680. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.043

Tuleva, B., Christova, N., Cohen, R., Antonova, D., Todorov, T., & Stoineva, I. (2009). Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56. *Process Biochem., 44*(2), 135–141. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.016

Uyanik, S., Sallis, P.J., & Anderson, G.K. (2002). Improved split feed anaerobic baffled reactor (SFABR) for shorter start-up period and higher process performance. *Water Sci. Technol., 46*(4- 5), 223–230. https://doi.org/10.2166/wst.2002.0592 PMID:12361014.

Van Kuijk, B.L.M., Schlösser, E., & Stams, A.J.M. (1998). Investigation of the fumarate metabolism of the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. *Arch. Microbiol., 169*(4), 346–352. https://doi.org/10.1007/s002030050581. PMID:9531636

Vavilin, V.A., Rytov, S.V., & Lokshina, L.Y. (1996). A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Biores Technol 56*(2), 229–237. https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00034-X

Vera-Loor, J., Anchundia-Vélez, G., & Sccipa-Mendoza, M. (2019). Biogas Production through liquid fermentation of solid waste of pineapple and orange. *Revista Científica Multidisciplinaria Arbitrada YACHASUN, 3*(5), 31-42. https://doi.org/10.46296/yc.v3i5.0018

Vlyssides, A., Barampouti, E.M., & Mai, S. (2008). Granulation mechanism of a UASB reactor supplemented with iron. *Anaerobe, 14*(5), 275–279. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.09.003. PMID:18977307

Vlyssides, A., Barampouti, E.M., & Mai, S. (2009). Influence of ferrous iron on the granulity of a UASB reactor. *Chem. Eng. J., 146*(1), 49–56. https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.05.011

Voicu, G., Dincă, M, Paraschiv, G., & Moiceanu, G. (2015). A review regarding the biogas production through anaerobic digestion of organic waste. *Adv Eng Forum, 13*, 185-193. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AEF.13.185

von Stockar, U., Maskow, T., Liu, J., Marison, I.W., & Patiño, R. (2006). Thermodynamics of microbial growth and metabolism: an analysis of the current situation. *J. Biotechnol., 121*(4), 517–533. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.012. PMID:16185782.

Wallrabenstein, C., Hauschild, E., & Schink, B. (1995). *Syntrophobacter pfennigii* sp. nov., new syntrophically propionate-oxidizing anaerobe growing in pure culture with propionate and sulfate. *Arch. Microbiol., 164*(5), 346–352. https://doi.org/10.1007/ BF02529981

Wang, K., Chang, Z., Ma, Y., Lei, C., Wang, J., Zhu, T., Liu, H., Zuo, Y., & Li, X. (2009b). Study on solvent extraction of propionic acid from simulated discharged water in vitamin B_{12} production by anaerobic fermentation. *Bioresource Technology, 100*, 2878–2882. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.056

Wang, Z., Wang, W., Zhang, X., & Zhang, G. (2009a). Digestion of thermally hydrolyzed sewage sludge by anaerobic sequencing batch reactor. *J. Hazard. Mater., 162*(2-3), 799–803. https://doi.org/10.1016/ j.jhazmat.2008.05.103. PMID:18586392

Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol., 85*, 849–860. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7

Wellinger, A., Murphy, J.D., & Baxter, D. (2013). *The biogas handbook: Science, production and applications*. © Woodhead Publishing Limited, 2013. https://doi.org/10.1533/9780857097415

Westerholm, M., Isaksson, S., Sun, L., & Schnürer, A. (2017). Microbial community ability to adapt to altered temperature conditions influences operating stability in anaerobic digestion. *Energy Procedia, 105*, 895-900. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.408

Westlake, W.S., Horler, D.F., & McConnell, W.B. (1976). The effect of sodium on the fermentation glutamic acid by *Peptococcus aerogenes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 24*, 232–236.

Wilkins, M.R. (2009). Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biomass Bioenergy, 33*(3), 538–541. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.08.010

Wilschut, J., & Hoekstra, D. (1984). Membrane fusion: from liposome to biological membrane. *Trends Biochem. Sci., 9*(11), 479–483. https://doi.org/10.1016/0968-0004(84)90316-5

Wimpenny, J.W.T., & Colasanti, R. (1997). A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol. Ecol., 22*(1), 1–16. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00351.x

Wolf, C. (2013). Simulation, optimization and instrumentation of agricultural biogas plants. Doctoral Dissertation, Department of Electronic Engineering National University of Ireland, Maynooth.

Wong, B.T., Show, K.Y., Lee, D.J., & Lai, J.Y. (2009). Carbon balance of anaerobic granulation process: carbon credit. *Bioresour. Technol., 100*(5), 1734–1739. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008. 09.045. PMID:18990565

Wu, W.M., Jain, M.K., & Zeikus, J.G. (1996). Formation of fatty acid-degrading anaerobic granules by defined species. *Appl. Environ. Microbiol., 62*(6), 2037–2044. https://doi.org/10.1128/aem.62.6.2037-2044.1996 PMID:16535336.

Yang, L., Huang, Y., Zhao, M., Huang, Z., Miao, H., Xu, Z., & Ruan, W. (2015). Enhancing biogas generation performance from food wastes by high-solids thermophilic anaerobic digestion: effect of pH adjustment. *Int Biodeterior Biodegradation, 105*, 153–159. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.09.005

Yu, D., Liu, J., Sui, Q., & Wei, Y. (2016). Biogas-pH automation control strategy for optimizing organic loading rate of anaerobic membrane bioreactor treating high COD wastewater. *Bioresource Technology, 203*, 62–70. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.010

Yu, H.Q., Fang, H.H.P., & Tay, J.H. (2001). Enhanced sludge granulation in up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by aluminum chloride. *Chemosphere, 44*(1), 31–36. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00381-7. PMID:11419756.

Zamanzadeh, M., Hagen, L.H., Svensson, K., Linjordet, R., & Horn, S.J. (2016). Anaerobic digestion of food waste – Effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. *Water Res., 96*, 246–254. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.058

Zhang, C., Su, H., Baeyens, J., & Tan, T. (2014). Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renew. Sustain. Energy Rev., 38*, 383–392. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.038

Zhang, C., Xiao, G., Peng, L., Su, H., & Tan, T. (2013). The anaerobic co-digestion of food waste and cattle manure. *Bioresource Technology, 129*, 170–176. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.138

Zhao, J., Yang, Q., Li, X., Wang, D., An, H., Xie, T., Xu, Q., Deng, Y., & Zeng, G. (2015). Effect of initial pH on short-chain fatty acid production during the anaerobic fermentation of membrane bioreactor sludge enhanced by alkyl polyglycoside. *Int Biodeterior Biodegradation, 104*, 283–289. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.012

Zhong, J., Stevens, D.K., Hansen, C.L. (2015). Optimization of anaerobic hydrogen and methane production from dairy processing waste using a two-stage digestion in induced bed reactors (IBR). I*nt J Hydrogen Energy, 40*, 15470–15476. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.09.085

Ziagova, M., Kyriakou, G., and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2009). Co-metabolism of 2,4-dichlorophenol and 4-Cl-m-cresol in the presence of glucose as an easily assimilated carbon source by *Staphylococcus xylosus*. *J. Hazard. Mater., 163*(1), 383–390. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.102. PMID:18678444

Zuo, Z., Wu, S., Qi, X., & Dong, R. (2015). Performance enhancement of leaf vegetable waste in two-stage anaerobic systems under high organic loading rate: role of recirculation and hydraulic retention time. *Appl Energy, 147*, 279–286. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.03.001

Production of cellulases and xylanases by a new fungal species using green coconut fiber pretreated by steam explosion

Beatriz de Azevedo[1], Stephanie Caroline Bivar Matias[1], Pedro Ferreira de Souza Filho[1,2], Everaldo Silvino dos Santos[1]*

[1]Chemical Engineering Department, Federal University of the Rio Grande do Norte, Av. Sen. Salgado Filho, 3000, 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

[2]Chemical Engineering Department, Federal University of the Pernambuco, Av. dos Economistas, 53, 50740-540, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Autor para correspondencia: *everaldo.santos@ufrn.br*

1. Introduction

The production of enzymes from microorganisms has wide industrial applications, and its demand increases every day, as these biomolecules are more selective and efficient than chemical catalysts. They can act as catalysts in biochemical processes, in the decomposition of complex molecules into smaller units, in the degradation of organic matter to create new products, in food deterioration, and in the pharmaceutical industry, among others (Queiroz & De Sousa, 2020; Rigo *et al.,* 2021).

The global market for industrial enzymes was estimated at around US$ 2 billion in 2004, in 2010 the estimated value rose to US$ 3.3 billion, while in 2017 it reached US$ 7 billion and is expected to reach US$ 10.5 billion. in 2024, which represents an annual growth rate of 5.7% from 2018 to 2024 (BCC Research, 2018; Cerqueira, 2021). In 2021, with the slowdown in the economy due to the coronavirus (SARS-CoV 2) pandemic, the estimate was US$ 6.32 billion, being led by the food segment with about US$ 1.89 billion, according to the BCC. Research – Market Forecasting (BCC Research, 2020; Oliveira & Freitas, 2021). Among the enzymes, lignocellulosic (cellulases and xylanases), lipases, pectinases, and proteases stand out, which are among the main hydrolases with an industrial application (Oliveira, 2019).

On the other hand, the rapid growth of microorganisms and the ease of genetic manipulation has awakened, in industrial and commercial segments, the development of research on enzyme production by microbial routes. Among enzyme-producing fungi and bacteria, filamentous white rot stands out, with a production revenue of US$ 8 billion in the last decade (Fraga *et al.,* 2021). In 2017, it was estimated that about 70% of the enzyme market

share was held by fungal microorganisms, with emphasis on mutant strains of *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, and *Penicillium* sp. (Rigo *et al.,* 2021). Arising from the metabolic interactions that occur between the fungus and the plant species, as they are present inside, filamentous endophytic fungi stand out for the number of natural products that provide bioactive properties and secondary metabolites (Kusari *et al.,* 2012). Thus, endophytic fungal species have a high potential for the production of bio-compounds, highlighting the production of substances with pharmacological, agricultural, and enzymatic potential (Félix, 2019).

The increase in the demand for enzymes is due to their wide variety of uses in the food, feed, pharmaceutical, textile, and biofuel industries and, mainly, in the production of second-generation ethanol, that is, from lignocellulosic residues, also known as ethanol. 2G Unlike first-generation ethanol, which is produced using sugarcane juice or molasses, 2G ethanol can be obtained from sugarcane bagasse or other parts of the sugarcane itself, sugar as the leaves and also from other lignocellulosic biomasses (Tavares, 2019). In this context, green coconut fiber stands out. Brazil is the fourth largest producer of green coconut in the world, producing more than 2 billion units per year (FAO, 2020). Although important products are available on the market for society, such as coconut water and coconut milk, the problem of the final destination of the husk arises, with a high production of waste resulting from this activity. Thus, the use of these materials for the production of products with greater added value, such as enzymes, is important. In addition, it is noteworthy that, for the production of 2G ethanol, one of the fundamental factors for it to be commercially viable is based on the reduction of the production cost of lignocellulosic enzymes (Nogueira, 2017; Silva *et al.,* 2019; Tavares, 2019). In this context, the present study evaluated the potential of the new endophytic fungus *Achaetomium lippiae* URM-7547 in terms of its ability to produce cellulases and xylanases using steam-blasted pre-treated green coconut husk fiber as a substrate.

2. Material and Methods

Microorganism and maintenance

The microorganism used was the new endophytic fungus *Achaetomium lippiae*, identified by Vianna *et al.,* (2017) and deposited in the mycoteca of the Federal University of Pernambuco under the code URM-7547. *A. lippiae* URM 7547 was cultivated following the methodology described by Viana *et al.,* (2017) in a Petri dish containing Potato Dextrose Agar (BDA) medium, being incubated in a BOD-type oven (Biochemical Oxygen Demand, TE-371, Tecnal®) for 7 days at 30°C. Before to plate inoculation, both the plate and the medium were sterilized in an autoclave, which was maintained at 121°C for 15 minutes. After this period, the plates containing the fungus were kept in the refrigerator for a maximum of 90 days, as a way of retarding growth.

Sprinkle in corn on the cob

The sprinkle was performed according to the methodology described by Guilherme *et al.,* (2008). The corn cob used was dried at 65°C for 24 hours in an oven with air circulation (Marconi, MA-035), processed in a mill (Willye, TE-680, Tecnal®) and sieved in a 20 mesh mesh. For inoculation of the microorganism, 10.0 mL

of 0.5% (v/v) Tween 80 solution was transferred to Petri dishes containing the spores and, with the aid of a platinum loop, the middle surface. Thus, 1.0 mL of the spore-containing Tween 80 solution was transferred to a sterile Erlenmyers medium containing 4.6 g of corn cob moistened with 6.0 mL of compound nutrient solution (0.19 mL of monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4), in a concentration of 200 $g.L^{-1}$; 0.025 mL of a mixture containing 40 $g.L^{-1}$ of zinc sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$) and 46 $g.L^{-1}$ of iron sulfate ($FeSO_4$.7H2O); and 50 mL of peptone solution, in a concentration of 56 $g.L^{-1}$). The spores were incubated for five days in BOD (TE-371, Tecnal®) at 30°C, as shown in Figure 1. After the fungi culture period, the Erlenmeyers (Fig. 1b) were kept under refrigeration for a maximum period of up to 3 months and used to obtain the inoculum in the submerged fermentation tests.

Figure 1. Incubation of A. lippiae URM 7547 in corn cob at 30oC. a) First day of incubation. b) Spores grown after five days of incubation.

Obtaining and preparing the raw material

Green coconut was collected as waste from Aquacoco, a coconut water company located in Maxaranguape, in the Rio Grande do Norte, Brazil (Geographical coordinates: -5.5201119166154085, -35.257452458331095). The fibers of the green coconut husks were selected and taken to the Laboratory of Biochemical Engineering at the Federal University of the Rio Grande do Norte (UFRN). In the laboratory, the fibers were washed with tap water to remove residual compounds and dried at 65°C for 72 hours in an air circulation oven (Marconi, MA-035), ground in a mill (Willye, TE-680, Tecnal®), sieved with 20 mesh and stored in plastic containers.

Steam explosion pretreatment

Pretreatment was performed using a steam explosion reactor (14 L, 219 × 280 × 8 mm, UpControl, Brazil). The methodology and operating variables (210°C and 10 minutes of reaction) used were described by Ribeiro *et al.*, (2019). The biomass was added wet to the reactor for a higher yield. After the explosion, the biomass was removed, filtered, washed until the pH of the wash water stabilized at neutral and dried at 60°C in an air circulation oven (Marconi, MA-035) for 24 hours. The dry substrate was submitted to lignocellulosic characterization, to be later used in submerged cultures.

Biomass characterization

The substrates untreated and pretreated by the steam explosion were chemically characterized in terms of moisture content, ash, extractives, cellulose, hemicellulose, and lignin, according to Sluiter *et al.,* (2005a, 2005b, 2008, 2011).

Moisture

Moisture was estimated according to Sluiter *et al.,* (2005a). Thus, 2.0 g of green coconut husk fiber powder were weighed in previously tared porcelain capsules. Then, the material was placed in an oven for 24 hours at 105°C. After this period, the samples were placed in a desiccator until they reached room temperature and weighed again. Moisture was determined in triplicate and calculated according to Eq. (1).

$$\text{Moisture (\%)} = \left(1 - \frac{M_{dry}}{M_{wet}}\right) \text{ x } 100 \qquad \text{(Eq. 1)}$$

M_{dry} (g) is the dry mass of the constant material obtained by the difference between the mass of the set after the oven and the mass of the capsule and M_{wet} (g) is the wet mass obtained by the difference between the mass of the set before being taken to the oven and the mass of the capsule.

Ashes

In the quantification of ash, 2.0 g of green coconut husk fiber powder were weighed in a porcelain crucible. The material was gradually heated in a muffle furnace to 300°C and then calcined at 800°C for two hours. By mass difference, the total ash content was determined according to Eq. (2).

$$\text{Ashes (\%)} = \left(\frac{M_{crucible+ashes} - M_{crucible}}{M_a}\right) \text{ x } 100 \qquad \text{(Eq. 2)}$$

$M_{crucible}$ (g) is the mass of the crucible before the simple is calcined; $M_{crucible+ashes}$ (g) is the mass of the crucible with the ash after calcination and M_a (g) is the mass of the dry sample (dry basis) before calcination.

Extractives

To quantify the extractives, 2.0 g of material were weighed and then subjected to a treatment in a Soxhlet apparatus, using the reagents deionized water and 95% ethyl alcohol, in sequence, at temperatures of 120 and 80°C, respectively, for 24 hours each, using a reagent volume of 70.0 mL.

After the extraction process, the tube containing the material was kept in an oven at 105°C for 24 hours and then weighed. The percentage of extractives was calculated according to Eq. (3).

$$\text{Extractives (\%)} = \left(\frac{M_{tube+extractives} - M_{tube}}{M_{dry}}\right) \text{ x } 100 \qquad \text{(Eq. 3)}$$

$M_{tube+extractives}$ (g) is the mass of the Soxhlet tube with extractives after the extraction; M_{tube} (g) is the mass of the Soxhlet tube before extraction and M_{dry} (g) is the mass of the initial fiber on a dry basis.

Cellulose and Hemicellulose

In the determination of these polysaccharides, 0.3 g of material free of extractives were weighed and transferred to a 125 mL Erlenmeyer flask to which 3.0 mL of H_2SO_4 (72%) were added in a water bath at 30±3°C for 1 h, using a glass rod to stir the mixture every 10 min. The reaction was stopped with the addition of 84.0 g of deionized water, the mixture being carefully stirred. Then, the solution was autoclaved at 121°C and 1.0 atm for 1 h. Assays were performed in triplicate. After the heat treatment, the hydrolyzed material was filtered using dry and previously weighed filter paper. The hydrolyzate was stored in microtubes and stored in a refrigerator for analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). For analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC, the column used was a Shim-pack SCR-101H (300 × 7.8 mm), the mobile phase was a 5.0 mM sulfuric acid solution, temperature of 65°C, 60 min run and refractive index detector. The concentrations of each component were obtained through calibration curves that correlate concentrations of the prepared standards with the respective areas of the chromatograms and the conversion factors, according to Ribeiro *et al.,* (2019).

The solid fraction contained in the filter paper was washed with 100.0 mL of deionized water and dried at 105°C for 24 hours for use in the determination of insoluble lignin present in the material.

Lignin

To determine the insoluble lignin content of the material retained on the filter paper after acid hydrolysis, the residue was transferred with the dry filter paper to a previously weighed porcelain crucible, and the sample was calcined. The calcination temperature was slowly raised to 300°C to avoid the expansion of the material inside the muffle and then maintained at 800°C for another two hours. After this period, the crucible was carefully transferred to a desiccator, where it was kept until it reached room temperature. Then, the mass of the crucible was quantified along with the calcined material. The lignin content in the sample was calculated according to Eq. (4).

$$\text{Lignin (\%)} = \frac{(M_{solids+fpp} - M_{fpp}) - (M_{crucible+ashes} - M_{crucible})}{M_{initial\ material}} \times 100\% \qquad \text{(Eq. 4)}$$

$M_{solids+fpp}$ (g) is the mass of solids with filter paper (dry) after washing; M_{ppf} (g) is the mass of tared filter paper for filtration; $M_{crucible+ashes}$ (g) is the mass of the crucible with ash after calcination; $M_{crucible}$ (g) is the mass of the tared crucible before calcination and $M_{initial\ material}$ (g) is the mass of the fiber (dry) used to make acid hydrolysis.

Submerged cultivation for the production of Cellulases and Xylanases by A. lippiae URM-7547 using coconut fiber pretreated by steam explosion

For submerged cultures, the inoculum preparation was carried out by adding 40.0 mL of a 0.5% (v/v) Tween 80 solution in Erlenmeyer containing the spores of *A. lippiae*

URM-7547 grown on corn cobs. Soon after, the mixture was shaken and the spores were transferred to a sterile 50 mL Falcon tube with the aid of sterile gauze and cotton for spore counting. The quantification of the microorganism present in the suspension was performed using the methodology described by Carvalho *et al.*, (2008). With the aid of a micropipette, 0.1 µL of the spore suspension was transferred to the mirrored Neubauer Chamber for reading under an optical microscope (Olympus, Model BX51). The concentration of spores in the suspension was found using Eq. (5).

$$C_{spores}\left(\frac{spores}{mL}\right) = E \text{ x } 10^4 \text{ x } F_D \qquad \text{(Eq. 5)}$$

E is the average number of spores counted; C_{spores} is the concentration of spores in the suspension; 104 is the transformation of the volume from 0.1 µL to mL, and F_D = dilution factor for counting in the Neubauer Chamber. The volume of spore suspension that was added to the culture medium was adjusted according to Eq. (6).

$$Volume_{Suspension}(mL) = \frac{C_{Inoculum}\,(spores)}{C_{Spores}\left({}^{spores}/_{mL}\right)} \qquad \text{(Eq. 6)}$$

$C_{inoculum}$ is the desired inoculum concentration for cultivation.

Assays of submerged cultures for enzyme production were performed in triplicate and composed of saline solution and substrate (green coconut husk fiber pretreated by the steam explosion at 210°C/10 minutes). These were placed in 250 mL Erlenmeyer and autoclaved at 121°C for 15 minutes. Fermentation was carried out in triplicates for a period of 240 h and 150 rpm of agitation, using 100 mL of medium. After cultivation, the enzyme extract was obtained by filtration through Whatman filter paper. Table 1 illustrates the conditions investigated, in which the influence of temperature, inoculum, and substrate concentration (pretreated coconut fiber) on the production of cellulases and xylanases by the fungus was evaluated.

Table 1. Assays for the production of cellulases and xylanase by *A. lippiae* URM-7547 using coconut fiber pretreated by the steam explosion as substrate

Assays	Temperature (°C)	Inoculum concentration (spores/mL)	Substrate (pretreated coconut fiber) (g/L)
A	28.0	$1.0x10^5$	10.0
B	28.0	$1.0x10^5$	30.0
C	28.0	$1.0x10^9$	10.0
D	28.0	$1.0x10^9$	30.0
E	33.0	$1.0x10^5$	10.0
F	33.0	$1.0x10^5$	30.0
G	33.0	$1.0x10^9$	10.0
H	33.0	$1.0x10^9$	30.0

Enzymatic activities

The enzyme extract after filtration was analyzed for total cellulases (FPase), endoglucanase (CMCase), Cellobiase, and Xylanase activities to evaluate the potential of *A. lippiae* URM-7547 in enzyme production.

Total cellulases (FPase)

FPase activity was analyzed following the procedure described by Ghose (1987) and the dosage of reducing sugars by the modified Miller (1959) methodology. The reaction mixture containing 0.5 mL of enzyme extract, 1.0 mL of sodium citrate buffer solution (50.0 mM, pH 4.8), and Whatman No. 1 filter paper tape measuring 1.0 × 6.0 cm was incubated at 50°C for 60 minutes. After the incubation time and immersion in an ice bath, 0.5 mL of the reaction mixture was transferred to tubes containing 0.5 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) solution, then boiled in a water bath. -maria for exactly 5 minutes. Soon after, the test tube was cooled in cold water and 4.0 mL of distilled water was added. The reading was performed in a spectrophotometer (Thermo Spectronic – GENESYS 10uV) at a wavelength of 540 nm and the concentration was converted into glucose concentration from the calibration curve using glucose as a standard with a range of glucose concentration from 0.89 to 22.30 μmol.mL^{-1}. FPase activity was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1.0 μmol of glucose per minute.

Zero time for determining the initial concentration of reducing sugars in the supernatant was prepared by adding 0.5 mL of the enzyme solution in tubes containing 1.0 mL of sodium citrate buffer solution (50 mM, pH 4.8) and, after stirring, 0.5 mL of this obtained solution was transferred to tubes containing 0.5 mL of DNS reagent, followed by boiling and reading, performed similarly to the methodology of Miller (1959). The blank used to zero the spectrophotometer consisted of a mixture of 0.5 mL of citrate buffer (50 mM, pH 4.8) and 0.5 mL of DNS.

The enzymatic activity of total cellulases (FPase) was expressed in U/mL and calculated following Eq. (7).

$$\text{FPase}\left({}^{\text{U}}/_{\text{mL}}\right) = \frac{\Delta\text{AR x FD x V x } 10^6}{\text{MM}_{\text{glicose}}\text{x t x Vs x } 10^3} \qquad \text{(Eq. 7)}$$

F_D is the dilution factor of the enzymatic extract; 10^3 is the conversión factor from L to mL; 10^6 is the mol para μmol conversion factor; MM is the molar mass of glucose (180 g/mol); t is the reaction time in minutes; V is the total volume of the reaction mixture (mL); V_s is the volume of supernatant (mL) and is the variation of the readings of reducing sugars in the tubes with simple substrate and zero time (g/L).

Endocellulases (CMCase)

The cellulolytic activity of CMCase was analyzed following the procedure described in Ghose (1987), which is based on the ability of the enzymatic extract to release reducing sugars in the presence of carboxymethylcellulose (CMC) due to the hydrolysis of cellulose to glucose.

For analysis, 0.5 mL of the enzyme extract was placed in a test tube with 0.5 mL of a 4.0% (m/v) CMC solution, prepared in sodium citrate buffer (50.0 mM, pH 4.8), at

a temperature of 50°C in a water bath for exactly 10 minutes. After the incubation time and immersion in an ice bath, 0.5 mL of the reaction mixture was transferred to tubes containing 0.5 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) solution, then brought to a boil in a water bath for exactly 5 minutes. Soon after, the test tube was cooled in cold water and 4.0 mL of distilled water was added. The reading was performed in a spectrophotometer (Thermo Spectronic – GENESYS 10uV) at a wavelength of 540 nm and the concentration was converted into glucose concentration from the calibration curve using glucose as a standard with a range of glucose concentration from 0.89 to 22.30 μmol.mL^{-1}. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme capable of releasing the equivalent of 1.0 μmol of glucose per minute.

CMCase was expressed in U/mL and was calculated following Eq. (7).

Cellobiase

Cellobiase activity was analyzed following the procedure described by Ghose (1987) and dosage of reducing sugars by the methodology reported by Miller (1959). For analysis, 1.0 mL of the enzyme extract was placed in a test tube with 1.0 mL of a cellobiose solution (15.0 mM), prepared in sodium citrate buffer (50.0 mM, pH 4.8) at a temperature of 50°C in a water bath for exactly 30 minutes. The determination of glucose concentration was performed using a glucose concentration analysis kit based on the reaction of glucose oxidase and peroxidase enzymes. In this process, glucose is transformed into gluconic acid and hydrogen peroxide by the action of glucose oxidase. The hydrogen peroxide formed, in combination with 4-aminoantipyrine and phenol, is transformed, by the action of peroxidase, into quinonaimine, a compound that shows color. At the end of the reaction, each mole of glucose is converted into one mole of quinonaimine. For this, 10 μL of the reaction mixture was pipetted into test tubes containing 1 mL of the glucose oxidase and peroxidase reagent (BioSystems®). The tubes were incubated for 10 minutes at room temperature (25°C), during which time the enzymatic reaction took place. The color formed is read in the spectrophotometer at 500 nm.

Xylanase

The activity was quantified for endo-β-1,4-xylanase following the procedure described by Ghose (1987) and the dosage of reducing sugars by the methodology proposed by Miller (1959). Thus, 100.0 μL of the enzymatic extract was added to 900.0 μL of the activity solution consisting of a sodium citrate buffer solution (50.0 mM, pH 4.8) containing 1.0% (m/v) of xylan as substrate. The mixture was incubated for 5 minutes at 50°C and the reaction was stopped by adding 1.0 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). The concentration of reducing sugars was quantified according to the DNS method described by Miller (1959). The reading was performed in a spectrophotometer (Thermo Spectronic – GENESYS 10uV) at 540 nm and the concentration was converted into xylose concentration from the analytical curve.

Statistical Analysis

The existence of statistically significant differences between the means of the results obtained in the experiments was determined using the Analysis of Variance test (ANOVA), with a significance level of 0.5%. Results are presented as mean±standard deviation.

3. Results and discussion

Biomass characterization

In the present study, coconut fiber was used, after being pretreated by steam explosion, for the production of cellulases and xylanase. However, initially, the characterization of this residue was carried out. Figure 2 shows the green coconut fiber untreated and after pretreatment with the steam explosion.

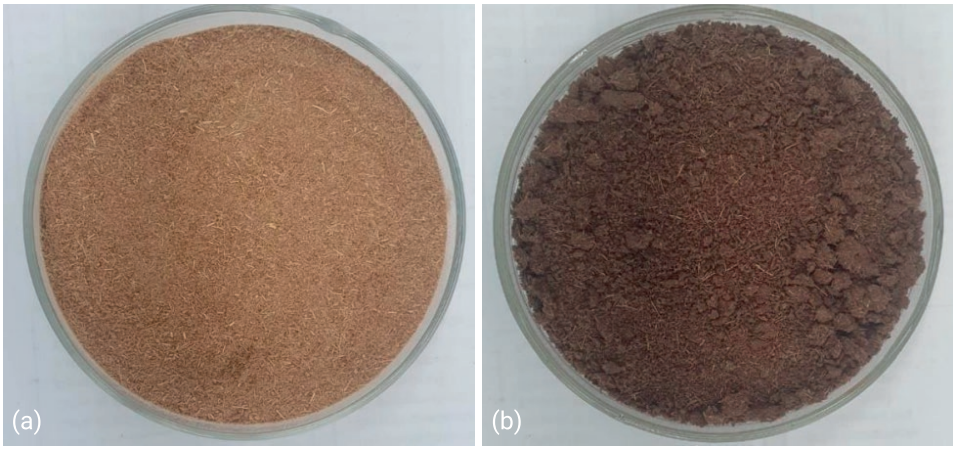


Figure 2. Green coconut fiber untreated. a) and b) after pretreatment with the steam explosion.

Table 2 presents the results obtained in the characterization of coconut fiber untreated and pretreated by steam explosion. When observing the values of mass composition (%) obtained, it is verified that the contents of cellulose and hemicellulose, after the pre-treatment are satisfactory for the enzymatic induction of cellulases and hemicellulases as well as for sources of fermentable sugars aiming at the production of 2G ethanol. The low ash content for the untreated and pretreated sample is advantageous because, according to Pitarello (2013), the high ash content is directly associated with the decrease in the energy potential of the lignocellulosic biomass.

Table 2. Chemical composition of untreated green coconut husk fiber and pretreated by the steam explosion (10 min at 205°C).

Components	Mass composition (%)	
	Untreated	Pretreated
Moisture	6.39±0.31	7.85±0.71
Ashes	3.46±0.27	3.68±0.41
Extractives	19.35±0.93	5.77±0.84
Cellulose	31.71±1.67	39.62±1.23
Hemicellulose	16.45±1.12	10.24±0.78
Lignin	36.05±1.96	34.54±1.55

Steam explosion pretreatment acts mainly by removing hemicellulose, as can be seen in the values presented in Table 2, and consequently, there is an increase in cellulose, since the fiber is exposed, subsequently facilitating the use of this material for industrial purposes involving the use of this carbohydrate. In addition, lignin has a small amount of removal, as it undergoes a rearrangement process and is redeposited. Thus, in a process aimed at the production of second-generation ethanol, its removal takes place in combination with alkaline pretreatment.

Teixeira *et al.,* (2018), when analyzing the efficiency of pretreatment by a steam explosion of coconut mesocarp fiber with different reaction times and temperatures, found values for mass composition (%) of coconut fiber untreated of 45.50; 13.16; 45.44; 0.78 and 2.44% for cellulose, hemicellulose, lignin, ash, and extractives, respectively. In the same condition used in the present study (10 minutes at 205°C), these authors found values for the mass composition of coconut fiber after pretreatment 58.03; 1.55; 48.42; 0.42, and 0.0% for cellulose, hemicellulose, lignin, ash, and extractives, respectively.

Nogueira (2017), studying the evaluation of the use of surfactants in diluted acid and alkaline pretreatments of green coconut husk, found results for the mass composition of untreated green coconut husk of 32.79; 15.97; 35.70; 3.63 and 16.47% for cellulose, hemicellulose, lignin, ash, and extractives, respectively. The values found by Nogueira (2017) were similar to those found in this study.

In the pretreatment with the steam explosion, the autohydrolysis of the biomass occurs through the penetration of the condensed steam inside the fiber, and, soon after the decompression, the fiber of the lignocellulosic biomass occurs (Teixeira *et al.,* 2018). The temperature and reaction time in this type of pretreatment is of paramount importance, since, when these two parameters are changed, there is a change in the final physicochemical and lignocellulolytic mass composition of the biomass. Ribeiro *et al.,* (2019), evaluating the steam explosion pretreatment using green coconut husk as biomass, obtained different results for cellulose, hemicellulose, and lignin when testing three temperatures (140, 175, and 210°C) with 10 minutes of reaction, being them of 29.73, 16.53 and 30.83%, respectively, for 140°C; 30.55, 13.24 and 32.81%, respectively for 175°C; and as the best result, 34.61, 11.29 and 31.69%, respectively, for 210°C.

Evaluation of Cellulases and Xylanases production by submerged fermentation

The production of cellulases and xylanase by *A. lippiae* URM 7547 using submerged fermentation was evaluated by varying the temperature (°C), inoculum concentration (spores/mL), and concentration (g/L) of pretreated green coconut fiber in the steam explosion (210°C, 10 minutes).

Figure 3 shows the kinetic profiles of production of FPase (a), CMCase (b), cellobiase (c), and xylanase (d), respectively. It is noted that there is a similarity between the profiles of FPase and CMCase and cellobiase and xylanase. For FPase and CMCase, the time in which the maximum enzyme activity occurred was between 120-144 h (5-6 days) of fermentation, while for cellobiase and xylanase, the time was shorter, around 96-160 h (4-5 days).

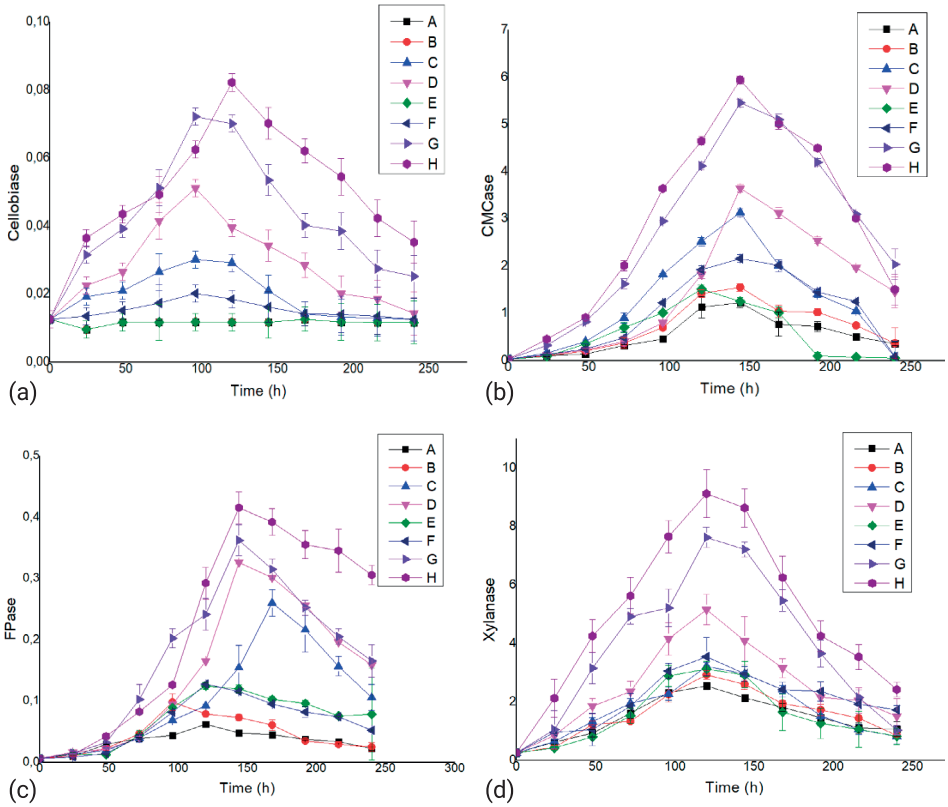


Figure 3. Kinetic profiles of xylanase production by the fungus *A. lippiae* URM-7547 in submerged fermentation using green coconut fiber pretreated by the steam explosion as substrate. a) FPase, b) CMCase, c) cellobias Figure 3. Kinetic profiles of xylanase production by the fungus *A. lippiae* URM-7547 in submerged fermentation using green coconut fiber pretreated by the steam explosion as substrate. a) FPase. b) CMCase. c) cellobiase, and d) xylanase.

According to Rigo *et al.,* (2021), the maximum production time of cellulases and xylanases is directly related to the route that the fungus takes in the lignocellulosic material. With the modified lignin after pretreatment by the steam explosion, the fungus can cross it more easily, coming into contact, firstly, with the hemicellulose present in complex chains of sugars, making it necessary to produce the xylanolytic enzymes before the production of cellulolytic enzymes, thus obtaining a shorter production time for the xylanase.

The best results for FPase and CMCase were those presented in assays G and H, both being significantly equal (p>0.05), with values of 0.36±0.06, 0.41±0.08 U/mL for FPase, respectively; and 5.46±0.48 and 5.94±0.31 U/mL for CMCase, respectively. For cellobiase, the best results were obtained from assays C, D, G and H, which were equivalent (p>0.05) with values of 0.03±0.01, 0.05±0.02, 0.07±0.03 and 0.08±0.04 U/mL, respectively. Regarding xylanase, assay H excelled with an obtained value of 9.12±0.28 U/mL, statistically different from all other assays (p<0.05). It should also be noted that assay H was carried out at 33°C, which is the temperature closest to a plant interior where the endophytes are found. It is reported that a submerged culture was carried out with the condition of assay H, using untreated green coconut fiber as a substrate, however, enzymatic activity (U/mL) was not quantified for any of the four enzymes studied. This result confirms the importance of a pretreatment preceding other fermentation processes for *A. lippiae* URM 7547.

Table 3 presents the results of maximum enzyme activities (U/mL) for FPase, CMCase, cellobiase, and xylanase.

Table 3. Maximum enzymatic activity of FPase, CMCase, cellobiase, and xylanase produced by *A. lippiae* URM-7547 in submerged culture varying the initial conditions of temperature (°C), inoculum concentration (spores/mL), and substrate concentration (g/L).

Assays	T (oC)	[spores/mL]	Substrate (g/L)	FPase (U/mL)	CMCase (U/mL)	Celobiase (U/mL)	Xilanase (U/mL)
A	28.0	1.0x105	10.0	0.06±0.02a	1.23±0.11e	0.01±0.01j	2.54±0.18l
B	28.0	1.0x105	30.0	0.09±0.04a	1.54±0.16e	0.01±0.01j	2.91±0.24m
C	28.0	1.0x109	10.0	0.26±0.14b	3.13±0.25f	0.03±0.01k	3.21±0.30m
D	28.0	1.0x109	30.0	0.32±0.10b	3.65±0.22f	0.05±0.02k	5.15±0.34n
E	33.0	1.0x105	10.0	0.12±0.07c	1.51±0.26g	0.01±0.02j	3.12±0.26m
F	33.0	1.0x105	30.0	0.21±0.08c	2.16±0.34h	0.02±0.01j	3.54±0.32m
G	33.0	1.0x109	10.0	0.36±0.06d	5.46±0.48i	0.07±0.03k	7.62±0.66º
H	33.0	1.0x109	30.0	0.41±0.08d	5.94±0.31i	0.08±0.04k	9.12±0.28p

* The superscript letters represent the results of the Tukey test. Significantly equal results (p>0.05) have the same letter.

The production of enzymes by fungi in submerged cultures is influenced by factors such as type and concentration of substrate (carbon source), nitrogen in the medium, temperatura, and pH. In addition, the fermentation time for enzyme production depends on how easily the fungus degrades the substrate, and lignocellulosic residue, hydrolyzing them into fermentable sugars (Salomão, 2017). For example, Li *et al.,* (2003) used *Chaetomium thermophilum* CT2, isolated in China, for the production, characterization, and purification

of CMCase using submerged fermentation and obtained the best result at 216 hours, 60°C, and pH 4.0; with an enzyme activity of 2.77 U/mL in a medium containing 2% cellulose, 1% starch and 0.4% yeast extract. It should be noted that this value is a little lower than that usually found in the literature for CMCase, and may be related to the concentrations that the authors used for carbon and nitrogen sources.

The species of the genus *Chaetomium* and *Achaetomium* play a variety of biological functions and biotechnological roles in areas such as; medical, taxonomy, molecular studies (Abdel-Azeem *et al.,* 2016; Darwish & Abdel-Azeem, 2020), and biotechnology, in the production of thermotolerant enzymes because they are fungi that reach high operating temperatures (Katapodis *et al.,* 2007; Li *et al.,* 2003; Ramesh & Lonsane., 1989; Wanmolee *et al.,* 2016). According to Abdel-Azeem *et al.,* (2016), the fungus' ability to produce extracellular enzymes makes them ideal candidates for the catalyst and pharmaceutical industry.

Wanmolee *et al.,* (2016) studied the biochemical characterization and synergism of the cellulolytic enzyme system of *Chateomium globosum*. The enzymes were produced by submerged fermentation (30°C, 200 rpm, pH 5.8) in a medium that used 2% (w/v) of microcrystalline cellulose (avicel), 1% (w/v) of fruit bunches of palm trees; 0.1% lactose and 1% soybean meal. The results obtained for FPase, CMCase, cellobiase and xylanase in (U/mL) were 0.40, 15.70, 1.50, and 28.20, respectively, higher than those found in the present, however, it is noteworthy that the medium was completely optimized and favorable to cellulolytic enzymatic growth.

Florencio *et al.,* (2016) studied the effect of submerged fermentation processes, and on enzyme production using sugarcane bagasse pretreated by the steam explosion (1% concentration) and glucose (10 g/L) as substrate and obtained xylanase activities using the *Trichoderma reesei* Rut C30 of 7.9 $U.mL^{-1}$, and using the fungus *Aspergillus niger* A12, the maximum xylanase activities were 7.8 $U.mL^{-1}$. Values for submerged fermentation are lower than those found, for example, for the Q test (Table 3) of the present study.

Al-Kharousi *et al.,* (2015) investigated the production of cellulases with the fungus *Chaetomium sp.* Using submerged fermentation (30°C, 150 rpm, 10^{10} spores/mL) lasting 10 days (240 h). The medium used was a broth containing 10 g/L of carboxymethyl cellulose (CMC) and a common saline medium supplemented with 0.5 g/L of yeast extract. As it was in a medium with commercial CMC, the results obtained were high, reaching approximately 160 U/mL of CMCase in 144 h of fermentation.

Katapodis *et al.,* (2007) used *Chaetomium thermophilum* IMI-291753 to produce xylanase by submerged fermentation (50°C; 200 rpm; pH 5.0) using a simple culture medium with inexpensive ingredients, to reduce the costs of enzyme production. The medium used contained 3.0 g/L KH_2PO_4; 2.0 g/L K_2HPO_4; 0.5 g/L $MgSO_4.7H_2O$; 0.1 g/L of $CaCl_2.2H_2O$; 0.005 g/L $FeSO_4.7H_2O$; 0.0016 g/L of $MnSO_4.4H_2O$; 0.0014 g/L of $ZnSO_4.7H_2O$ and 0.0002 g/L of $CoCl_2.6H_2O$, similarly to the one chosen in the present study, and the carbon sources varied (corn cobs, wheat bran, wheat straw, and beetroot) and nitrogen (yeast extract, corn steep liquor, ammonium phosphate, ammonium sulfate, sodium nitrate, and ammonium nitrate) in an experimental design to optimize the results. The best results obtained by them for xylanase were 9.6±1.3 U/mL using wheat straw as a carbon source and 39.1±1.2 U/mL using sodium nitrate as a nitrogen source.

Regarding temperature, since the H assay (33°C; 10^9 spores/mL; 30 g/L of the substrate) was performed with the highest temperature evaluated, Gomes *et al.,* (2007) comment that one of the most surprising properties of filamentous fungi is their ability to adapt to extreme environments, in which factors such as pH, temperature, pressure, and salt concentration exceed the values considered as standard for most living beings. Temperature influences the function of biomolecules and the maintenance of biological structures. It is noteworthy that, although *A. lippiae* URM-7547 is endophytic, it was isolated from a plant grown in a semi-arid environment (Vianna *et al.,* 2017).

Finally, according to the results presented, the new fungal species, *A. lippiae* URM 7547 shows up as a potential producer of cellulases and, mainly, xylanases.

4. Conclusions

The pretreatment with steam explosion acted on the green coconut fiber, mainly in the removal of 40% of the hemicellulose from the total initial content, leaving the fiber more exposed, and facilitating the fungal attack in the submerged cultivation for the enzymatic production. *A. lippiae* URM 7547 stood out as a good producer of FPase, CMCase, cellobiase, and xylanase, reporting as the best results the values obtained in the Q assay, which were 0.41±0.08, 5.94±0, 31, 0.08±0.04 and 9.12±0.28 U/mL, for the four enzymes respectively, similar to those found in the literature for other fungi such as *Trichoderma* and *Aspergillus*, considered major cellulolytic and xylanolytic producers. *A. lippiae* URM-7547, being endophytic, adapted well to the maximum temperature studied (33°C), which is the temperature closest to the interior of a plant.

5. References

Abdel-Azeem, A.M., Zaki, S.M., Khalil, W.F., Makhlouf, N.A., & Farghaly, L.M. (2016). Anti-rheumatoid activity of secondary metabolites produced by endophytic *Chaetomium globosum*. *Frontiers in Microbiology, 7*, 1477. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01477

Al-Kharousi, M.M., Sivakumar, N., & Elshafie, A. (2015). Characterization of cellulase enzyme produced by *Chaetomium sp.* isolated from books and archives. *EurAsian Journal of BioSciences, 9*, 52-60.

BBC Research (2018). Global markets for enzymes in industrial applications. https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html

BBC Research (2020). Marketing Forecasting - Global markets for enzymes in industrial applications. https://www.bccresearch.com/market- research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html

Carvalho, D.D., Alvess, E., Batista, T.R., Camargos, R.B., Lopes, E.A. (2008). Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. *Brazilian Journal of Microbiology, 39*(4), 792-798. https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000400036

Cerqueira, K.S., Rodrigues, J.R.S., Souza, R.R., & Lobato, A.K.C.L. (2021). Mapeamento das tendências de patenteamento de enzimas celulolíticas/Mapping of cellulolytic enzyme patenting trends. *Brazilian Journal of Development, 7*(7), 65632-65653. https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-032

Darwish, A.M.G., & Abdel-Azeem, A.M. (2020). *Chaetomium* enzymes and their applications. In: *Recent Developments on Genus Chaetomium*. Springer, 241-249. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31612-9_9

Félix, A.P. (2019). Fungos endofíticos em espécies agrícolas de importância econômica. Monografia - Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais-MG.

Florencio, C., Cunha, F.M., Badino, A.C., Farinas, C.S., Ximenes, E., & Ladisch, M.R. (2016). Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged sequencial fermentation process: enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology, 90*, 53-60. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.011

Food and Agriculture Organization (FAO) (2020). Food and agriculture data (FAOSTAT). http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC

Fraga, M.E., Francisco, M.R., Mora, M.A.E., Chacón-Orozco, J.G., & Harakawa, R. (2021). Bioprospecção de *Trichoderma spp*. com potencial enzimático. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, 37*(2), 1-8.

Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulose activities (recommendation of commission on biotechnology IUPAC). *Pure Applied Chemistry, 39*, 257-268. https://doi.org/10.1351/pac198759020257

Gomes, E., Guez, M.A.U., Martin, N., & Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial (revisão)/Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. *Química Nova, 31*(1), 136-145. https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100025

Guilherme, A.A., Pinto, G.A.S., & Rodrigues, S. (2008). Optimization of trace metals concentration on citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 2001. *Food and Bioprocess Technology, 1*, 246-253. https://doi.org/10.1007/s11947-007-0009-y

Katapodis, P., Christakopoulou, V., Kekos, D., & Christakopoulos, P. (2007). Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal, 35*(2), 136-141. https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.007

Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology, 19*(7), 792-798. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004

Li, D.C., Lu, M., Li, Y.L., & Lu, J. (2003). Purification and characterization of an endocellulase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2. *Enzyme and Microbial Technology, 33*(7), 932-937. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00245-X

Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry, 31*(3), 426-428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030

Nogueira, C.C. (2017). Avaliação do uso de tensoativos nos pré-tratamentos ácido e alcalino diluídos da casca do coco verde e quantificação de água na pós-lavagem. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN.

Oliveira, J.P.B., & Freitas, A.L.P. (2021). Immobilized enzymes applied in food technology: a technological prospection. *Revista INGI – Indicação Geográfica e Inovação, 5*(4), 1363-1373. https://doi.org/10.51722/Ingi.v5.i4.165

Oliveira, J.V.G. (2019). Comparação do potencial da enzima lipase frente a catalisadores homogêneos na reação de transesterificação para produção de biodiesel. *Revista Integralização Universitária, 21*, 158-171. https://doi.org/10.31501/1982-9280.2019V13N21p.158-171

Pitarello, A.P. (2013). Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Tese - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

Pitarelo, A.P. (2007). Avaliação da Susceptibilidade do Bagaço e da Palha de Cana-de-Açúcar à Bioconversão via Pré-Tratamento a Vapor e Hidrólise Enzimática. Dissertação de Mestrado-UFPR, Curitiba-PR.

Queiroz, C., & De Sousa, A.C.B. (2020). Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. *Brazilian Journal of Development, 6*(7), 51849-51860. https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-725

Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. (1989). End product profiles of starch hydrolysis by bacterial alpha-amylases at different temperature and pH values. *Biotechnology Letters, 11*(9), 649-652. https://doi.org/10.1007/BF01025276

Ribeiro, V.T., Costa, W.A., Campolina, A.C., Santos, E.S. (2019). Ethanol from green coconut fiber using alkaline combined steam explosion preteatment. *Otimizacion de los processos de extracción de biomassa sólida para uso energético*. *Cuadernos da Red Iberomasa, 1497*, 267-283.

Rigo, D., Gayeski, L., Tres, G.A., Camera, F.D., Zeni, J., Valduga, E., Casian, R.L., Backes, G.T. (2021). Produção microbiológica de enzimas: uma revisão. *Brazilian Journal of Development, 7*(1), 9232-9254. https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-624

Salomão, G.S.B. (2017). Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Energia, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, São Mateus-ES.

Silva, F.S.G., Gomes, W.P.C., Nascimento, D.D. (2019). Avaliação da fermentação de leveduras visando produção de etanol de segunda geração. Bioenergia em Revista: Diálogos, 9(2), 1-27.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, A., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Technical Report NREL/TP-510-42618.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, A., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2011). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Revised Technical Report NREL/TP-510-42618.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2005b). Determination of Ash in Biomass: Technical Report NREL/TP-510-42622.

Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2005a). Determination of Extractives in Biomass: Technical Report NREL/TP-510-42619.

Tavares, A.S. (2019). Os desafios da produção de etanol no Brasil. Monografia - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

Teixeira, G.M., Santana, L.F.S., Alves, Y.A., Campos, L.M.A. (2018). Análise da eficiencia do pré-tratamento por explosão a vapor da fibra do mesocarpo do como. *XVII SEPA – Seminário Estudantil de Produção Acadêmica*. *UNIFACS*, Salvador/BA.

Viana, M.G., Albuq., C.C., Santos, E.S., Bezerra, J.P.D., Paiva, L.M. (2017). *Achaetomium lippiae*. Fungal Planet discription sheets: 625-715, *PERSOONIA, 39*, 282-283.

Wanmolee, W., Sornlake, W., Rattanaphan, N., Suwannarangsee, S., Laosiripojana, N., & Champreda, (2016). Biochemical characterization and synergism of cellulolytic enzyme system from *Chaetomium globosum* on rice straw saccharification. *BMC Biotechnology, 16*(1), 1-12. https://doi.org/10.1186/s12896-016-0312-7

Evaluación de briquetas con residuos de madera de pino en una comunidad indígena mexicana

Mario Morales-Máximo[1], Víctor Manuel Ruiz-García[2,3], Carlos Alberto García Bustamante[4], Borja Velázquez-Martí[5], Omar Masera[2], José Guadalupe Rutiaga-Quiñones[1]

[1]Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia. 58040, México.

[2]Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelia. 58190, México.

[3]Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Ciudad de México. 03940, México.

[4]Escuela Nacional de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelia. 58190, México.

[5]Departamento de Ingeniería Rural y Agroalimentaria, Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n Valencia. 46022, España.

***Autor para correspondencia:** rutiaga@umich.mx

1. Introducción

Actualmente el interés de la población mundial por las nuevas fuentes de energías alternativas renovables que se pueden disponer en cada país de manera local y descentralizada representa una respuesta a la constante del consumo energético desenfrenado y poco sustentable, y es una forma de intentar garantizar el suministro de energía tanto de manera local como de satisfacción de las necesidades energéticas a nivel global (Rai *et al.,* 2022; Arroyo & Miguel, 2020). Así, la apremiante necesidad de nuevas formas de energía ha dado lugar a un rápido desarrollo ecotecnológico y energético a partir de todas las fuentes renovables existentes en el mundo (Aneke & Wang, 2016; Li *et al.,* 2020). Se espera que estos desarrollos conduzcan a importantes avances tecnológicos, que se reflejen en una mayor capacidad de producción de energía limpia, asequible, no contaminate y que además ayude a generar reducciones de costos de producción en beneficio de la población, que en suma contribuyen al cumplimiento de la agenda 2030 (Nunes *et al.,* 2021; Cheba & Bak, 2021). En términos ambientales, existe una creciente demanda de energía y la necesidad de una reducción significativa de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) que en los últimos años ha generado una alta acumulación principalmente

de CO_2, metano, material particulado $PM_{2.5}$ y algunos otros contaminantes, que han dañado severamente al medio ambiente, algunos daños se deben a la quema de combustibles, y algunos otros por las distintas actividades de la población humana (Martins *et al.,* 2019; Morales-Máximo *et al.,* 2022).

Entre los recursos renovables referidos, la biomasa es un combustible que ha tomado mucha importancia en la última década, considerando como un residuo con potencial energético ya que tiene varias ventajas, como su disponibilidad (biomasa residual, forestal y agrícola), su emisión neutra de carbono en la mayoría de los casos donde hay sistemas de manejo sustentables de los recursos naturales, y su fácil combustión para biocombustibles sólidos que la convierten en una fuente de bioenergía que puede coadyuvar a satisfacer la demanda de energía en el futuro (Fan *et al.,* 2021; Popp *et al.,* 2021). Así, la energía aprovechables de cualquier recurso biomásico residual, representa una alternativa de bajo costo por provenir de desechos, y usualmente son de bajo impacto ambiental (Morales-Máximo *et al.,* 2018; Medina-Ríos *et al.,* 2021).

Los residuos maderables derivados de la actividad de elaboración de muebles de madera, por ejemplo, pueden ser una alternativa sostenible de suministro energía principalmente térmica a través de biocombustibles (briquetas), que estos a su vez pueden ser aprovechados de forma local para satisfacer necesidades de energía térmica donde se requiere del suministro de combustibles derivados del bosque. El uso de los residuos maderables transformados en briquetas, podría combatir la tala inmoderada del bosque cuyos recursos forestales son aprovechados como combustibles convencionales en distintas zonas rurales del país (Carrillo-Parra *et al.,* 2020); de esta forma, el aprovechamiento de estos residuos no sólo proporcionaría una opción energética para la satisfacción de necesidades básicas (Dimos *et al.,* 2019; López-Sosa *et al.,* 2020). Estas briquetas derivados de segunda generación pueden ser fabricados a partir de biomasa lignocelulósica o de cultivos leñosos, en su mayoría a partir de residuos o desechos forestales (Ramírez-Ramírez *et al.,* 2021; Rutiaga-Quiñones *et al.,* 2020; Vasco-Correa & Shah, 2019). En este sentido, la presente investigación muestra un caso de estudio en una comunidad rural indígena denominada San Francisco Pichátaro en el estado de Michoacán, México (Figura 1), esta zona se cuenta con gran número de recursos forestales maderables, cuando este son transformados en muebles se generan residuos de pino, principalmente, éste suele ser quemado a la intemperie o puesto a la venta, aunque no es redituable, por lo que esta investigación plantea el uso de este residuo para la elaboración de briquetas validando su factibilidad a partir la determinación de su pertinencia a través de una evaluación del potencial energético actual y disponible por artesano; finalmente se realiza un análisis para comparar energéticamente la competitividad de las briquetas con combustibles locales convencionales.

Figura 1. Ubicación de la Comunidad Indígena de San Francisco Pichátaro.

Esta comunidad pertenece al municipio de Tingambato y a la subregión de la meseta *p´urhépecha*. Forma parte de la Cuenca de Pátzcuaro y se localiza a 19º 34” N y 101º 40” O, a una altitud de 2350 m (Francisco Arriaga *et al.,* 2011).

El bosque de la comunidad está conformado por una gran biodiversidad pese a su deterioro por la tala clandestina, incendios y plagas; en él viven una gran variedad de plantas y animales, muchos en condiciones de endemismo y en peligro de extinción. El bosque está cubierto por varias especies de pino y encino, predominando en el caso de pino las especies cancimbo (*Pinus pseudostrobus*), lacio (*P. montezumae*) y pino chino (*P. leiophylla*); en los encinos el encino avellano (*Quercus rugosa*) y el encino laurelillo (*Q. laurina*) (Francisco Arriaga *et al.,* 2011; Morales-Máximo *et al.,* 2019) (Figura 2).

Figura 2. Panorámica de la Comunidad Indígena y de sus bosques.

En esta comunidad es común usar la leña para cocción y calentamiento de agua en sus hogares (Figura 3).

Figura 3. Ejemplos del uso de la leña en la Comunidad Indígena.

La Figura 4, muestra algunos talleres básicos donde se convierte la madera en muebles artesanales, con la generación de residuos maderables, y es con este que se pude partir o iniciar la producción de briquetas.

Figura 4. Ejemplos de los talleres artesanales en la Comunidad Indígena.

Por otra parte, la comunidad en cuestión cultural y vocación maderable, organiza y lleva a cabo su propia feria o exposición del mueble rústico, donde se exponen y ofertan los muebles elaborados en la comunidad (Figura 5).

Figura 5. Ejemplos de los muebles artesanales y su feria anual en la Comunidad Indígena.

2. Área de oportunidad

2.1 Cuantificación de residuos lignocelulósicos

Se llevó a cabo una cuantificación de los residuos que se generan en los talleres de esta comunidad y los resultados fueron de aproximadamente 5500 kg de viruta y 8440 kg de aserrín base seca, por mes. Esta cantidad de residuos representa una oportunidad para utilizarlos en la elaboración de briquetas que bien pidieran usarse para calentar agua y alimentos o bien para secar madera que se usa para la elaboración de muebles. Ante esto, surgió la necesidad de conocer qué fin tienen actualmente estos residuos, para ello se llevó a cabo un diagnóstico y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

La Figura 6 muestra los resultados del uso final de los residuos maderables, derivados de la elaboración artesanal de muebles en los talleres de la comunidad.

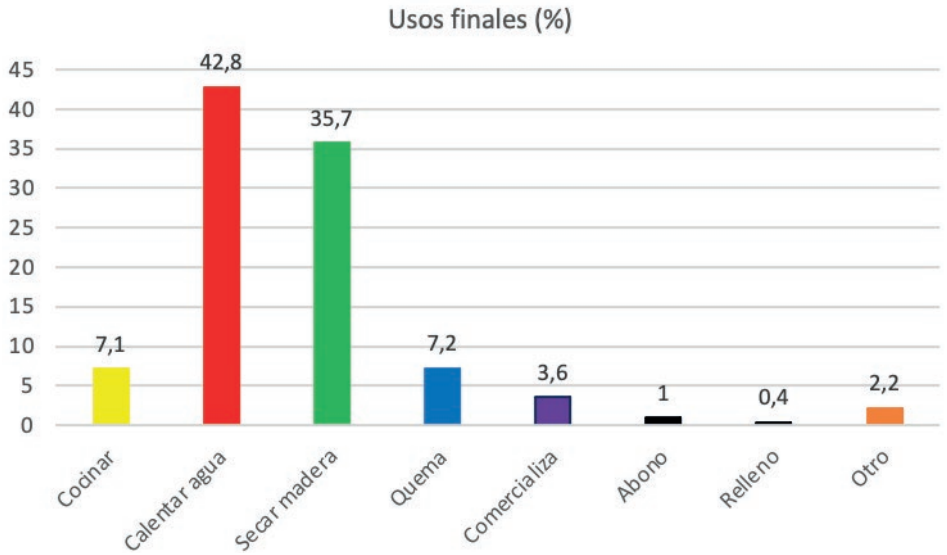


Figura 6. Destino final de los residuos generados en los talleres artesanales.

Como se puede observar (Figura 6), se encontró que los mayores usos corresponden a lo siguiente: 42.8% es para calentar agua, seguido para el secado de madera con 35.7% y la quema a la intemperie con 7.2%.

Ahora bien, para conocer el destino que se le da al residuo maderable que se genera en la comunidad misma, también se aplicó una encuesta y los resultados arrojados se visualizan en la Figura 7.

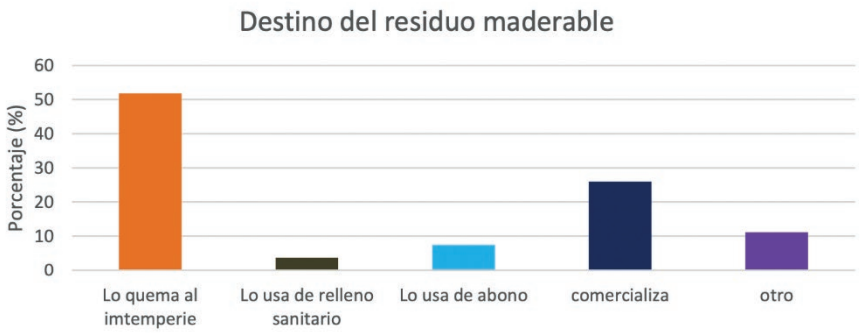


Figura 7. Destino final que tiene el residuo maderable.

Como se puede observar en la Figura 7, el 51% mencionó qué el residuo maderable, ya sea viruta o aserrín, tiene como destino final ser quemado a la intemperie, seguido por la comercialización con un 25%, pero sólo comercializa la viruta, como destinos principales.

Con estos resultados se evidencia el potencial que estos residuos lignocelulósicos tiene para elaborar biomateriales densificados, que pudieran ser utilizado en la comunidad para uso de las tareas de cocinado y calentamiento de agua en los hogares y/o para usarlos en el secado de la madera, que los artesanos usan para la elaboración de los muebles, pero antes surge la necesidad de conocer qué tipo de combustibles y con qué frecuencia. Para ello se aplicó una encuesta y los resultados obtenidos aparecen a continuación.

2.2 Tipos de combustibles usados en las viviendas

La Figura 8 muestra que el combustible más utilizado por semana en cada vivienda para sus diferentes actividades son la leña y el gas LP con 50%, seguido por la leña con un 45% cada semana y sólo el 5% de los encuestados utilizan únicamente gas LP.

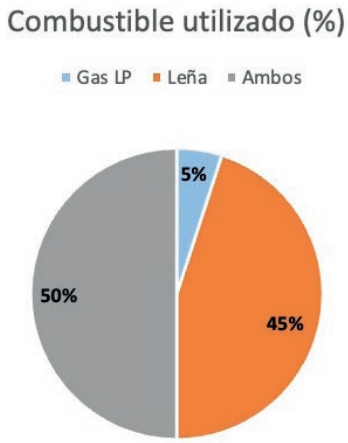


Figura 8. Tipo de combustible usado en las viviendas.

2.3 Tipo de leña que se utiliza en las viviendas

La Figura 9 muestra que la leña de pino es la más utilizada por la población en cada vivienda con 45.45%, seguido por la leña de encino con 33.33%, y por último otros con un 21.21%, que son combustibles derivados de la madera como (astillas, corteza, ramas pedazos que sobran de la fabricación de muebles etc).

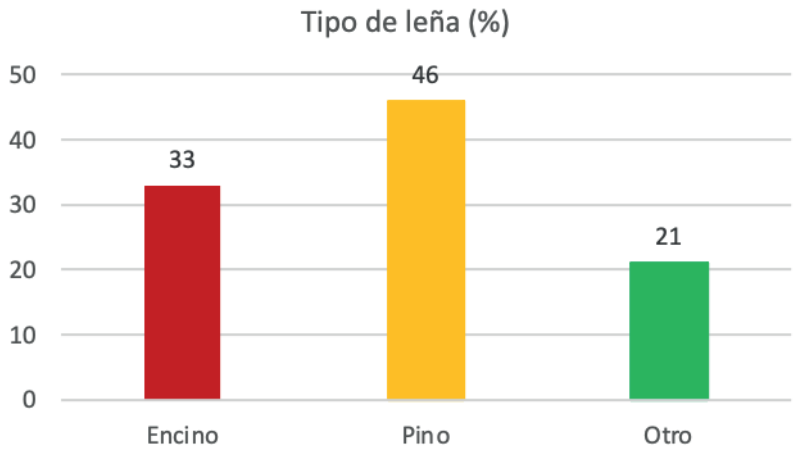


Figura 9. Combustible derivado de la madera más utilizado en las viviendas de la comunidad.

2.4 Obtención de la leña

En este mismo diagnóstico fue también importante conocer la forma de obtención de la leña. La figura 10, muestra que la mayoría de la población obtiene la leña comprándola (50%), la segunda fuente donde la obtienen es cuando se la regalan (29 %) y el resto de la población la extrae de los cerros, para evitar pagar por el servicio (20 %).

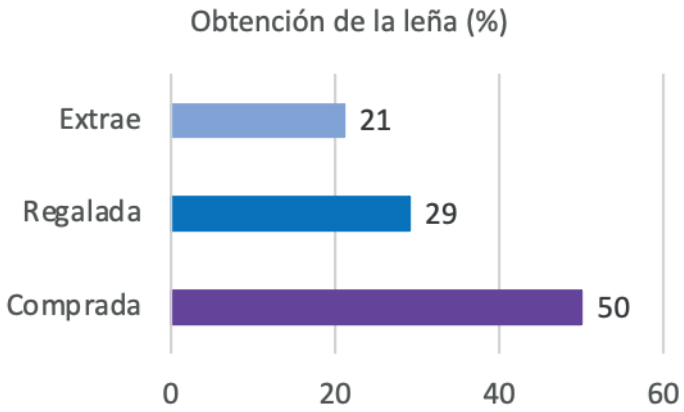


Figura 10. Forma de obtención de la leña para uso cotidiano en las viviendas de la comunidad.

2.5 Frecuencia del uso de la leña

Asimismo, la frecuencia del uso de la leña, los datos de la figura 11, demuestran que la utilización de un determinado combustible en la comunidad es diaria con un 65% es decir que los habitantes por cada vivienda utilizan diariamente la leña para realizar sus diferentes

actividades, sólo el 25% utiliza la leña cada semana para alguna actividad y solamente el 10% utiliza la leña cada mes.

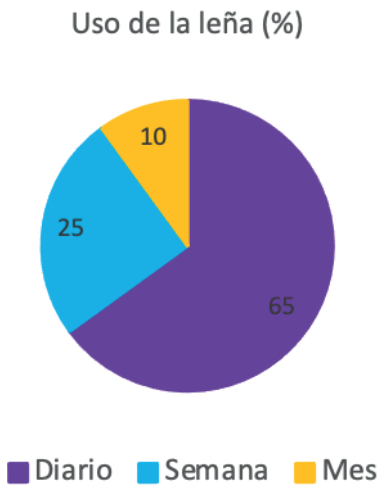


Figura 11. Uso de leña por un periodo de tiempo determinado.

3. Caracterización de los residuos lignocelulósicos

Previo a la elaboración de las briquetas fue necesario llevar a cabo los análisis para caracterizar estos residuos generados en la elaboración de muebles artesanales, que comprendieron lo siguiente: humedad (UNE-EN 14774-1, 2010), densidad a granel (UNE-EN 15103, 2010), análisis proximal (UNE-EN 14775, 2010; UNE-EN 15148, 2010), microanálisis (Arcibar-Orozco *et al.,* 2014), análisis último (Krotz y Giazzi, 2012), poder calorífico (UNE-EN 14918, 2011) y composición química básica (Van Soest *et al.,* 1991).

Los resultados obtenidos para aserrín y (viruta) fueron los siguientes: humedad 18% (67%); densidad a granel 160 k/m^3 (170 k/m^3); análisis proximal: cenizas 0.8% (0.9%), volátiles 82% (92%), carbono fijo 17% (7%); análisis último: carbono 48% (48%), hidrógeno 6% (6%), oxigeno 45% (45%), nitrógeno 0.46% (0.44%), azufre 0.01% (0.01%); poder calorífico 17 MJ/kg (18 MJ/kg).

4. Elaboración de briquetas para cocción o para secar madera

Considerando una concentración óptima para la fabricación de briquetas reportada en la literatura científica (Morales-Máximo *et al.,* 2020) se pudo realizar la fabricación briquetas derivadas de residuos maderables, el resultado por cada extracción de una máquina briqueteadora (Mario Morales-Máximo, 2019) es la obtención de 4 briquetas con dimensiones de

7 a 8.3 cm de longitud por 7.2 cm de diámetro (Figura 12). Para fines de esta investigación produjeron 300 briquetas que comprenden el lote total de estudio.

Figura 12. a) Dimensiones de las briquetas producidas. b) vista isométrica de las briquetas producidas. c) 300 briquetas producidas.

5. Evaluación de las briquetas

5.1 Calentamiento de agua

En el estudio experimental del proceso de combustión de briquetas se emplearon los equipos e instrumentos siguientes: 1 termómetro, 1 cronómetro, 2 recipientes con agua, 2 fogones, 1 encendedor y una cámara termográfica. Las pruebas del proceso de combustión se realizaron en un ambiente donde existía flujo de aire controlado (velocidad <1 m/s), lo contrario perturbaría el encendido de la briqueta e impediría el aprovechamiento eficiente del flujo de calor por convección libre hacia los recipientes con agua. Se colocó 1 kilogramo de cada material en el fogón a un contenido de humedad máximo de 12%. Posteriormente se colocó en la placa de acero inoxidable los recipientes con agua, así mismo para encender cada combustible se utilizó un pedazo de madera resinosa, con un peso aproximado de 80 gramos con una longitud de 10 cm esto como si fuese un aditivo para que los combustibles empezaran a combustionar (Figura 13).

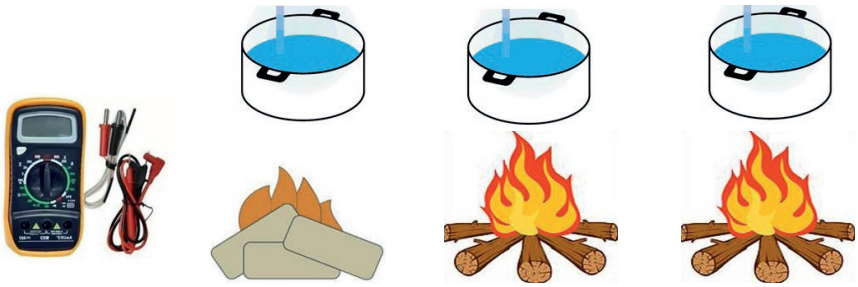


Figura 13. Diseño experimental de la combustión de diferentes combustibles.

5.2 Prueba de cocción de tortillas

La prueba de cocinado controlado (CCT) se utiliza para determinar diversos parámetros de rendimiento mediante la preparación de alimentos típicos de una región en específico. Para esta prueba se realizó la produccion de tortillas utilizando briquetas, utilizando una estufa Patsari, con 3 kg de masa para producir tortillas; las pruebas CCT se realizaron en una cocina simulada en la comunidad de San Fco. Pichátaro, Michoacán, México. Para estas pruebas de CCT se tuvo apoyo de una cocinera de la misma comunidad quien elaboró las tortillas utilizando la técnica cotidiana para cocinar en su hogar. El tipo de combustible que se utilizó fue las briquetas producidas para esta investigación en promedio 2 Kg usando una báscula digital para cuantificar el peso del combustible. Además, se utilizaron 80 g de ocote (resina de pino) como iniciador del fuego en la estufa. El promedio del contenido de humedad en el combustible fue de 12 ± 1%. El procedimiento de cocinado de las tortillas se describe en la figura 14, y la satisfacción de la persona que elaboró la tortillas fue total.

Figura 14. Coocción de tortillas utilizando briquetas.

El uso de las briquetas elaboradas con estos residuos derivados de la elaboración de muebles para utilizarlas en el proceso de secado de la madera en los talleres de la comunidad está aún en desarrollo, y a la fecha solamente se han llevado a cabo experimentos previos de secado, pero que son comprometedores para alcanzar el propósito de poder emplearlas como combustible alterno para el proceso de secado de la madera.

6. Conclusiones

Se ha encontrado que el aserrín y viruta es un residuo que puede ser utilizado para elaborar briquetas. El uso de este residuo incrementa el potencial de aprovechamiento de los biocombustibles sólidos densificados reduciendo los impactos al ambiente. Se puede realizar la fabricación de este biocombustible a través de métodos asequibles y de bajo costo, además de que el desempeño de estos es óptimo para actividades básicas de cocción en el sector residencial, principalmente rural.

Finalmente, estos biocombustibles son potencialmente escalables y pueden derivar en una línea de producción, que incentive la generación de valor agregado a desechos maderables, generación de empleos y promoción de fuentes renovables de energía.

7. Referencias

Aneke, M., & Wang, M. (2016). Energy storage technologies and real life applications – A state of the art review. *Applied Energy*, *179*, 350–377. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.06.097

Arcibar-Orozco, J.A., Josue, D.B., Rios-Hurtado, J.C., & Rangel-Mendez, J.R. (2014). Influence of iron content, surface area and charge distribution in the arsenic removal by activated carbons. *Chemical Engineering Journal*, *249*, 201–209. https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.096

Arroyo, F.R.M., & Miguel, L.J. (2020). The role of renewable energies for the sustainable energy governance and environmental policies for the mitigation of climate change in ecuador. *Energies*, *13*(15). https://doi.org/10.3390/en13153883

Carrillo-Parra, A., Contreras-trejo, J.C., Pompa-García, M., Pulgarín-Gámiz, M.Á., Rutiaga-Quiñones, J.G., Pámanes-Carrasco, G., & Ngangyo-Heya, M. (2020). Agro-Pellets from Oil Palm Residues/ Pine Sawdust Mixtures: Relationships of Their Physical, Mechanical and Energetic Properties, with the Raw Material Chemical Structure. *Applied Sciences*, *10*(6383), 18. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app10186383

Cheba, K., & Bak, I. (2021). Environmental production efficiency in the european union countries as a tool for the implementation of goal 7 of the 2030 agenda. *Energies*, *14*(15). https://doi.org/10.3390/en14154593

Dimos, K., Paschos, T., Louloudi, A., Kalogiannis, K.G., Lappas, A.A., Papayannakos, N., Kekos, D., & Mamma, D. (2019). Effect of various pretreatment methods on bioethanol production from cotton stalks. *Fermentation*, *5*(1), 1–12. https://doi.org/10.3390/fermentation5010005

Fan, Y. Van, Romanenko, S., Gai, L., Kupressova, E., Varbanov, P.S., & Klemeš, J.J. (2021). Biomass integration for energy recovery and efficient use of resources: Tomsk Region. *Energy*, *235*. https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.121378

Francisco Arriaga, F., Guerrero García Rojas, H., Kido Cruz, A., & Cortés Zavala, M. (2011). Ingreso generado por la recolección de recursos forestales en Pichátaro, Michoacán, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, *8*(1), 107–117.

Krotz, L. & Giazzi, G. (2012). Characterization of pharmaceutical products by the c. Thermo Fischer Scientific, Milan, Italy. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN-42192-OEA-CHNS-Pharmaceuticals-AN42192-EN.pdf

Li, J., Liu, P., & Li, Z. (2020). Optimal design and techno-economic analysis of a solar-wind-biomass off-grid hybrid power system for remote rural electrification: A case study of west China. *Energy*, *208*, 118387. https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.118387

López-Sosa,L.B.,Alvarado-Flores,J.J.,Corral-Huacuz,J.C.,Aguilera-Mandujano,A.,Rodríguez-Martínez, R.E., Guevara-Martínez, S.J., Alcaraz-Vera, J.V., Rutiaga-Quiñones, J.G., Zárate-Medina, J., Ávalos-Rodríguez, M.L., & Morales-Máximo, M. (2020). A prospective study of the exploitation of pelagic sargassum spp. As a solid biofuel energy source. *Applied Sciences (Switzerland)*, *10*(23), 1–17. https://doi.org/10.3390/app10238706

Martins, F., Felgueiras, C., Smitkova, M., & Caetano, N. (2019). Analysis of fossil fuel energy consumption and environmental impacts in european countries. *Energies*, *12*(6), 1–11. https://doi.org/10.3390/en12060964

Medina-Ríos, E., Morales-Máximo, M., López-Sosa, L.B., Aguilera-Mandujano, A., & Corral-Huacuz, J.C. (2021). Life cycle analysis (LCA) of the production of wood waste briquettes from Pinus spp.: Case study San Francisco Pichátaro, México. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *912*(1), 0–7. https://doi.org/10.1088/1755-1315/912/1/012011

Morales-Máximo, M., Castro Sánchez F.J, & Rutiaga-Quiñones, J. (2019). Estudio socioeconómico para la evaluación de biocombustibles sólidos: eficiencia energética y alterna en la comunidad de San Francisco Pichátaro, Michoacán, México. *INTERNATIONAL ENERGY CONFERENCE: IEC*, *2*(2448–5624), 577–582. https://www.researchgate.net/publication/341725718_Estudio_socioeconomico_para_la_evaluacion_de_biocombustibles_solidos_eficiencia_energetica_y_alterna_en_la_comunidad_de_San_Francisco_Pichataro_Michoacan_Mexico

Morales-Máximo, M., Ruíz-García, V.M., López-Sosa, L.B., & Rutiaga-Quiñones, J. (2020). Exploitation of Wood Waste of Pinus spp for Briquette Production: A Case Study in the Community of San Francisco Pich á taro, Michoac á n, Mexico. *Applied Sciences*, *10*(8), 2933. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app10082933

Morales-Máximo, Mario. (2019). Aprovechamiento del aserrín y viruta de pino (Pinus spp) para la producción y evaluación de briquetas, como energía alterna en la comunidad de San francisco Pichátaro, Michoacán [Universidad Michoacana de San Nicólas de Hidalgo]. In *Universidad Michoacana de San Nicólas de Hidalgo*. https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.17.58151

Morales-Máximo, Mario, López-Sosa, L.B., & Rutiaga-Quiñones, J.G. (2018). Evaluación termografíca de la combustión de briquetas con aglomerante variable de residuos maderables de pino: Análisis comparativo en fogones tradicionales del estado de Michoacán. *Semana Nacional de Energía Solar*, *XVLL*(2448–5543), 439–444.

Morales-Máximo, Mario, Rutiaga-Quiñones, J.G., Masera, O., & Ruiz-García, V.M. (2022). Briquettes from Pinus spp. Residues: Energy Savings and Emissions Mitigation in the Rural Sector. *Energies*, *15*(9), 3419. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/en15093419

Nunes, L.J.R., Matias, J.C.O., Loureiro, L.M.E.F., Sá, L.C.R., Silva, H.F.C., Rodrigues, A.M., Causer, T.P., Devallance, D.B., & Ciolkosz, D.E. (2021). Evaluation of the potential of agricultural waste recovery: Energy densification as a factor for residual biomass logistics optimization. *Applied Sciences (Switzerland)*, *11*(1), 1–23. https://doi.org/10.3390/app11010020

Popp, J., Kovács, S., Oláh, J., Divéki, Z., & Balázs, E. (2021). Bioeconomy: Biomass and biomass-based energy supply and demand. *New Biotechnology*, *60*(October 2020), 76–84. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.10.004

Rai, A.K., Al Makishah, N.H., Wen, Z., Gupta, G., Pandit, S., & Prasad, R. (2022). Recent Developments in Lignocellulosic Biofuels, a Renewable Source of Bioenergy. *Fermentation*, *8*(4). https://doi.org/10.3390/fermentation8040161

Ramírez-Ramírez, M.A., Carrillo-Parra, A., Ruíz-Aquino, F., Pintor-Ibarra, L.F., González-Ortega, N., Orihuela-Equihua, R., Carrillo-Ávila, N., Luján-Álvarez, C., & Rutiaga-Quiñones, J.G. (2021). Valorization of Briquettes Fuel Using Pinus spp. Sawdust from Five Regions of Mexico. *BioResourcesresourses*, *16*(2), 2249–2263. https://doi.org/10.15376/biores.16.2.2249-2263

Rutiaga-Quiñones, J.G., Pintor-Ibarra, L.F., Orihuela-Equihua, R., González-Ortega, N., Ramírez-Ramírez, A., Carrillo-Parra, A., Carrillo-Ávila, N., Navarrete-García, M.A., Ruíz-Aquino, F., Rangel-Mendez, J. os. R., Hernández-Solís, J.J., & Lujaán-Álvarez, C. (2020). Characterization of Mexican Waste Biomass Relative to Energy Generation. *BioResources*, *15*(4), 8529–8553. https://doi.org/10.15376/biores.15.4.8529-8553

UNE-EN 14774-1 (2010). Determinación del contenido de humedad. Método de secado en estufa. Parte 1: humedad total. Asociación Española de Normalización y Certificación. 10 p.

UNE-EN 14775 (2010). Método para la determinación de cenizas. Determinación de la densidad a granel. Asociación Española de Normalización y Certificación. 10 p.

UNE-EN 14918 (2011). Determinación del poder calorífico. Asociación Española de Normalización y Certificación. 60 p.

UNE-EN 15103 (2010). Determinación de la densidad a granel. Asociación Española de Normalización y Certificación. 13 p.

UNE-EN 15148 (2010). Determinación del contenido de materias volátiles. Asociación Española de Normalización y Certificación. 13 p.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.,* 74(10), 3583-3597. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2

Vasco-Correa, J., & Shah, A. (2019). Techno-economic bottlenecks of the fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Fermentation*, *5*(2). https://doi.org/10.3390/fermentation5020030

Potencial de la biomasa tropical con fines energéticos caso Colombia

Luz Stella Cadavid-Rodríguez

Departamento de Ingeniería, Facultad de Ingeniería y Administración, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 32 No 12-00, Palmira, Colombia.

***Autor para correspondencia:** lscadavidr@unal.edu.co

1. Introducción

Actualmente, hay una urgente necesidad de reducir las emisiones atmosféricas y evitar los peores efectos del cambio climático. La respuesta que se requiere es una rápida y efectiva transición energética basada en energías renovables, dentro de las cuales la bioenergía se reconoce como clave. Sin embargo, el uso de biomasas tradicionales debe reducirse al mínimo para darle paso a las biomasas modernas, aquellas provenientes de residuos sólidos, agrícolas y forestales. Colombia por sus condiciones tropicales y de biodiversidad, presenta condiciones muy favorables para el crecimiento rápido de la biomasa, cuenta con una importante generación de biomasa residual del sector agropecuario, así como con una producción sostenida de residuos orgánicos municipales. A pesar de éste importante potencial todavía es muy incipiente el aprovechamiento de biomasa residual en el país con fines energéticos. Desde la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira se aporta a la investigación en este campo, generando conocimiento en la producción de biogás a partir de residuos orgánicos, con el fin de impulsar su implementación. Uno de los sustratos evaluados fue el residuo de la pesca artesanal del municipio de Tumaco (Colombia), el cual presentó un potencial de metano de 464.5 NL CH4/kg SV. Si las 1500 ton/año de residuos de pesca artesanal que se generan en Tumaco, se pudieran aprovechar para producir biogás, sería posible suplir las necesidades de cocción de alrededor de 600 familias. Para continuar avanzando en la implementación del uso energético de biomasas residuales en Colombia, es muy importante fortalecer la investigación y contar con el compromiso de la industria y las entidades estatales.

1.1 Biomasa en el contexto global de la bioenergía

El cambio climático es uno de los mayores desafíos que enfrenta actualmente la humanidad, es claro que se requieren acciones globales radicales e inmediatas para cumplir con el objetivo de mantener la temperatura del planeta en niveles seguros (escenario 1,5°C). El camino más realista para evitar los peores efectos del cambio climático es una transición energética basada en energías renovables.

Por lo tanto, en todas las regiones del mundo se deben ampliar todos los tipos de capacidad de generación de energía renovable (Figura 1). De acuerdo con IRENA (2022b), Asia, América del Norte y Europa deberán contar con más del 80 % de las instalaciones para 2030. Asia necesita incrementar cuatro veces su capacidad instalada actual, para alcanzar más de 5400 GW para 2030; mientras que América del Norte y Europa tendrán que aumentar las instalaciones por cinco y tres veces, respectivamente. Los incrementos requeridos en la capacidad renovable son aún mayores para Oriente Medio y África.

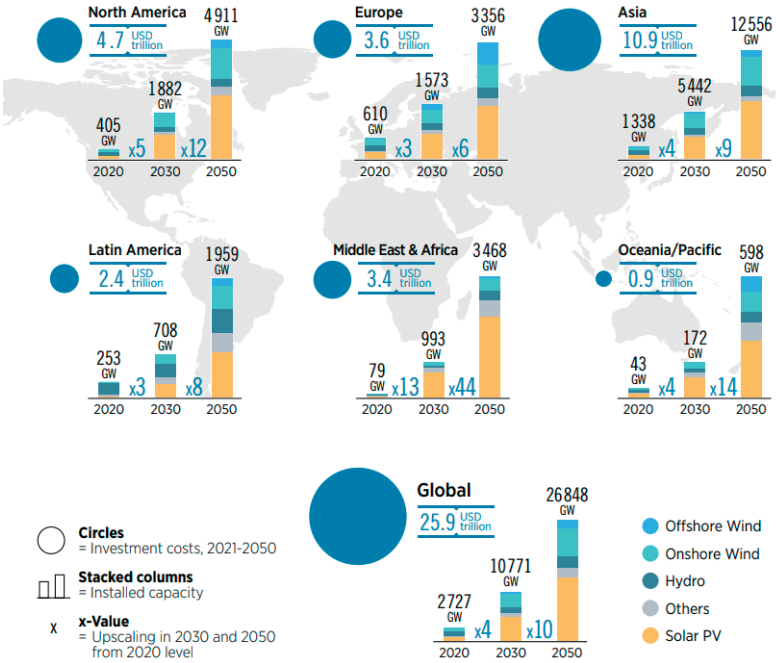


Figura 1. Distribución regional de la capacidad instalada total (GW) en 2020, 2030 y 2050 e inversiones acumuladas (billones de USD) de energías renovables para la generación de energía en el escenario de 1,5°C en todas las regiones, 2021-2050.
Fuente: IRENA, 2022b.

Aunque la energía solar y la procedente del viento jugarán unos papeles importantes en el cumplimiento de la meta climática de 1,5°C, sin duda la bioenergía tendrá también un papel clave. De hecho, el uso de biomasa con fines energéticos ha tomado gran interés en los últimos años, dado que es un recurso renovable y puede reemplazar el uso de combustibles fósiles. En este sentido, IRENA (2022b) establece que, como una de las acciones decisivas para reducir las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI), la cantidad de biomasa aprovechada para suministrar bioenergía y productos bioquímicos debería aumentar considerablemente en los próximos años. Sin embargo, recalca que este aumento debe ser sostenible ambiental, social y económicamente.

Las fuentes principales de biomasa se clasifican en 4 categorías: cultivos energéticos, residuos y subproductos agrícolas, residuos forestales y los subproductos de la industria y los desechos pos-consumo (Figura 2).

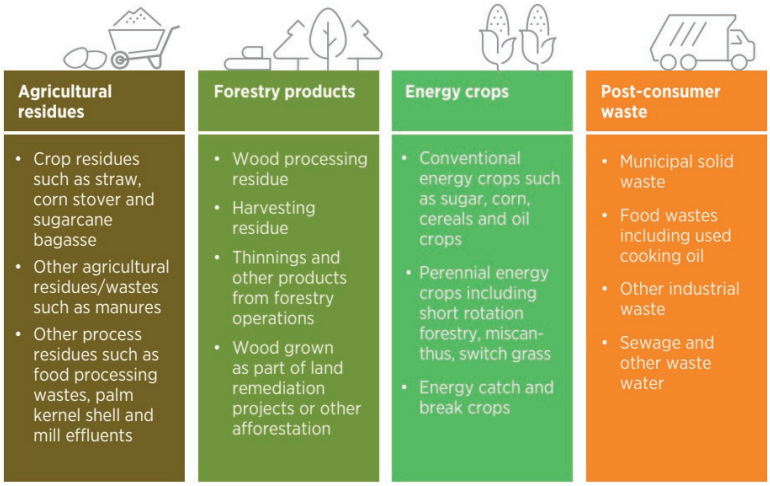


Figura 2. Fuentes convencionales de biomasa para la Bioeconomía.
Fuente: IRENA, 2022b.

Actualmente, la bioenergía ya se constituye como una fuente de energía importante a nivel mundial, proporcionando alrededor del 55% de la energía renovable y sobre el 9% de la demanda mundial de energía en 2019 (55 EJ) (IEA, 2022; IRENA, 2022b). No obstante, más del 50 % de la bioenergía que se utilizó en 2020 se obtuvo de biomasa tradicional, que usualmente se quema para cocinar y calentar (Figura 3), prácticas que son insostenibles, ineficientes, contaminantes y vinculadas a 5 millones de muertes prematuras solo en 2021 (IEA, 2022).

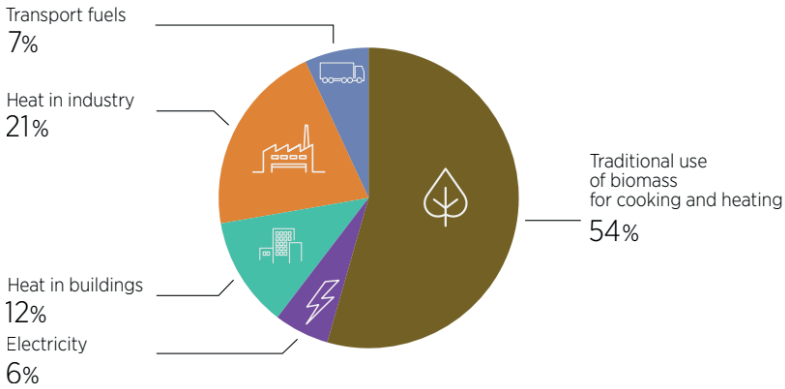


Figura 3. Porcentaje del consumo global de bioenergía de acuerdo al uso final, 2020.
Fuente: IRENA, 2022a.

Con el fin de cumplir con el escenario de limitar el aumento de temperatura de la tierra a 1,5 °C para 2050, se estima que el suministro de biomasa deberá casi duplicarse para 2030, de 55 EJ a 99 EJ, y aumentar a 153 EJ para 2050 (IRENA, 2022b) (Figura 4). Esto implica una drástica reducción en el uso de la biomasa tradicional y un aumento significativo de la biomasa moderna, cuyos niveles actuales de 30 EJ deberán multiplicarse por un factor de alrededor de 3.5 para 2030 y de más de 5 para 2050.

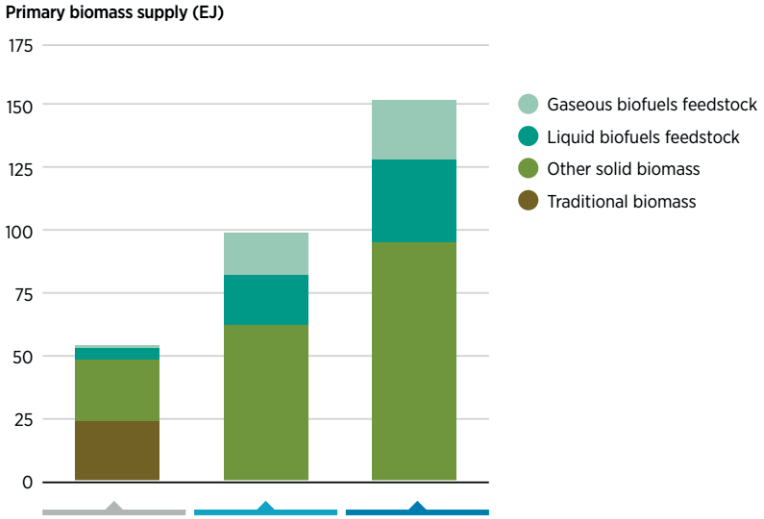


Figura 4. Suministro de biomasa primaria en el escenario de 1,5°C.
Fuente: IRENA, 2022b.

La mayor expansión en el crecimiento del uso de la biomasa moderna, se necesita en el suministro de biocombustibles sólidos provenientes de la industria de la madera, los residuos forestales y agrícolas, así como los residuos sólidos. También es necesario que se amplíe el suministro de materias primas para biocombustibles líquidos y gaseosos. Todo esto implicará un desafío importante para el sector de la bioenergía en los próximos años.

1.2 Potencial energético en Colombia

Se sabe que la demanda de energía de un país está asociada al crecimiento económico del mismo. En el caso de Colombia, es uno de los países de Latinoamérica que ha presentado uno de los mejores niveles de recuperación y crecimiento económico luego de la pandemia, y se prevé que será así durante los próximos años (Figura 5). Entre las principales economías Latinoamericanas, Colombia tiene la mejor previsión de crecimiento por encima del promedio de la economía mundial, la Eurozona y el promedio de Latinoamérica.

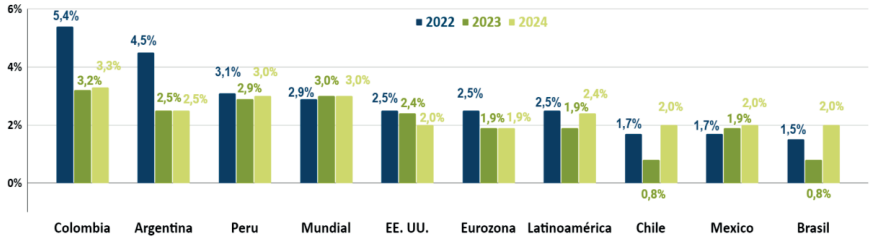


Figura 5. Revisión Previsiones Crecimiento PIB, junio 2022.
Fuente: Banco Mundial. 2022.

De la mano del crecimiento económico, la demanda de energía en Colombia aumenta cada año. Por ejemplo, se estima que la demanda de energía eléctrica tendría un crecimiento promedio anual en el escenario medio entre el 2,21% a 3,38%, para el período 2022-2036 (Figura 6); y la demanda de gasolina un crecimiento promedio anual esperado de 1,28%, entre 2022 y 2035 (Figura 7).

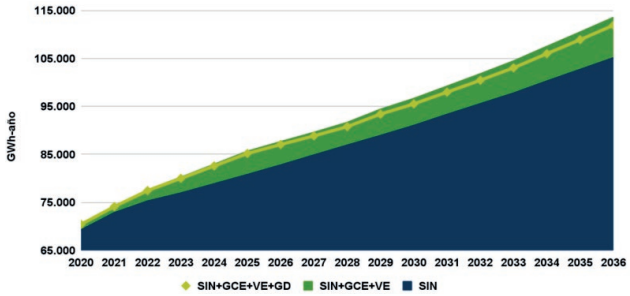


Figura 6. Proyección de demanda de energía eléctrica en Colombia. Sistema Interconectado (SIN), demandas de consumidores especiales (GCE), vehículos eléctricos (VE), generación distribuida (GD).
Fuente: UPME. 2022.

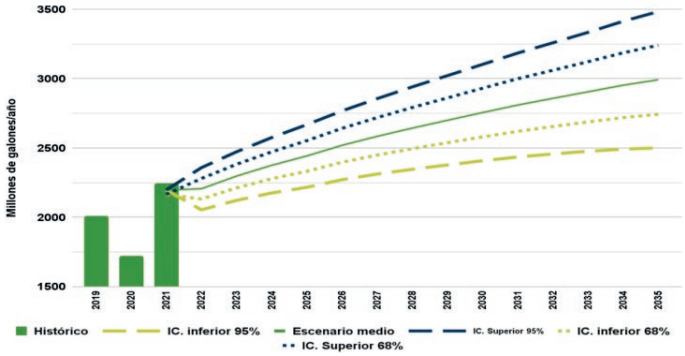


Figura 7. Proyección de demanda de gasolina, 2022-2035.
Fuente: UPME. 2022.

Por otra parte, la producción de residuos sólidos en Colombia viene aumentando a un ritmo promedio del 5%, entre los años 2015 a 2019, con una producción total de 26,46 millones de toneladas para el año 2019, contabilizando los residuos sólidos (85,3%) y los productos residuales (14,7%) (DANE, 2021). Entre los residuos sólidos municipales, se observa que el tipo de residuo mayoritario es el orgánico, 65% (Figura 8) y que, debido a la falta de sistemas adecuados de separación en la fuente y aprovechamiento, la mayoría de éstos residuos se envían a rellenos sanitarios (Figura 9), donde generan emisiones de GEI y lixiviados, los cuales son contaminantes, difíciles y costosos de tratar.

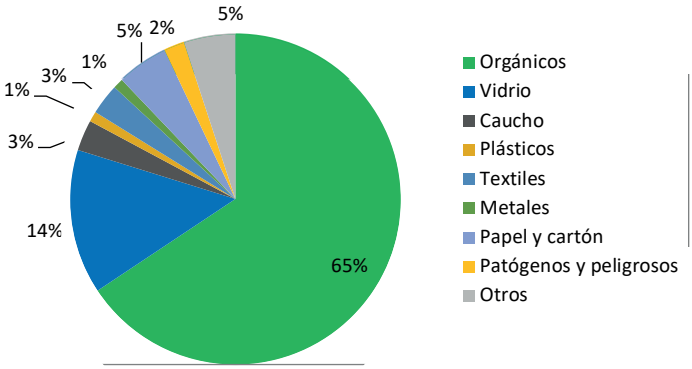


Figura 8. Tipo de residuos sólidos municipales en Colombia.
Fuente: Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios, 2015.

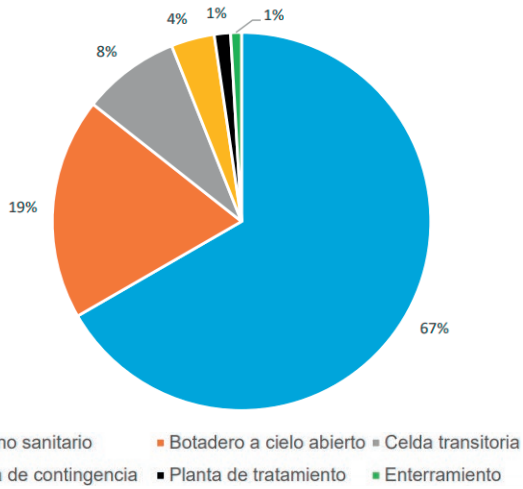


Figura 9. Distribución de sistemas de disposición final en Colombia, 2017.
Fuente: Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios, 2018.

Adicionalmente, dado que Colombia es un país tropical y de vocación agraria, genera importantes cantidades de biomasa residual proveniente de actividades agrícolas, pecuarias, agroindustriales y forestales. Un estudio reciente que evaluó el potencial de gasificación en Colombia, concluyó que el potencial energético de gasificación de varias biomasas actualmente en desuso en Colombia es muy significativo (Pérez-Rodríguez et al, 2022). De hecho, los autores reportan que el 92,51 % de la demanda eléctrica del país podría satisfacerse, así como hasta el 17,6 % de su demanda total de energía, a través de la gasificación.

Otra de las formas de energía renovable que vale la pena explorar es el biogás, pues junto al biometano se constituyen en renovables claves para remplazar los combustibles fósiles, además de ser una alternativa ambientalmente segura para la gestión y aprovechamiento de residuos orgánicos. En el año 2017 se presentaron los resultados de un estudio comisionado por la Unidad de Planeación Minero-Energética (UPME) de Colombia y desarrollado por la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (Figura 10) (UPME/UNAL, 2017). En ese estudio se seleccionaron los principales sectores productivos que generan biomasa residual susceptible a Digestión Anaerobia (DA) y se encontró un potencial teórico de biogás en las biomasas estudiadas de 149.436 TJ/año. Sin embargo, el potencial técnico, es decir, el proveniente de la biomasa que efectivamente puede ser recolectada y sometida al proceso de DA, es de 53.554 TJ/año. Con lo cual, teniendo en cuenta que la oferta de gas natural en Colombia es de 170.705 TJ y la demanda está en 219.045 TJ, el potencial técnico encontrado podría suplir alrededor del 25% de esta demanda. Adicionalmente, se priorizaron 6 biomasas residuales para producir biogás en el país: avícola, porcícola, palma de aceite, caña de azúcar, residuos sólidos y lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR).

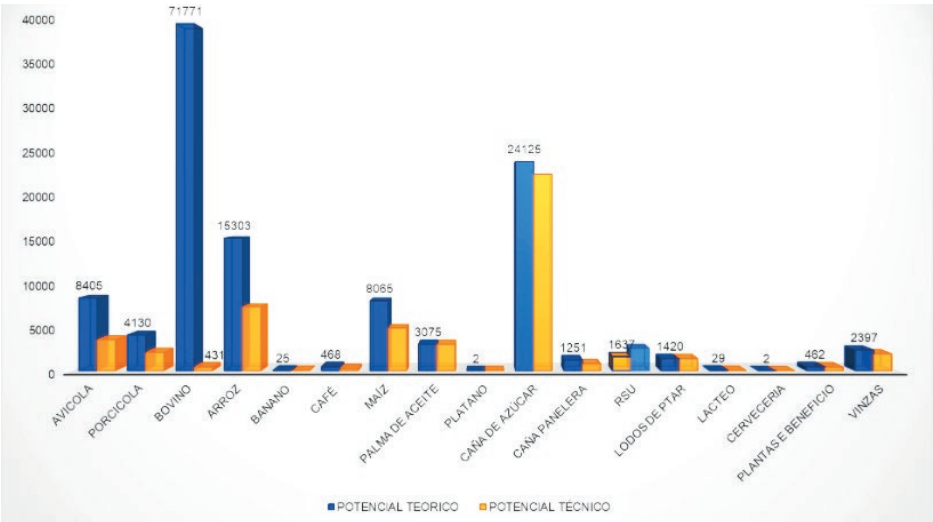


Figura 10. Potencial teórico y técnico de Biogás en Colombia, por sector.
Fuente: UNAL-UPME, 2017.

No obstante, a pesar de que en Colombia se cuenta con la disponibilidad de la biomasa residual y unas condiciones climáticas tropicales muy favorables, la implementación de proyectos de biogás con fines energéticos es muy incipiente. Como se observa en el mapa (Figura 11), hay muy pocos proyectos a mediana y gran escala, pues persisten barreras financieras, de mercado, de capacidades y normativas (LEDS LAC- LEDS GPD- BioE CoP, 2021).

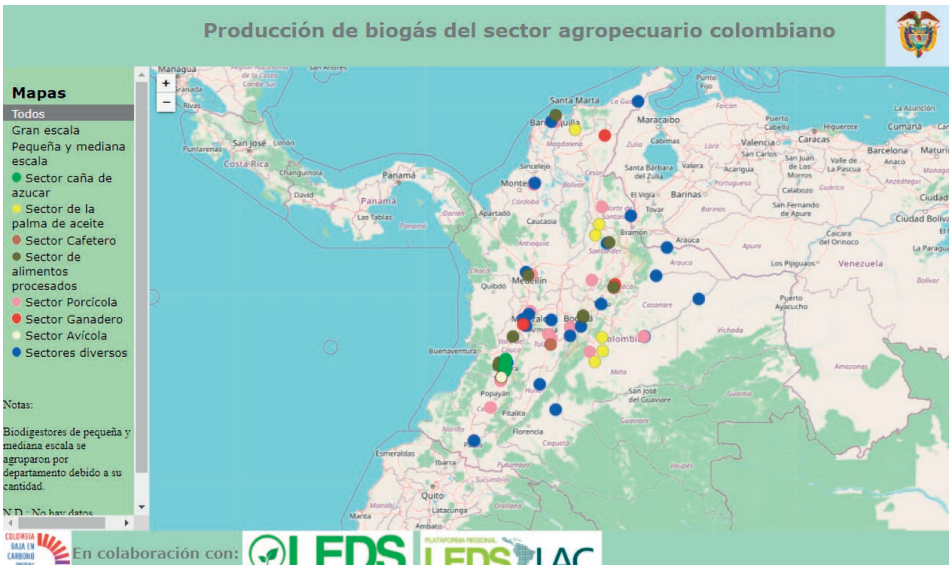


Figura 11. Proyectos de producción de biogás en Colombia.
Fuente: http://mapa.epizy.com

Es claro que Colombia enfrenta el desafío de diversificar su matriz energética para atender al creciente demanda de energía, sin aumentar emisiones de GEI. Para lograrlo, el país debe hacer un aprovechamiento sostenible de su amplio potencial de biomasa residual y sus adecuadas condiciones climáticas, implementando tecnologías como la de producción de biogás. Esta tecnología le puede aportar al cumplimiento de varios objetivos ambientales, como el adecuado tratamiento de residuos orgánicos y la generación de energía renovable.

2. Materiales y métodos

Desde la Universidad Nacional de Colombia (UNAL) se trabaja aportando a la investigación en energías renovables. Específicamente, en la sede Palmira, el grupo de investigación Prospectiva Ambiental ha venido investigando, durante los últimos 10 años, en la producción de biogás a partir de residuos orgánicos urbanos y agrícolas que se generan en el país.

El modelo conceptual con el que se trabaja la tecnología de DA en la Sede Palmira se muestra en la Figura 12. Se observa que mediante la DA se obtienen 3 corrientes, todas ellas con potencial de aprovechamiento para generar energía renovable en forma de biogás y biofertilizantes, bien sea en forma líquida o sólida. Al lograr aprovechar todas las corrientes generadas, hay cero residuos y se cumple el esquema de la Economía Circular.

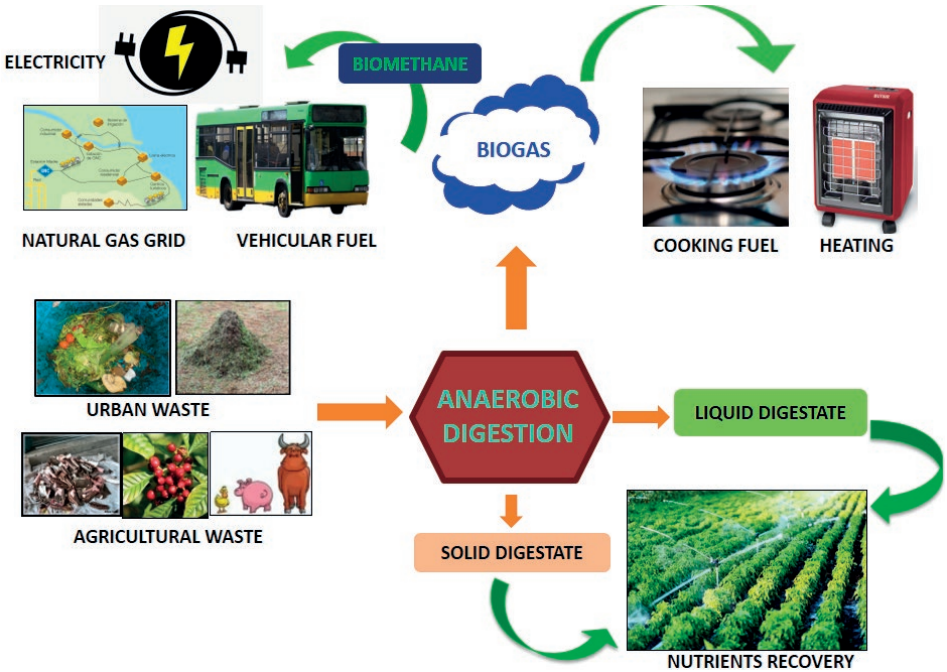


Figura 12. Modelo conceptual de investigaciones en producción de biogás, UNAL sede Palmira. Fuente: propia.

Bajo este esquema se han estudiado varios tipos de biomasas residuales (Figura 13), tales como residuos de frutas y verduras de mercados urbanos; residuos de poda de la ciudad; plantas acuáticas como el Jacinto de agua; residuos de la agroindustria de la yuca y el café; excretas de animales del sector porcícola, avícola y lechero; y residuos de pesca artesanal del pacífico colombiano.

Figura 13. Diferentes residuos orgánicos estudiados para producir biogás en UNAL, Palmira.
Fuente: propia.

La determinación del Potencial Bioquímico de Metano (PBM) se lleva a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales, mediante una prueba estándar, para lo cual se usa el equipo Nautilus de *Anaero Technology* (UK) (Figura 14). La prueba se lleva a cabo a una temperatura controlada de 37°C y con mezcla constante. Se registra en el tiempo, la cantidad de biogás y metano que produce una determinada cantidad de materia orgánica del sustrato que se degrada anaeróbicamente, alimentada a un reactor de 1 litro con un inóculo metanogénico. Los resultados se expresan a condiciones estándar de presión y temperatura. La prueba termina cuando la producción de biogás se reduce a niveles mínimos.

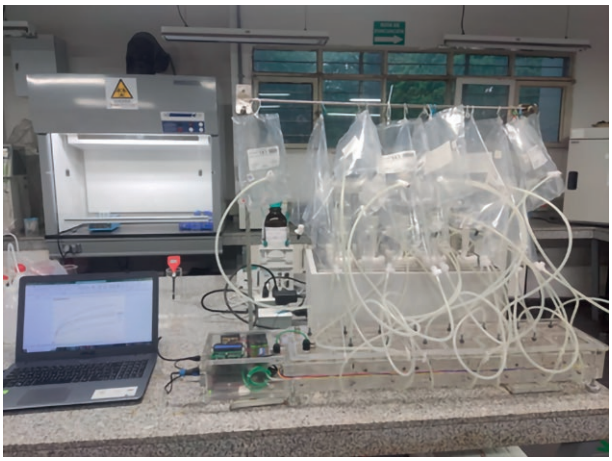


Figura 14. Equipo para determinar el Potencial Bioquímico de Metano. Laboratorio de Investigaciones Ambientales, UNAL, Palmira.
Fuente: propia.

Producción de biogás a partir de residuos de la pesca artesanal en Tumaco (Colombia)

Aquí se describirán los resultados obtenidos estudiando los residuos de pesca artesanal de la ciudad de Tumaco (Colombia). Municipio localizado en la costa pacífica sur de Colombia (Figura 15), con condiciones tropicales, temperatura media de entre 26-28°C y altos niveles de pluviosidad.

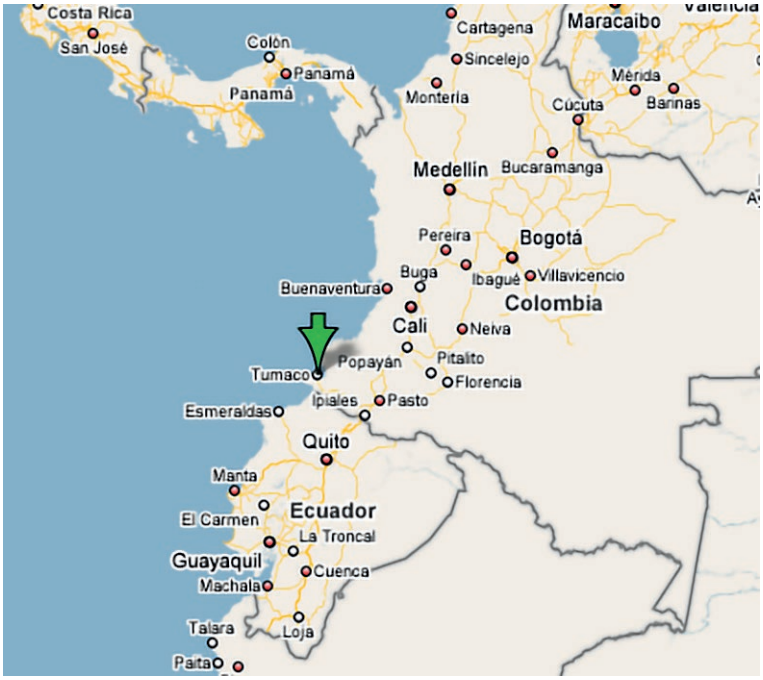


Figura 15. Mapa ubicación Tumaco (Colombia).
Fuente: https://www.ecured.cu/index.php?curid=703989

Una muestra representativa de residuos de pesca artesanal de Tumaco fue recolectada y llevada al Laboratorio de Investigaciones Ambientales para su caracterización físico, química y evaluación para la producción de biogás/metano y ácidos grasos volátiles (AGV).

3. Resultados

Contexto de la pesca artesanal en Tumaco

A pesar de que, alrededor del 90% de la población de Tumaco se dedica a actividades relacionadas con la pesca, hay un bajo reconocimiento del trabajo de los pescadores artesanales. La mayoría de las ganancias se quedan en manos de los intermediarios, por lo cual alrededor del 80% de los pescadores ganan menos del salario mínimo. Esto genera

que haya desinterés por parte de los jóvenes para continuar con la actividad de pesca y se corre el riesgo de perder la tradición cultural de ésta actividad. Adicionalmente, hay grandes deficiencias en saneamiento básico, en lo que tiene que ver con el manejo y tratamiento de las aguas residuales y los residuos sólidos.

En cuanto al manejo y disposición de los residuos de pesca, una vez llegan los pescadores a los puntos de descarga del producto, se realiza la actividad de arreglo del pescado (remoción de vísceras, agallas y otros). Luego de lo cual, el residuo colectado se dispone directamente al mar, sin ningún tipo de tratamiento, como se pudo evidenciar en la Galería de mariscos (Figura16). Esto causa problemas ambientales al ecosistema marino y costero, así como problemas en la salud de la comunidad.

Figura 16. a) Punto de llegada del producto de la pesca artesanal en la Galería de marisco. b) Allí se remueven los residuos. c) Luego son depositados directamente en el mar.
Fuente: propia.

Los resultados de la prueba del PBM (Figura 17) (Cadavid-Rodríguez *et al.*, 2019), mostraron que los residuos de pesca artesanal de Tumaco presentan un potencial de metano máximo de 464.5 N L CH_4/kg SV con una concentración de sólidos totales del 1%. A concentraciones de 1,5% y 2% de ST se observó un comportamiento diauxico, es decir hay dos curvas exponenciales debido a dos componentes con distintos tiempos biodegradabilidad, esto se explica porque el residuo de pesca está compuesto principalmente de proteínas y

grasa. Cuando se aumentó la concentración de sólidos totales a 2,5% se presentó inhibición en la producción de metano. El proceso mostró una buena capacidad buffer debido al amonio liberado durante el proceso de digestión de las proteínas contenidas en el residuo de pesca.

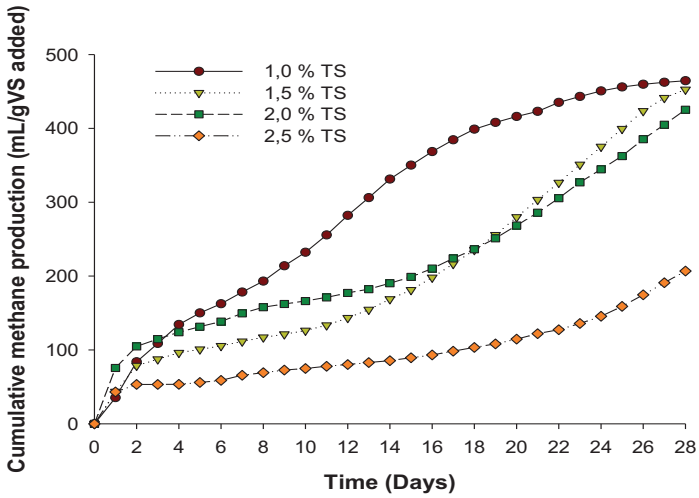


Figura 17. Potencial de producción de metano del residuo de pesca, a distintas concentraciones de sólidos.
Fuente: Cadavid-Rodríguez *et al.*, 2019.

Se realizó también un proceso de fermentación para la producción de ácidos grasos volátiles (AGV). Estos productos que son de interés comercial, por ejemplo, para la industria cosmética y farmacéutica, actualmente se producen a partir del petróleo y sus derivados. Para el estudio se evaluaron distintos tiempos de fermentación, entre 5 y 20 días; así como distintas relaciones inóculo:sustrato. Se encontró que es posible producir un digestato rico en AGV, si se lleva a cabo el proceso de fermentación (fases de hidrólisis y acidogénesis) durante 15 días. El digestato líquido con la mayor concentración de AGV, presentó una concentración de 65±5 g Ac/L de AGV totales. Los principales AGV producidos fueron ácido acético y ácido butírico.

Con base en los resultados del potencial de biogás y metano se pueden evaluar los beneficios energéticos de la producción de biogás a partir de residuos de pesca artesanal, en Tumaco. Se sabe que al año se producen alrededor de 1500 toneladas de éste residuo en Tumaco, asumiendo que todo este residuo se pueda aprovechar para producir biogás, se obtendría un equivalente a 897 MWh/year de energía en forma de biogás, con lo cual se pueden suplir las necesidades de cocción de alrededor de 600 familias.

Con base en estos resultados positivos a nivel de laboratorio, actualmente se está evaluando el proceso de producción de biogás con residuos de pesca, a nivel de planta piloto. Esto, como una fase intermedia para la implementación de la escala real.

4. Conclusiones

El uso energético de la biomasa moderna debe crecer un 15% para el año 2050, si se quiere alcanzar el escenario de 1.5C de París. El consumo de biocombustibles (Biogás/líquidos) deben incrementarse de 5 EJ (2018) a 22 EJ (2030). América Latina debe invertir USD 2.4 trillones, para incrementar por 3 su capacidad instalada de renovables para 2030, y por 8 para 2050.

Colombia tiene un potencial energético significativo con el uso de biomasa residual. Podría suplir más del 25% de su consumo de gas natural con biogás/biometano, y más del 90% de su demanda de energía eléctrica mediante gasificación de biomasa.

El residuo de la pesca artesanal del pacífico colombiano se puede aprovechar para producir energía renovable a través de la Digestión Anaerobia, generando un promedio de 105 m^3 de biogás por tonelada de residuo. Si éste biogás se usara para cocinar podría suplir las necesidades de alrededor de 600 familias. Los ácidos grasos volátiles son otro producto interesante que merece ser estudiado a mayor escala.

Para un avance rápido y efectivo en la producción de energía renovable a partir de la biomasa residual, tanto en Colombia como en Latinoamérica, la investigación se constituye en un factor clave para potenciar las ventajas climáticas y de biodiversidad de la región.

5. Reconocimientos y agradecimientos

Las fuentes de financiación para las investigaciones aquí mostradas fueron: la Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (MINCIENCIAS) y el Sistema General de Regalías de Colombia, a través de los proyectos: *Development of a bio-refinery system for organic acid production, bioenergy generation and nutrient recovery using fishery wastes from tumaco, Colombia, Newton Fund*, 2016; Fortalecimiento de la actividad pesquera artesanal en el pacífico nariñense colombiano hacia un aprovechamiento sostenible del recurso. Tumaco, BPIN: 2020000100068.

Un agradecimiento al Laboratorio de Investigaciones Ambientales, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, por su soporte técnico.

6. Referencias

Banco mundial (2022). Revisión Previsiones Crecimiento PIB, junio 2022.

Cadavid-Rodríguez, L.S., Vargas-Muñoz L.A., J. Plácido (2019). Biomethane from fish waste as a source of renewable energy for artisanal fishing communities. *Sustainable Energy Technologies and Assessments, 34*, 110-115. https://doi.org/10.1016/j.seta.2019.05.006

DANE (2021). Cuenta ambiental y económica de flujos de materiales – residuos sólidos (CAEFM-RS) 2018 – 2019 provisional. Boletín Técnico, Cuanta Satélite Ambiental (CSA). https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/pib/ambientales/cuentas_ambientales/cuentas-residuos/Bt-Cuenta-residuos-2019p.pdf

IEA (2022). Bionergy. More efforts needed. Tracking report. September 2022. https://www.iea.org/reports/bioenergy

IRENA (2022a). Bioenergy for the energy transition: Ensuring sustainability and overcoming barriers, International Renewable Energy Agency, Abu Dhabi.

IRENA (2022b). IRENA (2022). *World Energy Transitions Outlook 2022: 1.5°C Pathway*, International Renewable Energy Agency, Abu Dhabi. https://www.irena.org/Publications/2022/Mar/World-Energy-Transitions-Outlook-2022

LEDS LAC- LEDS GPD- BioE CoP (2021). De la práctica a la política: Análisis de las barreras a la inversión en biogás en Colombia y las medidas para abordarlas, a partir de la experiencia de los desarrolladores y otros actores relevantes. Informe final. https://ledslac.org/wp-content/uploads/2021/08/Informe-final-biogas-Colombia-v.06082021-final.pdf

Pérez-Rodríguez C.P., Ríos L.A., Duarte C.S., Montaña A., García-Marroquín C. (2022). Harnessing Residual Biomass as a Renewable Energy Source in Colombia: A Potential Gasification Scenario. *Sustainability*, *14*,19, 12537. https://doi.org/10.3390/su141912537

UNAL-UPME (2017). Estimación del potencial de producción de biogás de la biomasa residual en Colombia y su aprovechamiento. Contrato 001 de 2017 UPME-UNAL. Informe Final.

UPME (2022). Proyección de demanda energía eléctrica, gas natural y combustibles líquidos, 2022-2036 en Colombia. https://www1.upme.gov.co/DemandayEficiencia/Documents/Informe_proyeccion_demanda_energeticos.pdf

Superintendencia de servicios públicos (2015). Informe de Disposición Final de Residuos Sólidos – 2015. https://www.superservicios.gov.co/sites/default/files/inline-files/2._disposicion_final_de_residuos_solidos_-_informe_2014%20%281%29.pdf

Superintendencia de servicios públicos (2018). Informe de Disposición Final de Residuos Sólidos – 2017. https://www.superservicios.gov.co/sites/default/files/inline-files/2._disposicion_final_de_residuos_solidos_-_informe_2017%20%281%29.pdf

Deteminación de ecuaciones alométricas para estimar biomasa aérea y captura de CO_2 en bolaina (*Guazuma crinita* C. Martius)

Mario Torres García[1], Tania Guerrero Vejarano[1*]

[1]Laboratorio de Transformación Química en la Facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS). Car.Central km. 1.21, Tingo María, Perú.

***Autor para correspondencia:** tania.guerrero@unas.edu.pe

1. Introducción

Uno de los mecanismos de flexibilidad existentes, son los proyectos llamados Mecanismos de Desarrollo Limpio (MOL), a través de los cuales, se podría incentivar las plantaciones forestales con fines de captura de dióxido de carbono. Para ello es de gran importancia tener información adecuada de la biomasa de los bosques naturales y plantaciones, como un medio para mitigar los cambios climáticos generados por el consumo de combustibles fósiles, entre otros, que liberan una gran cantidad de dióxido de carbono a la atmósfera. Existen métodos directos e indirectos para estimar la biomasa y captura de $C0_2$ de un bosque. El método directo consiste en cortar el árbol y pesar la biomasa directamente, determinando luego su peso seco. Brown (1997), citado por Schlegel *et al*., (2001) menciona que una forma de estimar la biomasa con el método indirecto es a través de ecuaciones y modelos matemáticos calculados por medio de análisis de regresión entre variables colectadas en terreno

Modelos para estimación de la biomasa Los modelos tienen por objeto explicar las relaciones matemáticas existentes entre los atributos y dimensiones del árbol y el peso seco de sus componentes. Prado *et al.,* (1987), citado por Garcinuño (1995), señalan que lo idea l para realizar análisis de regresión es tener una muestra promedio con 30 o más individuos. Para determinar la biomasa es muy frecuente el uso de funciones alométricas cuando se ha obtenido el peso por componente o árbol total el cual se relaciona con algunas variables de estado del árbol de simple determinación. Estas funciones tienen mucha aplicación en el campo forestal, por cuanto presentan gran flexibilidad en su uso, siendo las variables más usadas el diámetro a la altura del pecho (dap), diámetro a la altura del tocón (Dat), altura total (Ht) y diferentes combinaciones de ellas. Prado *et al.,* (1987). citado por Garcinuño (1995) mencionan una gran cantidad de estudios que utilizan la forma del modelo siguiente.

$$Y = a \cdot X^b \quad (1)$$

Donde Y = variable dependiente; X = variable independiente; a,b = parámetros de la función.

Gayoso *et al.,* (2002) afirman que la preferencia por este modelo se debe a que expresa una proporcionalidad de los incrementos relativos entre dos componentes del árbol, y además es ampliamente consistente para distintas formas de crecimiento. Y su ·expresión lineal doble logarítmica.

$$LN\ Y = a + b \cdot LN\ X \quad (2)$$

Donde Y = variable dependiente; X = variable independiente; a,b = parámetros de la función.

En la ecuación (2) una gran variedad de relaciones dimensionales es reducidas a una línea recta ajustada por la ecuación doble logarítmica además son ampliamente consistentes para distintas formas de crecimiento (Schlegel *et al*., 2001).

Los bosques tienen cuatro funciones principales en el cambio climático, como fuente de dióxido de carbono cuando se destruyen o degradan, como indicador de un cambio climático, como fuente de biocombustible y como sumidero de carbono cuando se explotan de forma sostenible. Por ello la conservación y expansión de los bosques naturales adultos o de los bosques artificiales son consideradas como una propuesta muy importante para la reducción del nivel de CO_2 en la atmósfera debido a su función como sumideros de gases de efecto invernadero (Dixon, 1993).

El potencial de absorción de carbono mediante actividades de forestación/reforestación depende de la especie, el 'lugar y el sistema de ordenación es muy variable. Los índices normales de absorción, expresados en toneladas de carbono (tC) por hectárea y año, en los trópicos es de 3,2 a 10 tC. Los estudios realizados los trópicos indican que sería posible absorber un volumen adicional de carbono, que se cifra en 11,5 a 28,7 Gt de carbono mediante la regeneración de unos 217 millones de ha de tierras degradadas

En la estimación de carbono acumulado en los distintos ecosistemas forestales, se utilizan los inventarios de carbono, que contabilizan el carbono fijado al momento de las mediciones. Para que los inventarios puedan ser comparados entre sí y reflejen la cantidad real de carbono acumulado por el ecosistema, es importante que estas sean confiables. Es decir, se basen en su estimación en principios y procedimientos, aceptados de inventario, muestreos y ciencias del suelo, para reflejar la cantidad real de carbono (Schlegel *et al*., 2001).

Catpo (2000) realizó un estudio de investigación para cuantificar carbono acumulado en una plantación de *Pinus patula* existente ·en Cajamarca, llamada Cerro Campanario ubicada a 40 km al NO de la ciudad. Donde establecieron 31 parcelas, que tuvieron árboles de 17 y 19 años de edad, de los cuales tomaron 31 individuos para ensayos destructivos para hallar la biomasa arbórea existente, determinando la biomasa arbórea existente. Con los datos calculados construyo la ecuación final de biomasa que. tuvo como variable independiente al dap, como dependiente a la biomasa, quedando la ecuación expresada como $CCBATPp = 7{,}98e^{9{\cdot}07dap}$, permitiendo estimar montos de carbono para otras plantaciones de *Pinus patula*, dentro de Porcón y plantaciones en otros lugares del Perú, con similares características climáticas, fisiográficas y edáfico.

Diaz *et al.,* (2007) realizaron un estudio en el Ejido Mariano de Matamoros, Tlaxco, México, donde seleccionaron 25 árboles de *Pinus patula* SchL et Cham., y se determinaron su biomasa y carbono en el estrato aéreo para ajustar el modelo Y=b · Xk, tomando como variable independiente (X) el diámetro (dap). En el campo se determinó el peso fresco, tanto de la muestra como del componente, las muestras se llevaron al laboratorio para ser secadas y obtener su peso seco, para después estimar la biomasa total, de cada: árbol, usando para ·ello la relación peso seco/peso fresco de las muestras. Para determinar el carbono de los diferentes componentes se tomaron muestras de cinco árboles y fueron analizadas en el laboratorio, obteniendo así 52,21% de carbono en el follaje, 49,47% en las ramas y 49,26% en el fuste de esta forma la concentración promedio por árbol fue de 50,31%. Para estimar 11a biomasa se ajustó y generó la ecuación B = 0,0357 · dap2·6916 y para estimar el carbono la ecuación ajustada fue CC = 0,021 · dap2,6451, con los coeficientes de determinación (R^2) para ambas de 0,98.

2. Materiales y métodos

Descripción de la zona de estudio

La investigación se ha realizado en una plantación de 78 ha de bolaina (*Guazuma crinita*) de 1 a 5 años de edad, distribuída bajo e1 método cuadrado con un distanciamiento de 3 m entre planta, ubicándose políticamente en el sector de Santa Rosa de Shapajilla, distrito de Luyando, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco. Geográficamente Santa Rosa de Shapajilla presenta las siguientes coordenadas: Latitud sur: 9° 12’ 14”, Longitud oeste: 75°59’35”, Altitud: 620 m s.n.m. Ecológicamente, de acuerdo a la clasificación de zonas de vida y el diagrama bioclimático de Holdridge (1996), Santa Rosa de Shapajilla se encuentra en la formación vegetal de Bosque muy húmedo Premontano Sub Tropical (bmh-PST), se ubica en selva alta, con temperatura media anual de 24°C precipitación promedio anual de 3200 mm y humedad relativa promedio anual de 87%.

Materiales y equipos

Los materiales y equipos empleados según las necesidades fueron: una motosierra marca Homelite, sierra de arco, machete, cinta métrica, balanza de mano de 5, 12, 100 kg, bolsas plásticas, estufa, mufla, cocina eléctrica,:6 crisoles de porcelana y una balanza analítica. Para marcar el punto se utilizó un GPS GARMIN modelo 60 XL, cámara digital, computadora y equipos de impresión.

Metodología

Determinación de la biomasa aérea

Tamaño de la muestra y selección de árboles

Se seleccionaron 30 individuos de *G. crinita* C. Martius, de diferentes edades (1 a 5 años) se tomó 6 muestras representativas por año, teniendo en cuenta la variabilidad entre árboles, pero no se consideraron árboles bifurcados o con enfermedades.

Medición de árboles muestra

Se realizaron 2 tipos de mediciones, la primera con el árbol en pie, donde se incorporó un grupo de variables de interés para un buen uso posterior de los antecedentes como el dap, edad y número de árbol y la segunda una vez realizada la tumba.

Tumbado y pesado de los árboles

Se procedió a la tumba de los árboles con la ayuda de una motosierra, al ras del suelo sin dejar el tocón, una vez derribado, el fuste fue seccionado en trozas de 1 m de longitud, las ramas fueron separadas del follaje para ser pesado de manera independiente. Las trozas se pesaron en una balanza romana de 100 kg, del mismo modo se pesaron las ramas y hojas en una balanza romana de 12 kg obteniendo así el peso fresco total por componente del árbol.

Recolección y secado de las muestras

Se recolectaron 9 muestras por árbol, 3 muestras o rodajas de aproximadamente 5 cm de espesor de la parte baja, media y alta del fuste, 3 muestras de ramas y 3 muestras de hojas, sumando 270 muestras en total, estos fueron pesados independientemente en una balanza circular de 5 kg, para luego obtener el peso fresco por muestra. Las muestras fueron llevadas a laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, para ser secadas a 105 °C de temperatura, hasta obtener un peso seco constante por componente del árbol.

Cálculo de la biomasa aérea total por árbol

El cálculo de biomasa de los individuos se realizó por componente de árbol, utilizando las fórmulas propuestas por Arévalo *et al.,* (2003).

$$B\ (kg) = ((PSM/PFM) \times PFT) \times 1000 \quad (3)$$

Donde: Bt = Biomasa; PSM = Peso Seco de la muestra; PFM = Peso fresco de la muestra; PFT =Peso fresco total.

$$Bt\ (kg/árbol) = Bf + Br + Bh \quad (4)$$

Donde: Bt = Biomasa total; Bf = Biomasa del fuste; Br = Biomasa de las ramas; Bh = Biomasa de las hojas.

Determinación del porcentaje de cenizas (ISO R 1762)

Para determinar el porcentaje de cenizas del fuste ramas y hojas, se procedió a desmenuzar dos muestras de cada uno, luego se tomó 5 gramos de muestra en un crisol, luego fueron puestas en unacocina eléctrica. para ser quemados hasta carbón, luego se colocó en la mufla a 600°C hasta obtener cenizas, se sacaron las cenizas y se colocaron en el desecador, se pesaron también se colocó 5 gramos de muestra en la estufa para determinar "k".

El porcentaje de ceniza se calculó con la siguiente fórmula.

$$\%C = \left[\frac{mc}{mh*k}\right] * 100 \quad (5)$$

Donde: mc= masa de cenizas; mh: masa húmeda K: fracción de masa seca (mo/mh).

Cálculo del contenido de carbono total por árbol

Para determinar el contenido de carbono por componente de árbol, se tomó en cuenta los porcentajes de carbono promedio encontrado en la investigación realizada por Díaz *et al.,* (2007) en *Pinus patula* Schl. *et* Cham., que fue de 49,26% para el fuste; 49,47% para las ramas y 52,21% para las hojas. El cálculo de carbono se realizó con los siguientes factores de conversión.

$$CC = Bt \cdot 0{,}4926; \text{ para el caso del fuste} \quad (6)$$

$$CC = Bt \cdot 0{,}4947; \text{ para el caso de ramas} \quad (7)$$

$$CC = Bt \cdot 0{,}5221; \text{ para e'l caso de hojas} \quad (8)$$

Donde: CC = Contenido de Carbono; Bt = Biomasa total.

Determinación de ecuaciones alométricas para estimar biomasa y captura de CO_2

Determinación de la ecuación alométrica para estimar biomasa aérea

La ecuación alométrica para estimar la biomasa, se determinó mediante análisis de regresión, teniendo como variable independiente al DAP (cm) y como dependiente a la biomasa (kg), obteniendo diferentes modelos de regresión. El resumen y análisis de estos modelos se realizó con el programa SPSS 12.

Determinación de la ecuación alométrica para estimar captura de CO_2

La determinación de la ecuación alométrica para estimar captura de CO_2 se hizo una regresión lineal entre la biomasa como variable independiente y la captura de CO_2 como variable dependiente. Con los datos de biomasa total se calculó la cantidad de carbono almacenado (se multiplicó por 0,5), la cantidad de carbono sirvió de base para calcular por estequiometria la captura de CO_2 (multiplicado por 44/12).

3. Resultados y Discusion

Determinación de la biomasa por componente del árbol

Tabla 1. Biomasa total promedio por componente del árbol y por edad.

Edad (años)	Biomasa de fuste (kg)	Biomasa de ramas (kg)	Biomasa de hojas (kg)	Biomasa total (kg)
1	1,52	0,43	0,61	2,56
2	11,69	3,71	2,98	18,38
3	38,87	4,06	3,8	45,9
4	65,87	4,53	4,79	75,18
5	124,01	10,02	6,03	140,06

El promedio de los componentes de la biomasa para el fuste, ramas y hojas variaron con respecto a la edad de la plantación. Alcanzando una biomasa promedio total en kilogramos por árbol para el 1er año de 2,56; el 2do año de 18,38; el 3er año de 45,9; el 4m año de 75,18 y el 5m año de 140,06, pudiendo variar estos resultados con la calidad del sitio y con la especie (Tabla 1).

La determinación adecuada de la biomasa de un bosque es un elemento de gran importancia debido a que ésta permite determinar los montos de carbono y otros elementos químicos existentes en cada uno de sus componentes (Schlegel *et al*., 2001), la biomasa de la mayoría de los componentes de los árboles aumenta con la edad, sitio y tratamiento del rodal (Figura 1), ésta se estabiliza con el tiempo y la cantidad varía con la calidad de sitio y con la especie (Gayoso *et al.,* 2002).

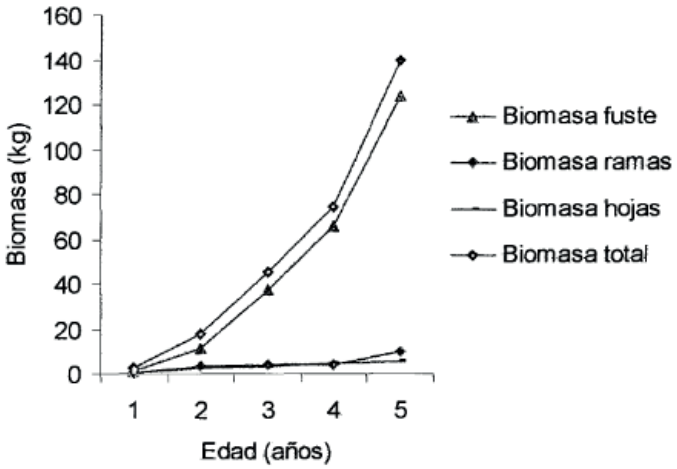


Figura 1. Biomasa por componente de árbol a la edad.

Determinación del contenido de carbono y captura de CO_2

El promedio del contenido de carbono y captura de 002 en kilogramos de la *G. crinita C. Martius*, para el 1er año fue de 1,23 y 4,49; el 2do año de 8,70 y 31,90; el 3er año de 21,94 y 80,46; el 4to año de 36,01 y de 132,02 y para el 5to año de 66,82 y 244,99 respectivamente (Tabla 2).

En muchos estudios se ha empleado la biomasa de los árboles para estimar el contenido de carbono, a través de la multiplicación de la cantidad disponible en una determinada superficie por un factor que va desde 0,40 hasta el 0,55; ya que varios autores han encontrado que es la proporción de carbono contenido en cualquier especie vegetal, en general se acepta que el contenido de carbono corresponde al 50% de la biomasa (Díaz, 2007). Sin embargo, diferentes estudios denotan la variabilidad del contenido de carbono según especie y tejido del árbol (Gayoso *et al.,* 2002).

Tabla 2. Contenido de carbono y captura de CO_2 promedio por edades.

Edad (años)	Carbono total (kg)	Captura de CO2 (kg)
1	1,23	4,49
2	8,7	31,9
3	21,94	80,46
4	36,01	132,02
5	66,82	244,99

Según Parde (1980), citado por Gayoso y Schlegel (2001), el contenido de carbono en la planta, es diferente en cada componente (fuste, ramas y hojas), Díaz *et al.,* (2007) determinó el carbono de los diferentes componentes tomando 5 muestras de árboles de *Pinus patula* (pino) y fueron analizadas en el laboratorio, obteniendo así 52,21% de carbono en 11as hojas, 49,47% en las ramas y 49,26% en el fuste, de esta forma la concentración promedio por árbol fue de 50,31%, en el presente estudio se utilizó los porcentajes de contenido de carbono encontrados en *Pinus patula* (pino) por componente de árbol (0,5), donde obtuvo un promedio por árbol aceptado por varios autores. (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de biomas, carbono y captura de dióxido de carbono de *Guazuma crinita.*

Nº de árbol	Edad (años)	Bf (kg)	% DE C	Bf (kg de C)	Br (kg)	% DE C	BR (kg de C)	Bh (kg)	% DE C	Bh (kg de C)	Biomasa Total (kg)	Carbono total (kg)	Captura de CO_2
1	1	1,000	0,493	0,493	0,388	0,495	0,192	0,539	0,522	0,281	1,926	0,966	3,541
2	1	0,454	0,493	0,224	0,279	0,495	0,138	0,152	0,522	0,079	0,885	0,441	1,616
3	1	1,700	0,493	0,837	0,350	0,495	0,173	0,633	0,522	0,330	2,683	1,341	4,917
4	1	1,752	0,493	0,863	0,503	0,493	0,249	0,724	0,522	0,378	2,978	1,490	5,462
5	1	1,685	0,493	0,830	0,409	0,493	0,202	0,482	0,522	0,252	2,576	1,284	4,708
6	1	2,493	0,493	1,228	0,554	0,493	0,274	0,791	0,522	0,413	3,838	1,915	7,021
7	2	9,750	0,493	4,803	3,038	0,493	1,503	2,423	0,522	1,265	15,211	7,571	27,759
8	2	10,969	0,493	5,403	4,637	0,493	2,294	3,627	0,522	1,893	19,232	9,591	35,165
9	2	10,523	0,493	5,183	3,476	0,493	1,719	2,659	0,522	1,388	16,657	8,291	30,400

(Tabla 3 continúa en la página siguiente)

(Tabla 3 continúa de la página anterior)

Nº de árbol	Edad (años)	Bf (kg)	% DE C	Bf (kg de C)	Br (kg)	% DE C	BR (kg de C)	Bh (kg)	% DE C	Bh (kg de C)	Biomasa Total (kg)	Carbono total (kg)	Captura de CO_2
10	2	11,922	0,493	5,873	3,695	0,493	1,828	2,514	0,522	1,312	18,131	9,013	33,049
11	2	14,312	0,493	7,050	3,929	0,493	1,944	3,046	0,522	1,590	21,287	10,584	38,809
12	2	9,980	0,493	4,916	2,386	0,493	1,180	2,047	0,522	1,069	14,414	7,166	26,274
13	3	40,022	0,493	19,715	3,936	0,493	1,947	3,618	0,522	1,889	47,576	23,551	86,354
14	3	31,780	0,493	15,655	3,720	0,493	1,840	3,132	0,522	1,635	38,632	19,130	70,145
15	3	33,396	0,493	16,451	3,700	0,493	1,831	3,494	0,522	1,824	40,590	20,106	73,720
16	3	37,633	0,493	18,538	4,289	0,493	2,122	3,265	0,522	1,705	45,188	22,365	82,005
17	3	31,107	0,493	15,323	3,407	0,493	1,686	2,813	0,522	1,469	37,328	18,478	67,752
18	3	48,106	0,493	23,697	4,113	0,493	2,035	4,453	0,522	2,325	56,672	28,057	102,875
19	4	82,493	0,493	40,636	5,657	0,493	2,798	5,424	0,522	2,832	93,574	46,266	169,644
20	4	51,713	0,493	25,474	3,257	0,493	1,611	3,308	0,522	1,727	58,277	28,812	105,643
21	4	70,056	0,493	34,510	6,404	0,493	3,168	4,961	0,522	2,590	81,422	40,268	147,650
22	4	56,435	0,493	27,800	3,599	0,493	1,781	3,715	0,522	1,940	63,750	31,520	115,574
23	4	65,412	0,493	32,222	2,985	0,493	1,477	4,224	0,522	2,205	72,621	35,904	131,649
24	4	58,779	0,493	28,955	3,949	0,493	1,954	4,565	0,522	2,383	67,293	33,292	122,069
25	5	142,168	0,493	70,032	7,033	0,493	3,479	4,393	0,522	2,294	153,595	75,805	277,952
26	5	89,700	0,493	44,186	6,467	0,493	3,199	4,606	0,522	2,405	100,774	49,791	182,565
27	5	111,439	0,493	54,895	5,729	0,493	2,834	3,712	0,522	1,943	120,888	59,671	218,795
28	5	112,527	0,493	55,431	10,928	0,493	5,406	6,749	0,522	3,524	130,204	64,361	235,989
29	5	110,620	0,493	54,491	11,095	0,493	5,489	8,408	0,522	4,390	130,123	64,370	236,023
30	5	155,042	0,493	76,374	15,902	0,493	7,867	5,148	0,522	2,688	176,092	86,928	318,736

Determinación de ecuaciones alométricas para estimar biomasa aérea y Captura de CO_2

Determinación de la ecuación alométrica para la estimación de biomasa aérea:

El DAP de los árboles muestreados varió en un rango de 3,5 a 20,48 cm, y la biomasa de 1,92 a 176,08 kilogramos. Obteniendo parámetros de dispersión y modelos matemáticos de los valores de biomasa (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de los modelos para la estimación de biomasa (kg).

Ecuación	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros		
	R2	F	gl1	gl2	Sig.	Const.	b1	b2
Lineal	0,886	217,53	1	28	9,95E-15	-58,038	10,22	
Logarítmica	0,671	57,12	1	28	3,12-08	-122,10	77,18	
Inversa	0,422	20,42	1	28	1,03E-04	100,98	-391,67	
Cuadrático	0,986	952,96	2	27	9,11E-26	5,227	-4,04	0,66
Compuesto	0,941	444,21	1	28	1,02E-18	0,888	1,37	
Potencia	0,985	1839,76	1	28	4,36E-27	0,048	2,78	
Crecimiento	0,941	444,21	1	28	1,02E-18	-0,119	0,31	
Exponencial	0,941	444,21	1	28	1,02E-18	0,888	0,31	

Variable dependiente: Biomasa (kg) y variable independiente el dap (cm).

Según Arévalo *et al.,* (2003) la ecuación con mayor valor coeficiente de determinación (R^2), será aquella que presente la mejor predicción sobre la producción de biomasa del árbol y por lo tanto, 1la que debe utilizarse para las siguientes evaluaciones de biomasa.

Realizando la dispersión de puntos de la biomasa y.ajustes regresionales de la biomasa y un resumen de los modelos y parámetros, se observa que las ecuaciones con mayor coeficiente de determinación (R^2), fueron el cuadrático y el potencial con 0,986 y 0,985 respectivamente, considerando para este caso el modelo mas significativo, tomando como prioridad la ecuación potencial por tener un mayor F calculado (1839,76) y un mayor:nivel de significancia (4,36E-27).

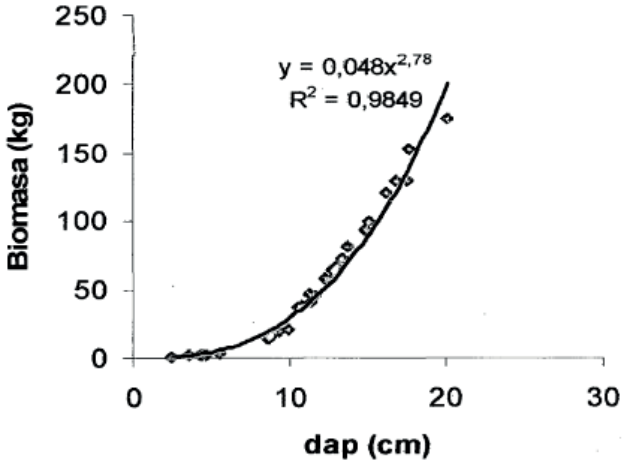


Figura 2. Regresión potencial de biomasa de *Guazuma crinita G. Martius*.

La ecuación determinada para estimar la biomasa de *G. crinita C. Martius,* quedó expresada como:

$$B=0{,}048 \cdot dap^{2{,}78} \quad (8)$$

Donde: B: biomasa (kg), dap: diámetro a la altura de pecho (cm).

Gayoso *et al.,* (2002) afirman que la preferencia por este modelo se debe a que expresa una proporcionalidad de los incrementos relativos entre dos componentes del árbol, y además es ampliamente consistente para distintas formas de crecimiento.

Determinación de la ecuación alométrica para la estimación de captura de CO_2

La biomasa total de los árboles muestreados presento un rango de 1,92 a 176,08 kilogramos y captura de CO_2 de 3,54 a 319,92 kg (Figura 3). Los parámetros del modelo y la dispersión de puntos, presentan una ecuación lineal y un coeficiente de determinación (R^2=1).

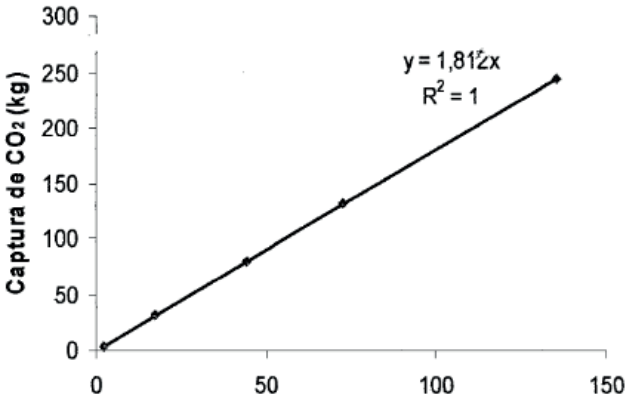


Figura 3. Regresión lineal para calcular captura de dióxido de carbono (kg).

La ecuación determinada mediante ecuación lineal es la siguiente:

$$Y=1,812x \quad (9)$$

Donde:

$$X=\text{Biomasa Fuste}+\text{Biomasa (Ramas+ Hojas)}$$

$$\text{Biomasa Fuste}=DB \cdot \pi/4\ dap^2 \cdot h \cdot 0,65$$

$$\text{Biomasa Fuste}=0,41g/cm^3 \cdot \pi/4\ dap^2 \cdot h \cdot 0,65$$

$$\text{Biomasa Fuste}=0,41g/cm^3 \cdot \pi/4\ dap^2/10000 \cdot h \cdot 0,65$$

$$BF=0,0209 \cdot dap^2h$$

$$\text{Biomasa Fuste}=7,02\ (\text{Biomasa Ramas}+\text{Biomasa Hojas})$$

$$(\text{Biomasa Ramas}+\text{Biomasa Hojas})=(0,0209 \cdot dap^2h)/7,02$$

$$(\text{Biomasa Ramas}+\text{Biomasa Hojas})=0,0029\ dap^2h$$

$$X=0,0209\ dap^2h+0,0029\ dap^2h$$

$$X=0,0238 \cdot dap^2h$$

$$Y=1,812 \cdot 0,0238 \cdot dap^2h$$

$$Y=0,0432 \cdot dap^2h$$

Al ajustar.la ecuación en función del diámetro y 1a altura para estimar captura de CO_2, quedó expresada como:

$$CO_2=0,0432 \cdot dap^2h \quad (10)$$

Donde: CO_2: es la captura de CO_2 en kg; *dap:* es el diámetro a la altura de pecho en cm y h: altura total (m).

Comparación de la ecuación alométrica obtenida con otras ecuaciones alométricas

Los resultados obtenidos de biomasa para datos de *G. crinita* C. Martius (Tabla 3), se realizó utilizando ecuaciones alométricas propuestas para estimar biomasa aérea, se tomó en cuenta la ecuación determinada en el presente estudio, comparado con las ecuaciones propuesta por Brown (1996) en especies de bosques tropicales ($B = 0{,}1184\ dap^{2\times53}$) y con la determinada por Díaz (2007) en *Pinus patula* ($B = 0{,}0357 \cdot dap^{2\times6916}$), donde se observa una variación de los resultados de biomasa entre autores, dado a las diferentes especies que se pone en estudio, donde existen variabilidad en el crecimiento, formas morfológicas, densidades básicas y las distintas condiciones de suelos y microclimas que prospera cada especie. Poniendo en manifestación que el mal uso de estas ecuaciones da como resultado la sobreestimación o subestimación de biomasa por especie.

Tabla 5. Comparación de la biomasa calculada con la ecuación generada, el método destructivo y otras ecuaciones.

ARBOL (años)	DAP (cm)	Cálculo de Biomasa			
		Método destructivo (cm)	Ecuación generada (kg)	Ecuación de Brown (kg)	Ecuación de Diaz (kg)
1	3.500	1.926	1.562	2.817	1.041
2	2.400	0.885	0.547	1.085	0.377
3	4.300	2.683	2.769	4.743	1.811
4	4.600	2.978	3.340	5.625	2.171
5	4.400	2.580	2.951	5.027	1.927
6	5.500	3.840	5.488	8.840	3.513
7	8.530	15.210	18.590	26.832	11.447
8	9.330	19.230	23.851	33.663	14.571
9	8.590	16.660	18.956	27.312	11.665
10	8.940	18.180	21.182	30.216	12.989
11	9.930	21.290	28.364	39.412	17.233
12	8.750	14.410	19.954	28.618	12.259
13	11.300	47.580	40.626	54.656	24.403
14	10.800	37.110	35.823	48.743	21.604
15	11.400	39.990	41.633	55.888	24.989
16	11.650	43.390	44.221	59.041	26.492
17	10.480	35.840	32.949	45.172	19.924
18	12.650	54.370	55.597	72.718	33.066
19	14.800	90.920	86.014	108.172	50.454
20	12.250	56.420	50.846	67.040	30.326
21	13.760	78.910	70.243	89.961	41.468
22	12.780	61.730	57.200	74.623	33.989
23	13.350	70.280	64.577	83.333	38.225
24	12.980	69.190	59.723	77.613	35.440
25	17.630	153.590	139.902	168.411	80.808
26	15.060	100.770	90.281	113.044	52.876
27	16.120	120.890	109.073	134.272	63.500
28	16.800	130.200	122.349	149.068	70.971
29	17.500	130.120	137.053	165.287	79.214
30	20.100	176.090	201.431	234.659	115.012

4. Conclusiones

El promedio de los componentes de la biomasa para el fuste, ramas y hojas variaron con respecto a la edad de la plantación. Alcanzando una biomasa promedio total en kilogramo por árbol para el 1er año de 2,56; el 2do año 18,38; el 3er año 45,9; el 4to año 75,18 y el 5to año 140,06.

El porcentaje promedio de cenizas en el fuste fue de 2,91 %, en las ramas 4,89 % y en las hojas de 8,93%.

El contenido promedio de carbono y captura de CO_2 en kg/árbol para el 1er año fue de 1,23 y 4,49; el 2do año 8,70 y 31,90; el 3er año 21,94 y 80,46; el 4to año 36,01 y de 132,02 y para el 5to año 66,82 y.244,99 respectivamente.

Las ecuaciones alométricas para determinar biomasa y captura de dióxido de carbono son: y respectivamente

5. Referencias Bibliograficas

Arévalo, L, Alegre, J., & Palm, C. (2003). *Determinación de las reservas totales de carbono en los diferentes sistemas de uso de la tierra en el Perú*. 1INIA. 1 ed. 24p.

Benjamín, J., & Masera, O. (2001). Captura de carbono ante el cambio climático. *Revista Madera y Bosques, 7*(1), 3-12. https://doi.org/10.21829/myb.2001.711314

Brown, S. (1996). Influencia de los bosques. *Revista Unasylva*, *47*(185), 3-10.

Catpo, J. (2000). Determinación de la ecuación alométrica del *Pinus patula* y estimación de carbono en cerro Campanario. Tesis.Ing. Forestal. Cajamarca, Perú. Universidad Agraria de la Malina. 56 p.

Díaz, R, Agosta, M., Carrillo, F., Buendía, E., Flores, E., & Etchevers, J. (2007). Determinación de ecuaciones alométricas para estimar biomasa y carbono en *Pinus patula* Schl. et Oham. *Madera y Bosques, 13*(1), 25-34. https://doi.org/10.21829/myb.2007.1311233

Dixon, J. (1993). El cambio climático y los bosques. [En línea] Ecosur, (http://www.ecosur.net/cambio climatice y los bosques, documento, 08 de feb. 2008)

Garcinuño, J. (1995). Biomasa aérea en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus* (Lab) en la Costa de Valdivia. Tesis Ing. Forestal. Universidad Austral de Chile. 76 p.

Gayoso, J., Guerra, J., & Alarcón, D. (2002). Contenido de carbono y funciones de biomasa en especies nativas y exóticas. [En línea]: UACH, (www.uach.cl/procarbono/Documentos/Informe%20Tecnico%20Biomasa.pdf., documento, 06 jul. 2008)

Gayoso, J., & Schlegel, B. (2001). Guía para la formulación de proyectos forestales de carbono. UACH - chile. 17p.

Holdridge, L. (1996). *Ecología basada en zonas de vida*. Centro científico tropical 216 p.

Llerena, G.A. (1991). Contaminación atmosférica, efecto invernadero y cambios climáticos, sus impactos forestales. *Revista Forestal del Perú, 18*(2), 101-106.

Lopera, G., & Gutierrez, V. (2000). Viabilidad técnica y económica de la utilización de plantaciones de *Pinus patula* como sumidero de CO_2. Tesis ingeniero forestal. Universidad Nacional de Colombia. 98 p.

Schlegel, B., Gayoso, J., Guerra, J. (2001). *Manual de procedimientos para inventarios de carbono en ecosistemas forestales*. UACH - Chile. 26p

Potencial de la biomasa como fuente renovable de energía en las principales industrias forestales de la provincia de Guantánamo

MS.c. José Rolando Dupuy Parra[1]*, Dr.C René Lesme Jaén[2], Aldel Estiven Matos [3], MSc. Ignacio Utria Mendoza[4], Ing. Alejandro Soto Agüero[5]

[1]Centro de Aplicaciones Tecnológicas para el Desarrollo Sostenible, Área de Servicio Científico Técnico. Guantánamo, Cuba.

[2]Universidad de Oriente. Centro de Estudios Energéticos y Refrigeración "L.F.Brossard". Santiago de Cuba, Cuba.

[3]Empresa Agroforestal Imías. Área de la Dirección. Guantánamo, Cuba.

[4]Empresa Agroforestal Baracoa, Guantánamo, Cuba.

[5]UEB Muebles Imperio Guantánamo, Departamento de Desarrollo. Guantánamo, Cuba.

***Autor para correspondencia:** *jdupuyparra@gmail.com*

1. Introducción

En las últimas dos décadas, las naciones de la Alianza Europea y el mundo vienen liderando un marcado proceso de reforma energética, introduciendo modificaciones en sus políticas en materia de energía para promover de esta forma la fijación de los recursos renovables como primordial elemento de abasto energético del mundo (Ortega *et al.*,2022).

Para atender las demandas de suministro de energía eléctrica por medio del desarrollo de las fuentes de energía renovables presentes en las provincias de nuestro país (Sergio, 2022).

La biomasa forestal se considera un biocombustible seguro, renovable y neutro con respecto a las emisiones de CO_2 a la atmósfera. Además, como su aplicación para la generación de electricidad contribuye (Boletín Informativo renovale.cu No. 11/noviembre, 2020) a la sustitución de los combustibles fósiles, no sólo por su potencial mundial y su termo conversión, genera bajas emisiones de SO_2 y NO_X.

También es la única fuente renovable de energía capaz de sustituir a los combustibles fósiles en todas sus aplicaciones, para la generación de calor y la producción de combustibles líquidos para su uso en motores de combustión interna (Demirbas *et al.*, 2009).

La biomasa como fuente renovable de energía ha sido presentada como una fuente promisoria de energía alternativa para la sustitución de los combustibles fósiles, no sólo por su potencial mundial, sino porque es una fuente de CO2 neutral y su termo conversión genera bajas emisiones de SO_2 y NO_X (Demirbas *et al.*, 2009).

Las fuentes y tipos de biomasa son diferentes en cada país, sin embargo, especial atención merecen los residuos industriales, los cuales se generan durante los procesos de producción. Estos residuos, pueden ser utilizados como fuentes de energía, en los procesos termos químicos que convierten la energía química de la biomasa en energía térmica: Combustión, gasificación y pirolisis.

En la industria de elaboración de la madera en Cuba, se generan grandes cantidades de residuos, que se acumulan en áreas aledañas a la industria, no tienen un destino final útil y constituyen una fuente de contaminación ambiental (Dupuy *et al.*, 2019). Sin embargo, estos residuos, pueden ser utilizados como fuentes de energía, con lo cual se puede mitigar el cambio climático, disminuir el consumo de combustibles fósiles en la industria y, en consecuencia, diversificar su matriz energética.

En tal sentido nuestra provincia Guantánamo se encuentra en vía de desarrollar para el aprovechamiento de los residuos forestales que se generan en los principales aserríos y en los talles de la industria del mueble.

2. Materiales y Métodos

Los datos fueron tomados del Balance Anual de la Empresa Agroforestal Imías (Aserrío Pueblo Nuevo), Empresa Agroforestal Baracoa (Aserríos Toa y Cayogüin) y la UEB Muebles Imperio Guantánamo (Talles 102 y 103) en el departamento de producción en la extracción de madera para la industria de los años 2016-2018 como se observa en la Tabla 1 y Figura 1.

Figura 1. Principales Industrias procesadoras de madera de Guantánamo.

Tabla 1. Indicadores de Producción de madera aserrada en los aserríos de la provincia de Guantánamo.

Indicadores	U/M	Aserríos				Total
		Pueblo Nuevo	Toa	Cayogüin	Mueble Imperio	
Madera en Bolo	m3	134162,8	12987	22115		169264,8
Madera Aserrada	m3	15080,6	6849	11663	31412,65	65005,25
Leya para Carbón	m3	23117,2	2029	1029		26175,2
Carbón	Ton	95631	4097	4134		103862
Horas Trabajadas	Hr	1953	4097	4047	6037	16134

Tabla 3. Coeficientes de residuos en los aserríos primarios y secundarios.

Coeficientes de residuos primarios.		Coeficientes de residuos secundarios.	
Residuos	Valores	Residuos	Valores
CR aserrín.	0,16 m^3/m^3 bolos	CR aserrín.	0,91 m^3/m^3 madera
CR cotaneras.	0,21 m^3/m^3 bolos	CR virutas.	0,39 m^3/m^3 madera
CR astillas.	0,13 m^3/m^3 bolos	CR astillas.	0,22 m^3/m^3 madera
CR Total.	0,50 m^3/m^3 bolos	CR Total.	1,50 m^3/m^3 madera

En la tabla 4 se presentan los coeficientes de densidad aparente en función de los residuos primarios y los residuos secundarios de la madera. Estos coeficientes se establecen a partir deestudios realizados (Lesme *et al.*, 2006). para en los cuales de determino su potencial anual expresado en toneladasde petróleo equivalentes. En el caso estos coeficientes de la tabla 4 y las densidades aparentesde la madera a partir de la cantidad de madera en bolos y madera aserrada de la tabla1 y 2 en los últimos 5 años.

Tabla 4. Densidad de la madera para los residuos primarios y secundario.

Densidad de los residuos primarios		Densidad de los residuos secundarios	
Aserrín	200 kg/m^3	Aserrín	200 kg/m^3
Costanera	952 kg/m^3	Virutas	952 kg/m^3
Astilla	952 kg/m^3	Astilla	952 kg/m^3

También se determinó la cantidad de residuos tanto primarios, como secundarios y el total generado. Los cuales se obtuvieron utilizando las expresiones que se representan en la tabla 5.

Tabla 5. Expresiones para el cálculo de los de residuos en el aserrío primario y secundario.

Expresiones de los residuos primarios	Expresiones de los residuos secundarios
Aserrín $=C_R \times$ Madera en Bolo $\times \rho_{Aserrín}$	Aserrín $=C_R \times$ Madera en Aserrada $\times \rho_{Aserrín}$
Costanera$=C_R \times$ Madera en Bolo $\times \rho_{Costanera}$	Virutas$= C_R \times$ Madera en Aserrada $\times \rho_{Virutas}$
Astillas$=C_R \times$ Madera en Bolo $\times \rho_{Astillas}$	Astillas$=C_R$* Madera en Aserrada $\times \rho_{Astillas}$
T_P= Aserrín + Costanera + Astillas	T_S= Aserrín + Virutas + Astillas
TSP= TP + TS	

La ecuación 1 determina la disponibilidad horaria de los residuos, asumiendo que la mayor parte de estos residuos son de carácter orgánico, forman la denominada biomasa residual forestal, se puede llegar a comprender el hecho de que las grandes cantidades de residuos no se aprovechan y contaminan el medio ambiente puedan constituir un enorme potencial para la producción de energía limpia. La biomasa residual ofrece perspectivas muy amplias de aprovechamiento, ya que se produce de forma continua y creciente como consecuencia de laactividad humana y su eliminación está constituyendo un importante problema.

$$DH=\frac{T_{PS}}{T_{rabajadas}} \quad (1)$$

Donde: DH: Disponibilidad Horaria de los Residuos Forestales. T_{PS}: Total de residuos primarios y secundarios. $T_{rabajadas}$: Total de horas trabajadas en los aserríos y en la fábrica procesadora de madera.

Resaltar que después de tener la disponibilidad horaria se calculó el % de coeficiente de residuos forestales para la generación de electricidad para ellos se utilizó la ecuación 2.

$$\%_{CRF}=D_H \times Q^t_{b\ ponderada} \quad (2)$$

Donde: $\%_{CRF}$: % Coeficiente de residuos forestales para la generación de electricidad (MWh).: Ponderación de los residuos en los aserríos y la fábrica procesadora de madera de la provincia de Guantánamo (MJ/kg).

Para el cálculo de la ponderación de los residuos en los aserríos y la fábrica procesadora de madera de la provincia de Guantánamo se utilizaron los tres tipos de madera que se utilizan en el proceso productivo, como son el pino el cual el poder calorífico bajo fue de 16, 5 MJ/kg (Revilla, 2013), en el caso del haya fue de 17,5 MJ/kg (Lenis, 2018) y la teca es de 18,836 MJ/kg (Xavier, 2017). Estas dos ultimas maderas son procesadas en la fábrica de muebles imperio.

$$Q^t_{b\ ponderada}=(PCI_{Pino} \times TR_{Pino} \times PCI_{Haya} \times TR_{Haya}+PCI_{Teca} \times TR_{Teca})/Total_{RED}$$

Donde: PCI_{Pino}: Poder calorífico bajo del pino (MJ/kg). PCI_{Haya}: Poder calorífico bajo del haya (MJ/kg). PCI_{Teca}: Poder calorífico bajo de la teca (MJ/kg).

Después de haber realizado los cálculos correspondientes de los coeficientes de residuos forestales para la generación de electricidad podemos decir que debido al proceso de trasformación de los residuos forestales en un gasificador downdraft combo 80 acoplado a un motor de combustión interna (Figura 2), solo se aprovecha el 20% de la energía que contiene los residuos forestales (Bioenergy International, 2017), en el sistema de gasificación para la generación de electricidad por la ecuación 3.

$$\%_{Cee}=\%_{CRF} \times 20\% \quad (3)$$

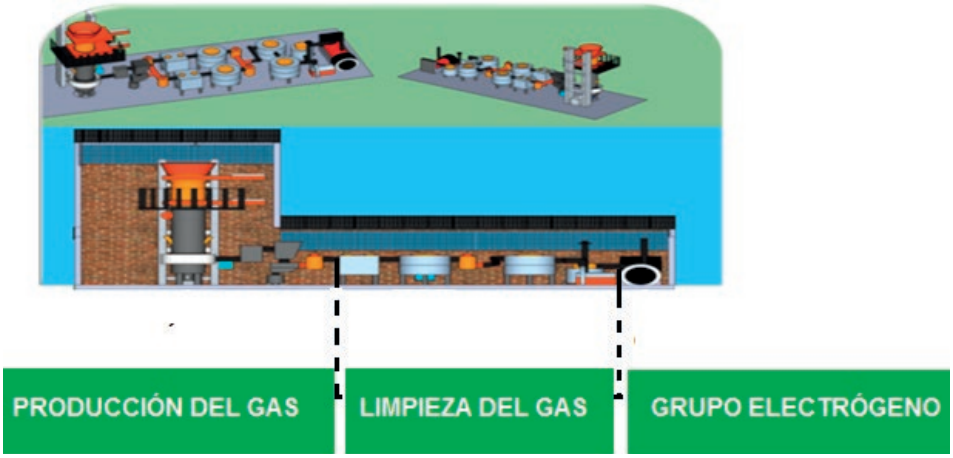


Figura 2. Esquema general de la tecnología de gasificador downdraft combo 80 acoplado a un motor de combustión interna para la generación de electricidad.

3. Resultados y Discusión

En la tabla 2 y figura 3 se muestra entre los resultados el total de residuos generado por los cuatros industrias procesadoras de madera en la provincia de Guantánamo, en la etapa estudiada arrojo que el aserrío Pueblo Nuevo de Imías es el que mas residuo genera con el 61% del total de los estudiados.

Tabla 2. Indicadores de Eficiencia energética con el uso de los residuos forestales en la provincia de Guantánamo.

Totas de Residuos	U/M	Aserríos				Total
		Pueblo Nuevo	Toa	Cayogüin	Mueble Imperio	
Total de Residuos	t	47718,8	9843,1	11405,3	9549,4	78516,6
Disponibilidad de los Residuos	kg/s	7,439	3,38	3,92	2,19	16,92
% Gasificación de los Residuos	MW	123	55,8	64,45	37,4	280,65
Aprovechamiento del 20% por Gasificación	MW	25	11,15	12,9	7,5	56,55

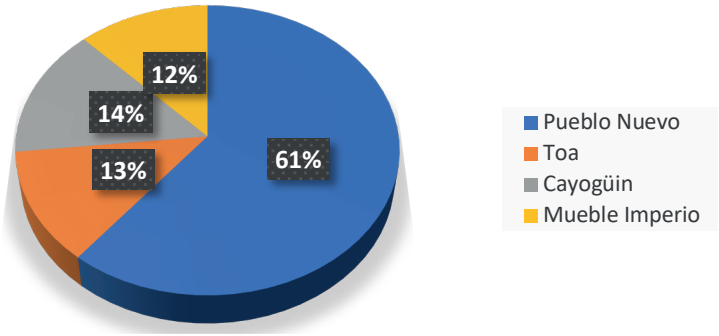


Figura 3. Comportamiento de la generación de residuos forestal por los centros procesadores de madera.

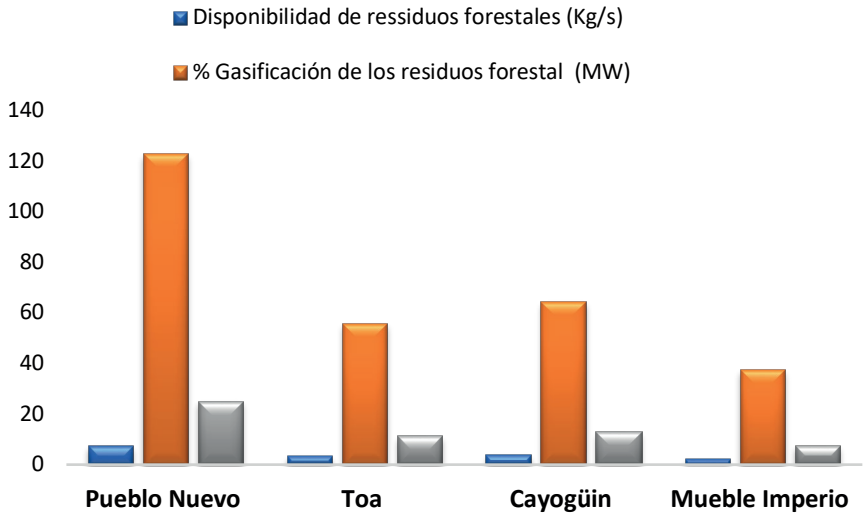


Figura 4. Comportamiento de los índices de eficiencias energéticas en los aserríos de Guantánamo.

Después de haber cálculo la disponibilidad horaria de residuos y teniendo en cuenta el total de residuos y la cantidad de horas trabajas en los cuatros empresas procesadoras de madera los resultados arrojan que hay una disponibilidad de 16,92 kg/s.

Para el cálculo del % de coeficiente de residuos forestales para la generación de energía eléctrica en los aserríos se tuvieron en la tabla 2 y figura 4 donde la disponibilidad horaria de residuos. De esta manera y con la ponderación de los poderes caloríficos bajos de las maderas se obtuvo que él % de coeficiente de residuos forestales es de 280,65 MW este resultado representa la energía que tiene acumulada los residuos forestales (biomasa) para la generación de electricidad.

Debido al proceso de trasformación de los residuos forestales en la gasificación de la biomasa (madera) se pierde el 80% de la energía que contiene los residuos forestales y solo se puede aprovechar el 20% como se muestra en la figura 5.

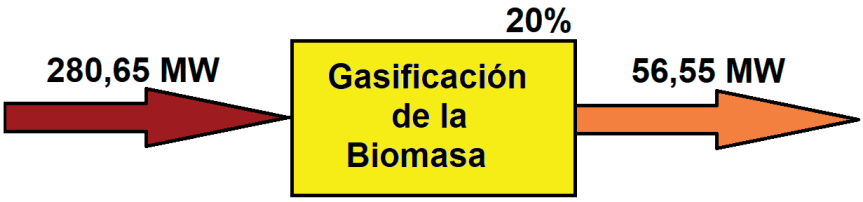


Figura 5. Proceso de pérdidas producto de la Gasificación de la Biomasa.

Como se puede apreciar en la figura 5 solo se puede generar 56,55 MW en el tiempo estudiado en las principales industrias procesadoras de madera de la provincia de Guantánamo Cuba, teniendo en cuenta que podrían eliminarse los consumos de combustible fósil para la generación de electricidad base en nuestra provincia y la una disminución de la emisión de gases contaminantes a la atmósfera (NO_x, SO_2) por este concepto de energía renovable utilizada como la biomasa forestal.

4. Conclusiones

Como se puede apreciar el uso de la biomasa como fuente renovable de energía es un campo muy diverso, en nuestro país Cuba existe un programa para aprovechar esta energía. Resaltar que en la provincia de Guantánamo posee un gran potencial para la generación de electricidad, teniendo en cuenta los cuatros industrias procesadoras de madera. En este sentido podemos resaltar al aserrío Pueblo Nuevo de Imías que representa el 61 % del total de los residuos que se generan en los procesos productivos, también posee la mayor capacidad de la disponibilidad de residuos forestales y su aprovechamiento del 20% en el proceso de gasificación de la madera.

Por todo lo antes planteado y después de concluido el estudio la potencia de la biomasa forestal se puede llegar ser de 56,55 MW, aunque puede llegar hacer insignificante esta potencia, pero en las condiciones energéticas que se encuentra mi país es un gran aporte. También se eliminarían la contaminación ambiental en doble sentido, en un primer momento por la acumulación de estos residuos por tiempo indefinidos en las áreas aledañas a estas industrias procesadoras de madera y que en la actualidad no tiene un destino final y el segundo lugar la eliminación de los gases contaminantes el medio ambiente como son el NO_x y SO_2 teniendo en cuenta que se elimina la combustión de combustible fósil para la generación de electricidad.

5. Referencias Bibliográficas

Bioenergy International (2017). 1er Trimestre Nº10 pp 18. Español. Disponible en: www.bioenergyinternational.es

Boletín Informativo renovale.cu No. (11/noviembre 2020). Publicación Mensual CITMA-MINBAS. ISSN: 2219-6919.

Demirbas, M.F., Balat, M., Balat, H. (2009). Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energy Convers. Manage., 50*, 1746–1760. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.03.013

Dupuy-Parra, J.R., Fernández Justiz. R,. Lesme-Jaén. R,. Videaux-Aguilar. M,. & Castillo-Durán, A. (2019). Efectos ambientales por la acumulación de los residuos forestales en el aserrío pueblo nuevo, Imías. *Hombre, Ciencia y Tecnología*. (23) 4.oct-diciem.45-52. ISSN: 1028-0871.

Lenis, Y.A. (2018). Generación de Gas de Síntesis de alto contenido de hidrogeno mediante Gasificación de Biomasa Acoplado a Energía Solar Térmica por Concentración., Tesis presentada en opción de título Doctor en Ciencias en la Universidad del Norte. Departamento de Ingeniería Mecánica, Colombia.

Lesme Jaén R, & Oliva Ruiz O.(2006). Coeficientes de residuos de la industria forestal. *Revista Tecnología Química, 26*(3), 26-29.

Ortega Castro, J.O., Tibanta–Narváez, E.T., & González-Valdez, K.M. (2022). Las Energías Renovables y la Sostenibilidad en Territorio *Ciencias Técnicas y Aplicadas.* (8). 2. abr-jun. 1401-1417. ISSN: 2477-8818.

Revilla, S.D. (2013). *Evaluación Termodinámica de un Gasificador Ankur Combo-80.* [tesis de grado, Universidad de Oriente]. Repositorio UO.

Sergio, A.A. (2022). Identificación y Aprovechamiento de los Recursos Energéticos Renovables en la Provincia del Neuquén, su Impacto en la Matrìz Energética de Generación Eléctrica y Socio-Económico de Escala Regional. [*tesis de Optar Maestría en Economía y Política Energético Ambiental, Universidad Nacional del Comahue*] Repositorio Universidad Nacional del Comahue.

Xavier, F. (2107). Caracterización de la Biomasa de Residuos Madereros de Pino, Teca y Raquis de Palma Africana como Combustible Térmico., Tesis presentada en opción de Ingeniero Ambiental. Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Ambientales. Chile.

Binomio ruralidad-bioenergía: retos, desafíos y soluciones desde proyectos situados. Argentina

Ada Graciela Nogar

CIC-CESAL-ReBiBir-Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, 7000 Argentina.

***Autor para correspondencia:** *nogargraciela02@gmail.com*

1. Introducción

La reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero en pos de evitar una catástrofe global es el reto que asumen las sociedades del s. XXI. La generación de energía a partir de fuentes fósiles es parte responsable de estas emisiones. Por ello, es que las tecnologías renovables materializan una nueva transición energética en la lucha contra el cambio climático, en la visualización de recursos, en la transformación de residuos en insumos y en el camino hacia el cumplimiento de los objetivos para el desarrollo sustentable (ODS). Considerando el contexto (crisis, transición, generación distribuida, acciones de proximidad) este artículo prioriza el análisis de proyectos de bioenergía a partir de residuos pecuarios para determinar las vinculaciones con los retos y desafíos de los ODS y comprender las ruralidades emergentes de las apropiaciones.

2. Metodología

El trabajo reúne avances de investigaciones individuales y colectivas, con eje en la generación distribuida, localizada y descentralizada. Se priorizaron los análisis de las articulaciones, móviles y barreras para identificar los vínculos de los proyectos de bioenergía con los retos y los límites planetarios. Un abordaje metodológico cuali-cuantitativo y un enfoque integral, permitieron dar cuenta de los actores, recursos y dispositivos. Las diferentes etapas de trabajo a veces secuenciales, otras simultáneas, otras recurrentes; posibilitaron los estudios holísticos de casos. (Martínez Carrazo *et al.*, 2006). De este modo, los resultados —si bien no generalizables— posibilitaron la construcción de síntesis y de nuevas aproximaciones conceptuales. Se triangularon datos de fuentes secundarias y primarias.

3. Resultados

El proyecto Bio-energía Gral. Alvear localizado en la Provincia de Buenos Aires, comenzó a producir en diciembre de 2020. Consta de dos biodigestores primarios y un pos biodigestor alimentados con efluentes porcinos, cama de pollo y silo (maíz o sorgo) localizado en una parcela contigua a la agroindustria porcina. La proporción de energía que utiliza para funcionar son 2 Megas/día de los 16 Megas/día que produce. Por otro lado, localizada en la Provincia de San Luis, Bio Energía Yanquetruz SA es productora de biogás, energía térmica, energía eléctrica y biofertilizantes elaborados en base a efluentes porcinos y cultivos energéticos. Mediante los biodigestores se maximiza la obtención de biogás para inyectar energía eléctrica al Sistema Integrado Nacional y abastecer el 100% de la energía térmica requerida por el criadero de cerdos y los cinco biodigestores con que cuenta. En este caso, ante la discontinuidad en el abastecimiento eléctrico de la red para el desarrollo de la agroindustria porcina, se decide generar energía térmica (1,5 MWt) y eléctrica (MWel) para autoabastecimiento. En los casos se observan diferencias, pero se resalta en este estudio la pertinencia de las apropiaciones para responder a la pregunta: ¿los proyectos de bioenergía son una solución a los límites planetarios, al control de las emisiones y una contribución a la estabilidad ambiental? Los primeros resultados muestran vínculos con los ODS como acceso a la energía (Yanquetruz), creación de infraestructura resiliente, innovación para disminuir el efecto invernadero, contribución a la transición hacia territorios menos críticos (ambos proyectos). En relación con el empleo, la formalidad y permanencia caracteriza estos proyectos que en los dos casos se ha cubierto con mano de obra local y regional. Las alianzas con cooperativas (Cooperativa de Saladillo y Asociación de Cooperativas Argentinas) junto a las universidades (UNSL y UNICen) ponderan las innovaciones y las articulaciones. Por otro lado, se valorizan los territorios, mutaciones que traspasan los límites de retorno energético ya que se observan aportes directos e indirectos con los ODS. Es notorio, que los obstáculos dificultan la producción; entre los que se destacan desde la alta inversión inicial hasta el incumplimiento de los compromisos por parte de los programas (RenovAR), desde los retos de la importación de tecnología e innovación hasta la capacitación, desde el manejo de residuos hasta la construcción de marcos regulatorios adscritos a nuevas alianzas territoriales.

4. Conclusiones

En este complejo escenario, la transición hacia apropiaciones territoriales que proponen la circularidad y la proximidad enmarcan los proyectos de bioenergía en estudio. Éstos generan nuevas prácticas socioespaciales rurales desde circuitos alternativos de producción y consumo basados en productos de proximidad e intercambio de servicios, que redireccionan las redes de integración multiescalar, al tiempo que transforman su entorno biosocial. Estos proyectos desafían las diferencias a partir de procesos multiescala que, al situarse, trastocan las dinámicas de las redes y de los flujos materializando cambios en los usos del suelo, en respuesta a los intereses/necesidades de los actores (públicos, privados colectivos). Los retos de los ODS son enormes y los Proyectos de bioenergía son parte de la solución.

5. Bibliografía

Chetty, S. (1996). The case study method for research in small- and medium - sized firms. *International small Business Journal, 15*(1), 73-85. https://doi.org/10.1177/0266242696151005

Martínez Carrazo, P. (2006). El método de estudio de caso: estrategia metodológica de la investigación científica. Pensamiento & Gestión [en línea]. Recuperado de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=64602005

Oportunidades y barreras de la producción de biogás en Argentina. El caso de la bioeléctrica General Alvear

Valentín Decunto[1]*, Antonio Riccillo[2]

[1]Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, CESAL, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Humanas, Tandil, 7000 Argentina.

[2]Grupo Riccillo, Bioeléctrica General Alvear, Saladillo, 7260 Argentina.

*Autor para correspondencia: *valentindecun@gmail.com*

1. Introducción

El uso de fuentes fósiles para satisfacer las necesidades energéticas de las sociedades modernas se relaciona directamente con el incremento de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera y consecuentemente con el cambio climático (Alonso *et al.*, 2006), (Gil *et al.*, 2016). A través del Acuerdo de París (2015), los países se han comprometido a disminuir sus emisiones de GEI; una de las estrategias empleadas es la promoción de las energías renovables. Argentina, en el contexto de su adhesión al Acuerdo y a los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030, en especial el N°7 referido a energía asequible y no contaminante, ha llevado adelante acciones y políticas para promover las energías renovables, iniciándose en el camino de la transición energética. Por ejemplo, a través de la creación del programa RenovAR se adjudicaron proyectos eólicos, solares y bioenergéticos. En particular, la generación de bioenergía a partir de residuos pecuarios es una tecnología cuyo desarrollo es incipiente (Mathier *et al.*, 2019). Pero que aun así comienza a manifestar sus potencialidades.

El objetivo de este trabajo es analizar las barreras y oportunidades que presenta la producción de bioenergía en General Alvear, Argentina, para determinar su aporte al proceso de transición energética, a la diversificación de los espacios rurales y a la transformación de residuos en energía.

2. Metodología

Para este trabajo se optó por el empleo de la triangulación metodológica, entendida como la aplicación y combinación de métodos cualitativos y cuantitativos en el estudio

de un mismo fenómeno (Denzin *et al.*, 1970). El trabajo se apoya en la recolección, lectura y comprensión de información secundaria proveniente de artículos científicos, artículos periodísticos e informes de instituciones nacionales e internacionales, que enmarcan y facilitan el entendimiento del caso de estudio abordado. También se empleó información primaria producto de entrevistas semiestructuradas (virtuales y presenciales) a actores referentes y de trabajo de campo realizado en el proyecto.

3. Resultados

La planta bioeléctrica consta de 3 biodigestores alimentados con efluentes porcinos, cama de pollo y silo (maíz o sorgo); entrega 1 Mwh de energía renovable a la red eléctrica. Según lo expresado por uno de los actores entrevistados, el principal inconveniente para el desarrollo de estas plantas es el acceso a financiamiento. De hecho, en primera instancia, el proyecto fue aprobado para ser financiado en el marco de un programa de fondos sectoriales; sin embargo, no pudo ser ejecutado. Posteriormente, se concretó a partir del programa RenovAR. Otra de las barreras identificadas es la inexistencia de un mercado nacional para los principales componentes de la planta, como los tanques, agitadores, bombas, entre otros. Sin embargo, también se destacan impactos positivos. Más allá de la evidente transformación de un residuo en energía, a partir del proyecto se han comenzado a forjar vínculos con instituciones públicas y privadas (nacionales e internacionales) que favorecen el intercambio de conocimiento y la innovación. También se abren oportunidades para la producción de biofertilizante a partir del biosol, lo cual, según lo expresado por uno de los actores entrevistados, generaría mayor valor agregado que la bioenergía.

4. Conclusiones

La generación de energía a partir de residuos pecuarios abre nuevas oportunidades en múltiples aspectos. El caso en análisis favorece la reducción de las emisiones de GEI, aporta al objetivo N°7 de los ODS y a la transición energética. A su vez, permite la revalorización de residuos, lo que favorece la economía circular y la bioeconomía; contribuye al surgimiento de relaciones multiescalares y a la diversificación de los espacios rurales como productores de energía renovable. Sin embargo, el desarrollo de estos proyectos no está exento de obstáculos, principalmente los referidos al financiamiento. Por ello, es importante la implementación de programas económicos y el compromiso político a mediano y largo plazo para favorecer proyectos similares y así materializar sus aportes.

5. Agradecimiento

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Agencia I+D+i).

6. Bibliografía

Alonso, S., Benito, G., Dachs, J., Montes, C., Pardo, M., Ríos, A., Simó, R., & Valladares, F. (2006). *Cambio global: impacto de la actividad humana sobre el sistema Tierra*. Compilado por Carlos Duarte. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Denzin, N.K. (1970). *Sociological Methods: a Source Book*. Chicago: Aldine Publishing Company.

Gil, S., Dutt, G. (2016). Energía, Panorama global. *Ciencia hoy, 25*(147), 13–17.

Mathier, D., Méndez, J.M., Bragachini, M., & Sosa, N. (2019). La biomasa y la bioenergía distribuida para el agregado de valor en origen. *Programa Nacional de Agregado de Valor, Agroindustria y Bioenergía INTA*.

Aprovechamiento integral de madera bajo un enfoque de biorrefinería basada en procesos hidrotérmicos

Carmina Reyes Plascencia[1]*, Matías Cagno[3], Pierre Cabot[3], Nestor Tancredi[1,2]

[1]Energías Renovables Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Pando, 91000 Uruguay.

[2]Área de Fisicoquímica, DETEMA, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, 11800 Uruguay.

[3]Centro de Investigaciones en Biocombustibles 2G, Latitud – Fundación LATU, Montevideo, 11500 Uruguay.

*Autor para correspondencia: *carmina@fq.edu.uy*

1. Introducción

El cambio climático ligado a la actividad antropogénica y la incertidumbre de los precios y disponibilidad de fuentes de hidrocarburos fósiles han llevado a muchos países a buscar alternativas de combustibles y productos de base biológica.

Una de las opciones que se han propuesto como deseables para la transformación de la biomasa en este tipo de productos es la biorrefinería, que permite obtener una amplia gama de productos que van desde energéticos, producidos a granel, hasta productos de alto valor agregado, como los farmacéuticos. El termino biorrefinería es adoptado como analogía a las refinerías de petróleo actuales, que producen múltiples combustibles y productos químicos a partir del petróleo (Kokossis *et al.,* 2014).

Según la Agencia Internacional de Energía (IEA) una biorrefinería es "Un procesamiento sostenible de la biomasa en un espectro de productos y energía comercializables" (IEA Bioenergy, 2009). Una definición más amplia es la propuesta por Moncada "Una biorrefinería es un sistema complejo, donde la biomasa se procesa o fracciona integralmente para obtener más de un producto que incluye bioenergía, biocombustibles, productos químicos y compuestos de alto valor añadido que solo se pueden extraer de fuentes de base biológica. Este último después de un estudio exhaustivo de las materias primas que se utilizarán y un diseño sostenible basado en las últimas tecnologías y enfoques de última generación que incluyen aspectos de los tres pilares de la sostenibilidad"(Moncada *et al.,* 2016).

Además de la versatilidad de productos, el enfoque de biorrefinería como un conjunto de operaciones unitarias interrelacionadas permiten que sean industrias con un uso de la energía más eficiente. Típicamente, todo el calor y parte de la electricidad utilizada en la planta es generada por la propia biorrefinería y la electricidad excedente es volcada a la red eléctrica (Azapagic, 2014) colaborando a la renovabilidad de la matriz eléctrica de la zona donde sea instalada.

Por otro lado, el uso de la biomasa como materia prima en las biorrefinerías acarrea diversos impactos benéficos tanto ambientales como sociales: la reducción de emisiones netas de gases de efecto invernadero, diversificación de la matriz energética, aumento de empleo en zonas rurales e inversión económica para la implementación de las tecnologías para su transformación, entre otros (Dale *et al.,* 2014), ver Figura 1.

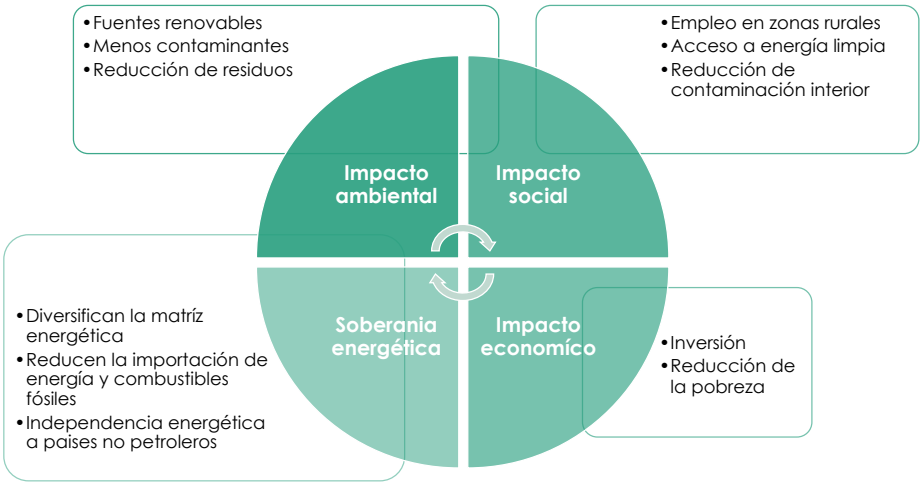


Figura 1. Impactos del uso de biomasa como materia prima de biorrefinería.

Sin embargo, su implementación aún presenta algunos retos, por ejemplo, la selección del portafolio de productos más rentables (Kokossis *et al.,* 2014), el uso integral de la biomasa, la optimización de los procesos de transformación, la flexibilidad en los tipos de materia prima, el escalado de los procesos.

2. Clasificación de las biorrefinerías según la materia prima

Las biorrefinerías pueden ser clasificadas según la biomasa que utilicen como materia prima. en primera, segunda o tercera generación, ver Figura 2, (Azapagic, 2014). Esta clasificación está ligada a la madurez de la tecnología para el procesamiento de la biomasa.

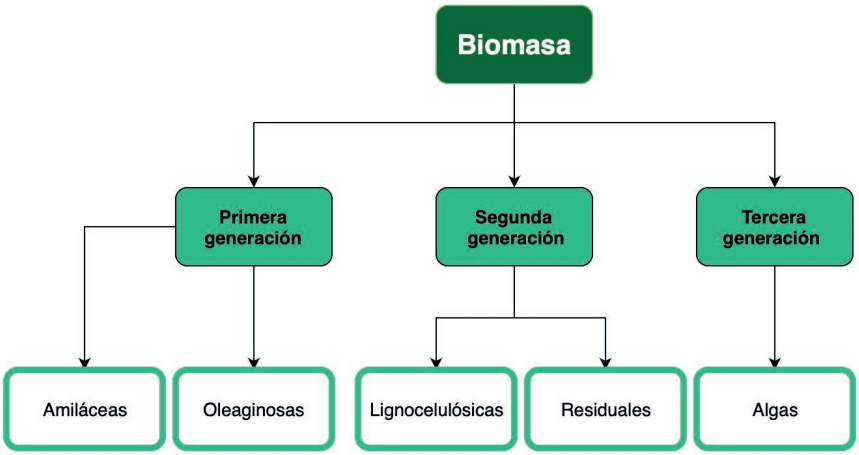


Figura 2. Generaciones de biorrefinería.

La primera generación (1G) se refiere a las biorrefinerías cuya materia prima provienen de biomasa comestible. Pueden ser biomasas oleaginosas que son fuentes de lípidos como la semilla de girasol, soya, lino, entre otros; alcoholígenas que son fuentes de monosacáridos o disacáridos como caña de azúcar, sorgo dulce o remolacha; o amiláceas como tubérculos o granos de cereales (de Lucas *et al.,* 2012). Este tipo de biomasas permiten obtener biocombustibles utilizando procesos microbiológicos, como la producción de bioetanol mediante la fermentación de glucosa, o procesos químicos, como la transesterificación de triglicéridos para la producción de biodiesel (Tajuddin *et al.,* 2016). Los métodos de transformación de este tipo de biorrefinerías son tecnológicamente maduros y se encuentran en escala comercial, como ejemplo se tiene el bioetanol 1G que representa el 80 % de los biocombustibles líquidos a nivel mundial (Azapagic, 2014).

A pesar de su amplia implementación, el uso de biomasas comestibles tiene algunos inconvenientes como el cambio de uso de suelo, la seguridad alimentaria, el aumento de uso de fertilizantes, entre otros. Esto ha llevado a cambiar el foco en biorrefinerías de segunda o tercera generación.

Las biorrefinerías de segunda generación (2G) utilizan biomasa lignocelulósica, incluyendo cultivos energéticos y residuos agrícolas o forestales, u otro tipo de residuo biomásicos para la producción de alimento animal, moléculas de interés y/o biocombustibles (Mohan *et al.,* 2016). Estas biomasas, a diferencia de la primera generación, no compiten por fuentes de alimento, su precio suele ser menor y en muchos casos permite una revalorización de sub-productos de otros procesos productivos. Sin embargo, su producción requiere de procesos más complicados ya que la estructura de este tipo de biomasas es compleja. En este capítulo se ahondará este tipo de biorrefinerías para el caso de residuos lignocelulósicos.

La tercera generación (3G) es referida al uso de algas, especialmente microalgas, como materia prima. Esta biomasa tiene diversas ventajas, una de las más notables es su rápida tasa de crecimiento y su eficiencia fotosintética, no es necesario el uso de

suelo y pueden ser cultivadas en efluentes residuales o con bajo contenido de nutrientes (Borowitzka *et al.,* 2013). Sin embargo, la madurez tecnológica para su uso aún es limitada.

Algunos autores (Moncada B *et al.,* 2016) mencionan una cuarta generación de biorrefinerías que utilizara el CO_2 como bloque de síntesis de otras moléculas.

3. Tipos de biorrefinería según el proceso de transformación

Las biorrefinerías también pueden diferenciarse según el tipo de procesos de transformación que se lleven a cabo para la obtención de los productos. Pueden basarse en procesos bioquímicos o termoquímicos o una combinación de ambos (Azapagic, 2014).

En las biorrefinerías bioquímicas se emplea el uso de microorganismos y/o enzimas para la transformación de la biomasa (Gonçalves *et al.,* 2016). Ejemplos de este tipo de procesos son la digestión anaerobia para la producción de biogás o la fermentación para la producción de alcoholes. Típicamente, este tipo de biorrefinerías requieren un pretratamiento de la biomasa que permita la accesibilidad de los componentes estructurales a los microorganismos, estos pretratamientos son de especial importancia en las biorrefinerías 2G.

Las biorrefinerías termoquímicas se basan en el uso de calor con o en ausencia de oxígeno (Azapagic, 2014). Entre los procesos termoquímicos se encuentra la combustión, gasificación, torrefacción, pirólisis y los métodos hidrotérmicos. Estos procesos suelen requerir un menor pretratamiento de la biomasa, por ejemplo, molienda para adecuar su talla y en algunos casos secado.

Las plantas bioquímicas se plantean para una menor inversión y capacidad con un procesamiento de alrededor de 10 ton día^{-1} y € 25-50 millones por planta. Mientras que las termoquímicas se proponen de capacidades del orden de 100 ton día^{-1} e inversiones de € 150-200 millones por planta (Kokossis *et al.,* 2014).

La integración de ambas rutas en uno o diversos puntos del procesamiento de la biomasa podría conducir a un aprovechamiento más eficiente aumentando la sostenibilidad del sistema. También contribuiría a la flexibilidad tanto de materias primas como de portafolio de productos (Kokossis *et al.,* 2014; Moncada *et al.,* 2016).

En este capítulo se presenta un caso de estudio de una biorrefinería 2G combinada para el aprovechamiento de biomasas lignocelulósicas. Este estudio se basa en el uso de procesos hidrotérmicos para su transformación, por lo que dichos procesos serán abordados con mayor profundidad.

4. Procesos hidrotérmicos en el contexto de una biorrefinería lignocelulósica

Los materiales lignocelulósicos son materias primas de gran interés en las biorrefinerías. Estos materiales pueden ser procesados mediante diversos procesos hidrotérmicos (PH) para la producción de materiales y/o biocombustibles sólidos, líquidos o gaseosos según las condiciones del proceso.

Los PH son procesos termoquímicos de transformación de la biomasa que se llevan a cabo en un medio rico en agua a temperaturas entre 150-600 °C y presiones

generalmente correspondientes a la presión de vapor de agua a la temperatura de trabajo (Reyes Plascencia *et al.,* 2021). Según la temperatura y el tiempo del proceso puede realizarse un pretratamiento de la biomasa o favorece el rendimiento de productos sólidos, líquidos o gaseosos, ver Figura 3.

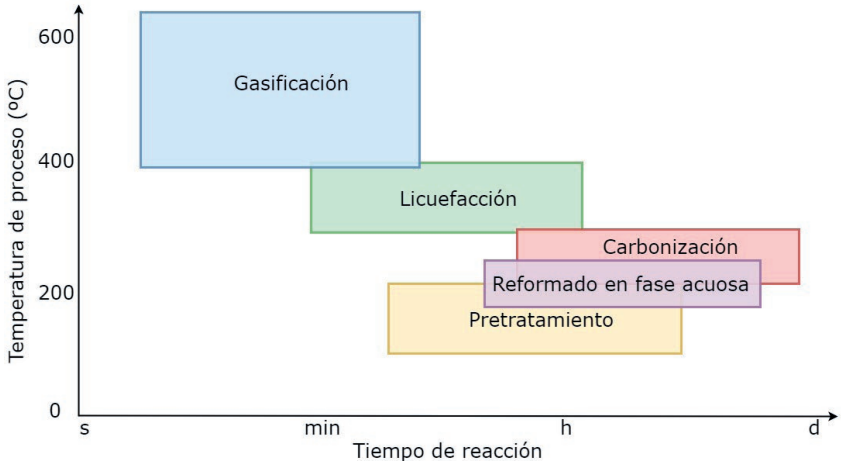


Figura 3. Procesos hidrotérmicos.

En el caso de la producción de etanol a partir de biomasas lignocelulósicas es necesario que la celulosa sea fácilmente accesible para el proceso de hidrólisis. Entre los métodos de pretratamiento se encuentran los métodos alcalinos, ácidos, explosión de vapor (EV) y organosolv (Fregoso-Madueño *et al.,* 2017).

Una de las tecnologías más exitosas es la EV. Esta técnica consiste en someter la biomasa a un tratamiento hidrotérmico mediante la rápida introducción de vapor saturado a alta presión (160-260 °C; 0.69-4.83 MPa) durante un breve período de tiempo (segundos a minutos). Como resultado, se produce una disrupción mecánica de la matriz lignocelulósica y una reducción del tamaño de partícula de la biomasa pretratada, una vez que la presión se reduce rápidamente. Durante el proceso a alta presión, el vapor condensa y penetra la biomasa, lo que provoca una reacción de autohidrólisis debido a los ácidos orgánicos generados por los grupos acetilo de las hemicelulosas (Duque *et al.,* 2014).

Después del tratamiento, se produce un residuo que consta de una parte líquida y otra sólida. La fracción líquida contiene hemicelulosas parcialmente hidrolizadas y prácticamente todos los productos de degradación (ácidos orgánicos, fenoles, furfural e hidroximetilfurfural), mientras que en la fracción sólida insoluble permanecen la celulosa, la hemicelulosa residual y la lignina modificada químicamente (Pereira Ramos, 2003). Posteriormente, la fracción sólida es hidrolizada para liberar los azúcares que son fermentables por las levaduras para obtener bioetanol.

La producción de bioetanol 2G produce diversos sub-productos que pueden ser valorizados, como el remanente del hidrolizado rico en lignina. Debido a que esta corriente tiene

una alta humedad, el uso de procesos que no requieran el secado del material es deseable, por lo que los procesos hidrotérmicos son de interés.

La carbonización hidrotérmica tiene como principal producto un sólido carbonoso conocido como hydrochar. Durante este proceso la estructura de la lignina sufre diversas reacciones como la deshidratación, desmetilación, desalquilación y ruptura de enlaces éter (β-O-4) (Wikberg *et al.,* 2015). También se ha reportado la formación de radicales fenólicos que condensan y repolimerizan produciendo hydrochar (Wikberg *et al.,* 2015). El hydrochar obtenido consiste en partículas esféricas nanométricas formadas por una estructura reticular térmicamente más estable que la lignina con grupos funcionales en la superficie (Zhu *et al.,* 2014).

Este hydrochar puede ser utilizado para diversos fines, por ejemplo, materiales de almacenamiento de energía (Lang *et al.,* 2021), combustible (Kang *et al.,* 2012), catalizadores heterogéneos (Huang *et al.,* 2016), celdas de combustibles (Cuña *et al.,* 2017), remediador de suelos (Puccini *et al.,* 2018), producción de carbón activado (Rodríguez Correa *et al.,* 2017), entre otros.

Por otro lado, la valorización de esta corriente por licuefacción hidrotérmica (LHT) permite obtener biocrudo como producto principal, el cual, además de sus propiedades como biocombustible, está compuesto por moléculas de interés comercial como fenol, guaiacol, catecol, siringol, m-cresol, p-cresol y o-cresol (Feng *et al.,* 2018; Jiang *et al.,* 2018; Kang *et al.,* 2013; Pińkowska *et al.,* 2012; Singh *et al.,* 2015). También presenta propiedades antioxidantes que están directamente relacionadas a su contenido de sustancias fenólicas, lo que lo convierte en un potencial aditivo para mejorar la estabilidad oxidativa del biodiesel (Ye *et al.,* 2012).

Uno de los principales problemas de la LHT es la repolimerización de los subproductos que compromete el rendimiento del biocrudo (Mei *et al.,* 2018). Para enfrentar este problema una alternativa es el uso de co-solventes orgánicos que ayudan a obtener una mayor conversión de la biomasa y aumenta el rendimiento de biocrudo al disolver los productos de la degradación de la lignina evitando su repolimerización (Arturi *et al.,* 2017; Feng *et al.,* 2018; Ye *et al.,* 2012).

5. Caso de estudio

Introducción

Los residuos forestales son ampliamente producidos en Uruguay, lugar donde se desarrolló este trabajo, siendo el *Eucalyptus* y el *Pinus* los géneros de mayor producción, de los cuales existían más de 300 000 ha plantadas en el 2016 (Pou Ferrari, 2016). Aunque el volumen de eucalipto disponible es mayor, ya se encuentra comprometido para otros usos con buena demanda comercial (Paseyro, 2015). Por otro lado, el suministro de madera de pino supera varias veces la demanda (Uruguay XXI, 2021). De acuerdo con una encuesta reciente, los principales aserraderos del país reportaron que los residuos de madera de pino anhidro alcanzan las 477,090 toneladas anuales (Böthig *et al.,* 2021).

Debido a la amplia disposición de esta biomasa en el país, en este estudio se propone su valorización integral mediante la producción de biocombustibles y biocompuestos de

alto valor comercial. Para esto se conceptualizó una biorrefinería combinada basada en procesos hidrotérmicos tanto para el pretratamiento de la biomasa como para el aprovechamiento de la fase rica en lignina. El pretratamiento seleccionado para su estudio fue explosión por vapor y la LHT para la transformación de la lignina residual. Los detalles de los procesos se muestran en la Figura 4, dónde los recuadros en rojo son los procesos estudiados y los verdes corresponden a los productos principales.

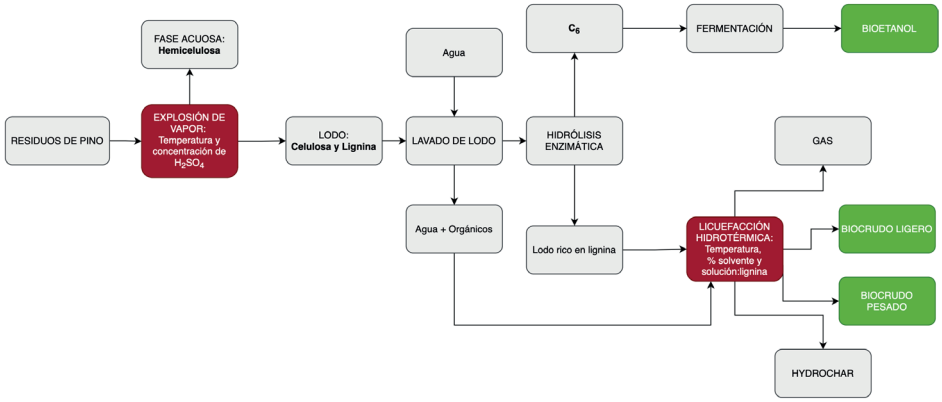


Figura 4. Proceso propuesto para la valorización de residuos lignocelulósicos.

Uno de los principales objetivos de este trabajo es estudiar el proceso de EV para favorecer la producción de bioetanol en las etapas posteriores ya que los procesos previos a la fermentación tienen una gran influencia en la composición y la fermentabilidad del hidrolizado. Es por ello que para poder optimizar la producción de bioetanol es necesario realizar un estudio exhaustivo de EV para saber cuál es su influencia en las etapas posteriores. Para ello se estudiaron las variables más relevantes del proceso como son: la temperatura del proceso, el tiempo de retención de la madera y el uso de catalizadores.

Otro de los objetivos principales de este trabajo es estudiar la influencia de las condiciones de reacción en el rendimiento y la composición del biocrudo producido por LHT de lignina. Para ello se estudiaron las variables de mayor influencia en el proceso como son: la temperatura, la relación solución:biomasa en el medio de reacción y el uso del bioetanol como co-solvente en el proceso.

Uno de los principales problemas de la LHT, desde un punto de vista ambiental, es la gran cantidad de agua que se utiliza en el medio de reacción, la cual debe ser tratada antes de su disposición final debido a la presencia de compuestos orgánicos. Una de las propuestas de este trabajo es disminuir el uso de agua en el proceso de transformación de la madera al utilizar el agua residual del lavado del lodo producido por EV en el proceso de LHT, ver Figura 4.

Metodología

Se recolectaron 200 kg de aserrín verdes donados por la empresa Frutifor (Tacuarembo, Uruguay). Estos fueron secados a 40 °C hasta 10 % de humedad para preservar su integridad y posteriormente fueron molidos y tamizados obteniendo partículas menores a 3 mm.

Las muestras fueron acondicionadas el día previo a ser tratadas, según su contenido de humedad, para alcanzar un valor de 30% de contenido de humedad final. En el caso que la muestra requería agregado de ácido, se hizo junto con el agregado del agua. Luego de finalizado el proceso, se recogió un barro que se separó en una fracción líquida y una sólida. La fracción sólida fue lavada 3 veces con agua a 60 °C, en una proporción de 5:1 en peso. Las muestras de fracción sólida, fracción líquida, las aguas de lavado y condensado obtenidas a partir del proceso de explosión por vapor, fueron reservadas para su posterior análisis.

Los ensayos de EV se realizaron en un rango de temperaturas de 180-200 °C por tiempo de retención de 10 min y se estudió el efecto del H_2SO_4 como catalizador (0-1 % m/m). El lodo rico en celulosa fue hidrolizado siguiendo el procedimiento NREL TP-5100-63351.

Luego de culminada la hidrólisis se procedió a separar el hidrolizado del barro rico en lignina. Se centrifugó el hidrolizado a 12000 rpm por 15 minutos y se separó el barro. El hidrolizado con mayor cantidad de glucosa fue seleccionado para su fermentación.

El lodo rico en lignina y el agua de lavado fueron utilizados como materia prima para la LHT. Para estudiar el efecto de las condiciones del proceso en el rendimiento de biocrudo se utilizó un diseño experimental Box-Behnken con triplicado en el punto central. Los parámetros estudiados fueron: la temperatura de reacción (250-350 °C), la relación solvente:lodo (S:L; 3:1-9:1) y la composición del solvente (0-100 % de etanol) utilizando un tiempo de retención de 90 min en todos los casos.

Las fracciones sólida y líquida rica en agua-etanol fueron recuperadas y filtradas para separarlas. Tanto el sólido como las paredes del reactor fueron lavadas con acetona y esta acetona de lavado fue filtrada. Este sólido, denominado hydrochar, se secó a 105 °C hasta peso constante. La solución de acetona fue evaporada al vacío para recuperar los compuestos orgánicos, los cuales fueron pesados y denominados como biocrudo pesado.

La fase líquida rica en alcohol se evaporó al vacío para recuperar el etanol y el agua. Los compuestos orgánicos remanentes fueron pesados y denominados como biocrudo ligero.

Los biocrudos fueron caracterizados por GC-MS con la finalidad de identificar compuestos de interés industrial.

6. Resultados

Explosión de vapor

Se observó que la variable más significativa del proceso de EV fue el agregado de ácido. A mayor severidad del tratamiento la composición de lignina insoluble en ácido en la fracción sólida fue mayor ya que se hidroliza una mayor cantidad de glucano y xilano. En la condición menos severa (180 °C sin agregado de ácido) sigue quedando un remanente de xilosa sin hidrolizar.

En cuanto al proceso de hidrólisis, se observó que a mayor severidad del pretratamiento se logra obtener una mayor concentración de azúcares libres. La condición que mostró mayor liberación de azúcares libres en solución es la condición de pretratamiento más severo (200 °C y 1% de H_2SO_4). Esto se debe a una mayor accesibilidad a las cadenas de celulosa por parte de la enzima, gracias a una mayor rotura de la matriz lignocelulósica. En las condiciones más severas se obtuvieron rendimientos de hidrólisis de 90 % en relación a la cantidad de glucano existente en la fracción sólida.

Se observó que los valores de rendimiento global, tomando en cuenta el pretratamiento y el hidrolizado, es maximizado con el agregado del ácido. El mayor rendimiento se consiguió con el pretratamiento más severo, logrando un rendimiento global de un 50%, según la cantidad de azúcares fermentables obtenidos en el hidrolizado con relación a la cantidad de glucano existente en la materia prima.

Licuefacción hidrotérmica

Se determinó la humedad del barro rico en lignina para realizar el ajuste de la relación S:L. La humedad obtenida fue de 75.47±0.12 % (b.h.). En el caso de los ensayos donde la cantidad de fase acuosa fue mayor que la existente en el barro, se utilizó el agua de lavado para ajustarla. Por el contrario, en los ensayos donde el contenido de fase acuosa fue menor que la existente en el barro, éste se secó a 105 °C hasta peso constante, y en caso de ser necesario se agregó la cantidad de fase acuosa utilizando agua de lavado.

Se observó que el rendimiento del biocrudo ligero obtenido varía entre 3.0-25.7 % siendo la relación S:L y la concentración de etanol en el medio los parámetros de mayor influencia. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis ANOVA. Se obtuvo una ecuación lineal estadísticamente significativa, donde los términos que tienen influencia en el rendimiento del biocrudo ligero son la relación S:L y la presencia de etanol en el medio. La temperatura no fue un término estadísticamente significativo por lo que este parámetro no fue incluido en el modelo refinado. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 5. Se observa que el biocrudo es maximizado al trabajar con concentración elevada de etanol en el medio de reacción y alto contenido de solvente. El poder calorífico inferior de este biocrudo estimado por su composición elemental es dependiente de las condiciones del proceso, rondando entre 16.1-26.1 MJ kg^{-1}.

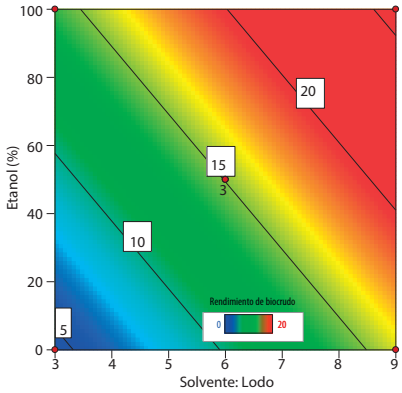


Figura 5. Predicción del rendimiento de biocrudo ligero (los puntos rojos representan las condiciones ensayadas experimentalmente).

En tanto que el rendimiento del biocrudo pesado varía entre 41.2-2.4 % en las condiciones del proceso estudiadas siendo, al igual que para el ligero, la relación S:L y la concentración de etanol en el medio los parámetros de mayor influencia. El poder calorífico inferior de este biocrudo es mayor que el del biocrudo ligero, rondando entre 23.4-33.3 MJ kg^{-1}. En la Figura 6, se presenta las predicciones de los rendimientos obtenidos con el análisis ANOVA. La temperatura no es presentada en el análisis ya que no fue un parámetro estadísticamente significativo en el modelo. Se observó que este biocrudo aumenta su rendimiento con una mezcla de etanol-agua en el medio de reacción y al trabajar con alto contenido de solvente.

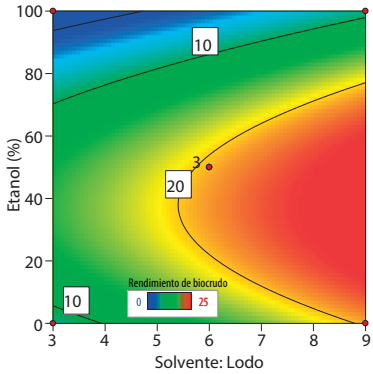


Figura 6. Predicción del rendimiento de biocrudo pesado (los puntos rojos representan las condiciones ensayadas experimentalmente).

Conclusiones del caso de estudio

Mediante este estudio se propuso una ruta de valorización de los residuos lignocelulósicos nacionales utilizando una biorrefinería combinada, basada en procesos hidrotérmicos en la fase del pretratamiento de la biomasa y en la valorización de la lignina residual de la producción de bioetanol. Se optimizaron las condiciones de EV obteniendo los máximos rendimientos de glucosa a 200 °C utilizando H_2SO_4 1% m/m. Las condiciones de LHT también fueron optimizadas. Se determinó que el biocrudo ligero es maximizado al trabajar con etanol mientras que el pesado con una mezcla de etanol-agua, ambos biocrudos son favorecidos a altas relaciones S:L. El máximo rendimiento de biocrudo (ligero + pesado) fue de 41.3 % obtenido a 350 °C, 50 % de etanol y S:L 9:1. Además se identificaron en los biocrudos compuestos como fenoles y benzaldehídos que son de interés para la industria química. Se determinó que con los rendimientos máximos obtenidos es posible producir 52 kg de etanol y 196 kg de biocrudo por tonelada de biomasa.

7. Conclusiones generales

El desarrollo de biorrefinerías ha cobrado mayor interés debido al aumento de gases de efecto invernadero y problemáticas ligadas a la seguridad energética. Uno de los principales focos es el desarrollo de biorrefinerías 2G que permitan la utilización de biomasas residuales y/o lignocelulósicas como materia prima. Su implementación permitirá por un lado un mejor manejo de los residuos y por otro la generación de combustibles y compuestos químicos de base biológica limitando la dependencia de los recursos fósiles.

Se espera que este tipo de instalaciones integren procesos bioquímicos y termoquímicos que permitan optimizar el aprovechamiento de la biomasa y maximizar el portafolio de productos. Se busca que la recuperación de sustancias de alto valor agregado en conjunto con la producción de biocombustibles permita disminuir el costo final de los biocombustibles haciéndolos competitivos con los combustibles fósiles.

En este trabajo se propone la valorización de residuos lignocelulósicos nacionales mediante biorrefinería 2G que utiliza procesos hidrotérmicos en conjunto con bioquímicos para el procesamiento de la biomasa. Mediante la ruta propuesta fue posible obtener bioetanol 2G y biocrudo, ambos con la posibilidad de ser utilizados como biocombustibles e insumo en la industria química.

La implementación a gran escala de las biorrefinerías 2G requiere de conocimientos multidisciplinarios que garanticen la óptima configuración y funcionamiento de la biorrefinería, aseguren su viabilidad económica y garanticen la sostenibilidad de todos los procesos relacionados con su funcionamiento, además de la implementación de políticas regulatorias que impulsen su desarrollo. Sin embargo, la transición a una economía circular y verde requiere del impulso de este tipo de tecnologías.

8. Bibliografía

Arturi, K.R., Strandgaard, M., Nielsen, R.P., Søgaard, E.G., & Maschietti, M. (2017). Hydrothermal liquefaction of lignin in near-critical water in a new batch reactor: Influence of phenol and temperature. *The Journal of Supercritical Fluids*, *123*, 28–39. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.015

Azapagic, A. (2014). Sustainability considerations for integrated biorefineries. *Trends in Biotechnology*, *32*(1), 1–4. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.009

Borowitzka, M.A., & Moheimani, N.R. (2013). Sustainable biofuels from algae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, *18*(1), 13–25. https://doi.org/10.1007/s11027-010-9271-9

Böthig, S., & Arrejuría, S. (2021). *Residuos de la cadena de transformación mecánica de la madera en Uruguay*. Retrieved from https://www.latitud.org.uy/media/Stephany-Arrejuria_Residuos-de-la-cadena-de-transformación-mecánica-de-la-madera-en-Uruguay.pdf

Cuña, A., Reyes Plascencia, C., da Silva, E.L., Marcuzzo, J., Khan, S., Tancredi, N., Baldan, M.R., & de Fraga Malfatti, C. (2017). Electrochemical and spectroelectrochemical analyses of hydrothermal carbon supported nickel electrocatalyst for ethanol electro-oxidation in alkaline medium. *Applied Catalysis B: Environmental*, *202*, 95–103. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.08.063

Dale, B.E., Anderson, J.E., Brown, R.C., Csonka, S., Dale, V.H., Herwick, G., Jackson, R.D., Jordan, N., Ka, S., Kline, K.L., Lynd, L.R., Malmstrom, C., Ong, R.G., Richard, T.L., Taylor, C., & Wang, M.Q. (2014). Take a Closer Look: Biofuels Can Support Environmental, Economic and Social Goals. *Environmental Science & Technology*, *48*(13), 7200–7203. https://doi.org/10.1021/es5025433

De Lucas, A., & Taraco, C. (2012). *Biomasa, biocombustibles y sostenibilidad* (ITAGRA, Vol. 1).

Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., González, A., & Ballesteros, M. (2014). Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresource Technology*, *158*, 262–268. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.041

Feng, S., Wei, R., Leitch, M., Xu, C.C., Charles, C., & Xu, C.C. (2018). Comparative study on lignocellulose liquefaction in water, ethanol, and water/ethanol mixture: Roles of ethanol and water. *Energy*, *155*, 234–241. https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.05.023

Fregoso-Madueño, J.N., Goche-Télles, J.R., Rutiaga-Quiñones, J.G., González-Laredo, R.F., Bocanegra-Salazar, M., & Chávez-Simental, J.A. (2017). Usos alternativos de los desechos de la industria del aserrío. In Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente (Vol. 23, Issue 2, pp. 243–260). Universidad Autonoma Chapingo. https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2016.06.040

Gonçalves, F.A., Ruiz, H.A., Silvino dos Santos, E., Teixeira, J.A., & de Macedo, G.R. (2016). Bioethanol production by Saccharomyces cerevisiae, Pichia stipitis and Zymomonas mobilis from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept. *Renewable Energy*, *94*, 353–365. https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.045

Huang, M., Luo, J., Fang, Z., & Li, H. (2016). Biodiesel production catalyzed by highly acidic carbonaceous catalysts synthesized via carbonizing lignin in sub- and super-critical ethanol. *Applied Catalysis B: Environmental*, *190*, 103–114. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.02.069

IEA Bioenergy. (2009). *Biorefineries: adding value to the sustainable utilisation of biomass*.

Jiang, W., Kumar, A., & Adamopoulos, S. (2018). Industrial Crops & Products Liquefaction of lignocellulosic materials and its applications in wood adhesives — A review. *Industrial Crops & Products*, *124*(July), 325–342. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.053

Kang, S., Li, X., Fan, J., & Chang, J. (2012). Solid fuel production by hydrothermal carbonization of black liquor. *Bioresource Technology*, *110*, 715–718. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.093

Kang, S., Li, X., Fan, J., & Chang, J. (2013). Hydrothermal conversion of lignin: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *27*, 546–558. https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.07.013

Kokossis, A.C., Tsakalova, M., & Pyrgakis, K. (2014). Design of integrated biorefineries. *Computers and Chemical Engineering*, *81*, 40–56. https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2015.05.021

Lang, J., Matějová, L., Cuentas-Gallegos, A.K., Lobato-Peralta, D.R., Ainassaari, K., Gómez, M.M., Solís, J. L., Mondal, D., Keiski, R. L., & Cruz, G. J. F. (2021). Evaluation and selection of biochars and hydrochars derived from agricultural wastes for the use as adsorbent and energy storage materials. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(5). https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105979

Mei, Q., Shen, X., Liu, H., & Han, B. (2018). Selectively transform lignin into value-added chemicals. *Chinese Chemical Letters*, *30*, 15–24. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.04.032

Mohan, S.V., Butti, S.K., Amulya, K., Dahiya, S., & Modestra, J.A. (2016). Waste Biorefinery: A New Paradigm for a Sustainable Bioelectro Economy. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 34, Issue 11, pp. 852–855). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.006

Moncada, B.J., Aristizábal, M.V., & Cardona, A.C.A. (2016). Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, *116*, 122–134. https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.009

Paseyro, J. (2015). Más vale especie conocida que otra por conocer. *Forestal*, 16–22.

Pereira Ramos, L. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova*, *26*(3), 863–871. https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600015

Pińkowska, H., Wolak, P., & Złocińska, A. (2012). Hydrothermal decomposition of alkali lignin in sub- and supercritical water. *Chemical Engineering Journal*, *187*, 410–414. https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.092

Pou Ferrari, R. (2016). *Forestación en Uruguay* (Primera). Montevideo: Plus-ultra.

Puccini, M., Ceccarini, L., Antichi, D., Seggiani, M., Tavarini, S., Latorre, M.H., & Vitolo, S. (2018). Hydrothermal carbonization of municipal woody and herbaceous prunings: Hydrochar valorisation as soil amendment and growth medium for horticulture. *Sustainability (Switzerland)*, *10*(3). https://doi.org/10.3390/su10030846

Reyes Plascencia, C., & Tancredi, N. (2021). Valorización de los residuos sólidos municipales: conveniencia de los métodos hidrotérmicos. In B. Velázquez Martí (Ed.), Optimización de los procesos de extracción de biomasa sólida para uso energético (1st ed., Vol. 1, pp. 273–291). España: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

Rodríguez Correa, C., Stollovsky, M., Hehr, T., Rauscher, Y., Rolli, B., & Kruse, A. (2017). Influence of the Carbonization Process on Activated Carbon Properties from Lignin and Lignin-Rich Biomasses. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *5*(9), 8222–8233. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01895

Singh, R., Balagurumurthy, B., Prakash, A., & Bhaskar, T. (2015). *Bioresource Technology Catalytic hydrothermal liquefaction of water hyacinth*. *178*, 157–165. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.119

Tajuddin, N.A., Lee, A.F., & Wilson, K. (2016). Production of biodiesel via catalytic upgrading and refining of sustainable oleagineous feedstocks. In *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies*: Second Edition (pp. 121–164). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100455-5.00006-0

Uruguay XXI. (2021). *Sector forestal en Uruguay*. Retrieved https://www.uruguayxxi.gub.uy/uploads/informacion/a29771e03cc49e42fe516c01b0d271dc0fcf4cbe.pdf/

Wikberg, H., Ohra-Aho, T., Pileidis, F., & Titirici, M.M. (2015). Structural and Morphological Changes in Kraft Lignin during Hydrothermal Carbonization. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *3*(11), 2737–2745. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00925

Ye, Y., Fan, J., & Chang, J. (2012). Effect of reaction conditions on hydrothermal degradation of cornstalk lignin. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *94*, 190–195. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2011.12.005

Zhu, Z., Toor, S. S., Rosendahl, L., & Chen, G. (2014). Analysis of Product Distribution and Characteristics in Hydrothermal Liquefaction of Barley Straw in Subcritical and Supercritical Water. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, *33*(3), 737–743. https://doi.org/10.1002/ep.11977

Evaluación del potencial energético del cambio de cultivo de *Citrus reticulata* var. Murcott por *Citrus unshiu* mandarina satsuma

Mary Flor Césare Coral[1]*, Angela Tiffany Castillo Híjar[2], Pablo Guamán Eras[,2,6], Alejandrina Sotelo Mendez[4], José Manuel Alejandro Cerdán Morillo[1], José Luis Calle Maravi[2], Jhon Romero[5]

[1]Facultad de Ciencias - Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Molina s/n, La Molina, Perú.

[2]Facultad de Ingeniería Agrícola - Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Molina s/n, La Molina, Perú.

[3]Maestría en Ciencias Ambientales - Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Molina s/n, La Molina, Perú.

[4]Facultad de Zootecnia - Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Molina s/n, La Molina, Perú.

[5]Empresa Pozo Alto S.A.C

[6]Vicerrectorado de Investigación y Vinculación con la Sociedad - Universidad Intercultural de las Nacionalidades y Pueblos Indígenas Amawtay Wasi, Ecuador.

*Autor para correspondencia: *mcesare@lamolina.edu.pe*

1. Introducción

El cambio de plantaciones de mandarina W. Murcott (*Citrus reticulata* var. Murcott) al declinar su producción por su desarrollo fenológico propio (20 años aproximadamente), afronta problemas de manejo de los residuos por el proceso de: podas, raleo y reemplazo de este cultivo, por ello se ve la necesidad de reemplazar esta variedad por otra variedad de fácil manejo para su mantenimiento y de gran producción como son las mandarinas satsuma (*Citrus unshiu*). El reemplazo de 65 hectáreas de mandarina Murcott en el fundo Pozo Alto S.A.C., ubicado en la Carretera Panamericana Sur km. 37.5, genera gran cantidad de residuos orgánicos (troncos, ramas y hojas) que no tienen demanda comercial, los cuales impactan el medio ambiente tanto por la presencia de patógenos vegetales así como la liberación de emisiones líquidas y gaseosas producto de la descomposición, que contaminan el suelo, aire y agua; cabe mencionar que estos residuos se caracterizan por presentar alto contenido de compuestos lignocelulósicos (lignina, celulosa y hemicelulosa), nutrientes y minerales, así mismo, indicar que su disposición final a un relleno sanitario constituye un gran problema económico para el productor por los altos costos de su disposición, esto implica por consiguiente usar como tratamiento la quema del material al aire libre como

método sanitario, a fin de evitar la proliferación de vectores de enfermedades, sin embargo este método genera gases de efecto invernadero que contaminan la atmósfera (Figura 1).

Figura 1. Residuos de la poda de mandarina murcott.

Por lo expuesto anteriormente, se ve conveniente la producción de carbón mediante la pirólisis, valorizando este material como carbón vegetal, mediante el uso de horno tipo parva, lo cual brinda una serie de ventajas frente a la combustión directa de la madera como leña o las astillas, por su elevado contenido energético especialmente en relación al valor calórico, en el Perú, el consumo de leña y carbón vegetal destaca como un motor de degradación de algunos bosques endémicos (como los bosques secos de algarrobo), pero también como una fuente de energía. El consumo de leña y carbón vegetal siempre ha desempeñado un papel importante en el cuadro energético (principalmente en la preparación doméstica y comercial de alimentos), hasta el punto que en el año de 1999 fue la segunda fuente energética después del diésel.

El carbón vegetal es usado como combustible en las grandes ciudades como Lima, mayoritariamente para uso residencial los fines de semana, para la cocción de alimentos en los restaurantes de comida rápida (Tafur y Fuks, 2017). Así mismo, recalcar que el desarrollo del carbón vegetal brinda una serie de ventajas frente a la quema directa, la demanda de carbón vegetal para cocción de alimentos es alta para el mercado de preparación de pollos a la brasa; plato de alto consumo en el Perú, el cual representa aprox. 750 mil pollos los fines de semana a nivel nacional con un incremento de 25% los feriados. En una pollería el consumo promedio de carbón al día es aproximadamente de 10 a 20 kilos (El Tiempo, 2029). Así mismo, los Distritos ecológicos como San Borja y San Isidro cuentan con acciones para disminuir su huella ecológica, ubicándose aproximadamente 40 pollerías con un consumo de 100 pollos diarios por local, significando un consumo aproximado entre 400 a 800 kilos de carbón por día, lo cual hace atractiva la producción de carbón vegetal por su alta demanda en este rubro.

Las tecnologías más utilizadas para la producción de carbón vegetal son diversas y atiende a una inversión inicial necesaria para la construcción, las cuales pueden ser completamente manuales, artesanales e industriales. En los últimos años el uso de carbón vegetal ha incrementado de forma creciente en un 4 % aproximadamente. El uso del mismo,

tiene un componente social y cultural, la elaboración se realiza tanto de manera artesanal e industrial de diferentes especies y residuos forestales, en gran parte la elaboración del carbón (Figura 2) afecta de manera negativa al medio ambiente, debido a que en algunos casos su producción se realiza de manera artesanal y en hornos rudimentarios, sin lograr un grado de eficiencia sostenible (Catellanos, 2021).

Figura 2. Carbón de la biomasa de mandarina W. Murcott.

El carbón vegetal se lo obtiene con la combustión lenta y parcial de la biomasa leñosa, es el resultado de un tratamiento térmico con un contenido bajo de oxígeno, es decir, de un proceso termoquímico, el cual contiene cierto porcentaje de humedad y la temperatura de 250 a 600°C. El contenido calórico del carbón vegetal varía entre unas 6000 a 8000 kcal/kg según el contenido de cenizas (Fernández, 2020).

Según Becerra (2017), el carbón vegetal se utiliza para dos funciones:

a. Carbón en la metalurgia, su producción requiere diversas técnicas exigentes, para el proceso de carbonización el cual debe conducirse a temperaturas de 650°C aproximadamente, la calidad de este carbón cumple con ciertas normas como su densidad, poco quebradizo y con alta resistencia, así mismo, su composición química debe poseer un porcentaje mínimo de cenizas y materia volátil. Los usos de estos son dentro de la industria de la metalurgia, la fundición de los metales y en la reducción de mineral de fierro en altos hornos.
b. Carbón en la cotidianidad, el carbón vegetal que es producido para la cotidianidad se lo realiza mediante temperaturas de 350°C, su uso principal es como combustible para las cocinas artesanales, calefacción, parrilladas, barbacoas en el exterior, para cocción de alimentos a la brasa, la obtención de cal y de cemento. Este debe

producir una cantidad mínima de humo al momento de su utilización, debe prender con facilidad y no reventar.

2. Métodos de producción de carbón vegetal

Se han considerado dos métodos para este estudio el método fosa y método de parva.

Método Fosa: Este método consiste en hacer un agujero en la tierra donde se va a colocar la poda de los residuos de los árboles, en forma ordenada, luego es cubierta por hojas y tierra, una vez que la biomasa esté totalmente cubierta, se coloca una antorcha. La capacidad del horno dependerá de la escala de producción empleada, pequeña o gran escala y de la cantidad de trabajadores implicados. Generalmente se construyen para la producción de una a tres toneladas de carbón vegetal, con una duración promedio de quema y enfriado de 10 días. La Figura 3 representa un horno tipo fosa con medidas 3 m × 2 m × 2 m en sus direcciones largo ancho y profundidad, para una capacidad de 7 m^3 de madera, su carbonización con madera de mandarinas murcott, generando una producción promedio de 60 a 80 costales con un peso de 15 a 20 kilos cada uno, siendo el costo por kilogramo de 3 nuevos soles.

Figura 3. Horno tipo fosa y carbón obtenido.

En este horno para realizar la carbonización de la madera, se tiene un orificio que permite la entrada de aire por tiro, el cual recorre longitudinalmente el horno quemando el material de forma no uniforme, dado que la entrada de aire no es uniforme ya que dependiendo de las condiciones ambientales, así mismo por tener una sola entrada de aire es complicado controlar la temperatura, este control se realiza observando la salida de humos, en las diferentes etapas de la carbonización, en la primera etapa de carbonización llamada fase endotérmica se observa humos blancos por la eliminación de vapor de agua siendo la temperatura aproximada de 100°C, seguidamente se observa la emisión de humos de color gris

lo cual indica que todo los compuestos volátiles y piroleñosos se están quemando (fase exotérmica). La temperatura aproximada puede llegar a 500°C (FAO, 1983). Ver Figura 4.

Figura 4. Orificio de entrada de aire del horno.

Método de parva: es utilizado en suelo rocoso, duro o poco profundo, así mismo, si el nivel freático está cerca de la superficie de carbonización o cuando hay pocos recursos para la construcción del horno (Chidumayo y Gumbo, 2013). Este método no es tan recomendable por la emisión de gases de efecto invernadero (GEI), los cuales afectan la salud del operador por la exposición a altas horas de trabajo. Otras desventajas de este método es que presenta un alto porcentaje de leña sin quemar (inquemados) y alta producción de ceniza obteniéndose bajos rendimientos de la producción de carbón como lo indica Arias-Chalico (2015) este puede ser entre un 12 a 22%, además, recalcar que su funcionamiento depende de las condiciones ambientales. La Figura 4 representa un horno tipo parva con medidas 6 m × 2 m × 2 m en sus direcciones largo ancho y profundidad, para una capacidad de 7 m^3 de madera, generando una producción promedio de 60 a 80 costales con un peso de 15 a 20 kilos cada uno.

Figura 5. Horno tipo Parva.

3. Marco Legal

- D.L. 1501 que modifica a la Ley Integral de Residuos Sólidos Nº1278 y su Reglamento (2016 y 2017).
- Reglamento de la Ley Nº 30884. DS Nº 006-2019-MINAM.
- Ley Forestal N° 29763 año 2011.
- D.S. Nº 003-2020-PRODUCE. Hoja de ruta de economía circular

4. Evolución del mercado de cítricos

El mercado de frutos cítricos se ha incrementado en los últimos años, observándose, un mayor crecimiento en el año 2020 y una ligera caída para el año 2021. En esa misma tendencia, para el año 2022, se observa que las agro exportaciones en Perú fueron disminuyendo Fuentes (2022), no obstante, los productores se encuentran en la búsqueda de nuevas especies de cítricos para mantenerse competitivos en el mercado y satisfacer las demandas cambiantes de los consumidores, como el cambio hacia la variedad de mandarinas satsuma, que tiene características como mayores rendimientos, tamaño mediano y bajos costos de mantenimiento, puede ser beneficioso para los productores, ya que puede reducir los costos y aumentar la rentabilidad. La decisión de reemplazar la mandarina W. Murcott, con características menos deseables en términos de costos de producción y tamaño de la fruta, puede ayudar a los productores a evitar pérdidas económicas Figura 6.

Figura 6. Evolución de las exportaciones de Cítricos en el Perú.
Fuente: Oportunidades para el agro peruano. Fuentes (2022).

5. Descripción

5.1 Características generales

La mandarina es oriunda de Asia Oriental extendiéndose desde la vertiente meridional del Himalaya hasta la China Meridional, Malasia, Indonesia, Indochina y Tailandia (Agusti,

2003), este cultivo se puede encontrar por la mayor parte de las regiones subtropicales y tropicales, siendo su propagación rápida dentro de China y Japón, llegando a Europa en el siglo XIV por los ingleses (Reyes, 2012).

La denominación "mandarina" de esta fruta se cree que proviene de la vestimenta naranja de los gobernantes chinos llamados mandarín (Reyes, 2012). Esta variedad fue propagada por las familias de productores Murcott y Smith, por ello, es conocida con el nombre de mandarina Murcott; ésta se caracteriza por ser un árbol de tamaño moderado y poseer una copa compacta (Figura 7), así el Dr. El-Bachir Nadori, indico que la mandarina W. Murcott es un hibrido, "esta variedad se originó con una semilla de un árbol de Murcott y un progenitor masculino desconocido" (Citrus Variety, 2008, p.1).

Figura 7. Plantaciones de mandarina Murcott

La variedad Murcott se caracteriza por ser muy productiva, sin embargo, tiende a la producción alternada; tal que, la producción excesiva produce disminución en el tamaño de la fruta y la futura supervivencia de la planta, llamándose a este proceso "colapso de la Murcott". Este fenómeno se puede controlar realizando las podas y raleos a la planta para mantener una producción adecuada. Otras características que presenta, es su alta sensibilidad al frío, en especial en años de gran producción. (Cítricos Paraguay, 2020).

Con respecto a los frutos (Figura 8) estos se producen en el final de las ramas, siendo el tamaño del fruto mediano, firme, achatada y de color amarillo anaranjado que se acentúa a medida que avanza la época de maduración. La cáscara es muy fina, bastante pegada a los gajos, pero se extrae sin mayores dificultades. Tiene un alto contenido de jugo, muy dulce y de baja acidez (Cítricos Paraguay, 2020)

Figura 8. Frutos de mandarina Murcott

5.2 Taxonomía

La mandarina (*Citrus reticulata* var. Murcott), taxonómicamente pertenece a la familia Rutaceae y a la clase Magnoliopsida. En la Tabla 2. Se muestra la taxonomía de la mandarina W. Murcott, por ser la especie híbrida introducida, más conocida comercialmente y empleada en el Perú.

Tabla 2. Clasificación de la mandarina W. Murcott.

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheebionta
Filo:	Magnoliophyta
División:	Fanerógama
Sub división:	Angiosperma
Clase:	Magnoliopsida
Subclase :	Rosidae
Orden:	Sanindales
Familia:	Rutaceae
Subfamilia:	Aurantioidea
Género:	Citrus
Especie:	Citrus nobilis (hibrido)
Variedad:	W. Murcott
Flores :	Solas o en grupos de 3 a 4
Fruto :	Hesperidio.

Fuente: Elaborado a partir de Vásquez (2019) y Reyes (2012).

5.3 Fenología de las mandarinas

Amórtegi (2001) indica que, el ciclo fenológico del cultivo de las mandarinas presenta las siguientes etapas de desarrollo:

- Etapa vegetativa: desarrollo en vivero (1 - 3 años)
- Etapa de crecimiento de la planta: desarrollo del árbol joven (2 – 5)
- Etapa reproductiva: desarrollo de la producción (3 - 7)
- Plena producción (8 -20)
- Etapa de producción decreciente (20 y los 40 años)

La Figura 6 muestra cada etapa fenológica de la mandarina Murcott

Figura 9. Ciclo vegetativo de la mandarina Murcott elaborado a partir de Amortegi (2001). Fuente: Amórtegi (2001).

6. Marco Metodológico

Este trabajo de investigación se enfoca en la producción de carbón vegetal a partir de la biomasa generada por la poda y el cambio de cultivo de la mandarina Murcott por mandarina Satsuma. Este proceso trae como consecuencia el reemplazo de 65 hectáreas de mandarinas Murcott.

6.1 Recolección de material y ubicación de la plantación

Los materiales recolectados fueron tanto las ramas y los troncos provenientes del reemplazo de los cultivos de mandarina, así como la poda habitual de esta plantación

comercial de la especie de mandarinas Murcott, ubicada en el sector Pampamamay; distrito Punta Hermosa, km 37.500 carretera Panamericana Sur, margen izquierda; provincia y departamento de Lima. Donde fueron seleccionados al azar, cortadas de la misma forma con ayuda de un machete o sierra de dientes de tiburón incluyendo las ramas. A este material se le realizaron cortes de aproximadamente 40-50 cm; que fueron apiladas, distribuyendo equitativamente; con 5 metros de largo; 2 metros de altura y 3 metros de ancho, y posteriormente cubiertas con tierra de la zona.

Figura 10. Ubicación de las plantaciones de mandarina Murcott.

6.2 Alcance del estudio

El uso de las podas y los residuos lignocelulósicos de la mandarina Murcott por reemplazo de nuevos cultivos es una alternativa para la producción de carbón de buena calidad para usos comerciales de comida rápida, que actualmente se incrementa día a día por la alta demanda de carbón como fuente energética del sector alimenticio de producción de pollos a la brasa en el Perú, que ocasiona la tala ilegal de bosques como, por ejemplo, los algarrobos ubicados en Piura para la producción de carbón".

6.3 Acondicionamiento de la muestra de carbón

Se acondicionó la muestra de carbón mediante la molienda y tamizado antes de realizar los análisis: químico (elemental, proximal y contenido energético) y lignocelulósico (lignina, celulosa y hemicelulosa) y los análisis fisicoquímicos (pH y conductividad eléctrica).

Figura 11. Acondicionamiento del carbón de mandarina Murcott

6.4 Análisis químico

6.4.1 Análisis lignocelulósico

El análisis lignocelulósico de la biomasa de la mandarina Murcott se realizó mediante la determinación de la lignina y celulosa mediante los métodos Klason TAPPI T- 222 (TAPPI, 2006) y TAPPI T- 212 (TAPPI, 1978) respectivamente, mientras que la hemicelulosa fue obtenida por el método de Jayme - Wise el cual consiste en la diferencia de cantidades en porcentaje de holocelulosa y celulosa respectivamente. El esquema de la Figura 3 muestra el procedimiento realizado (Figura 12).

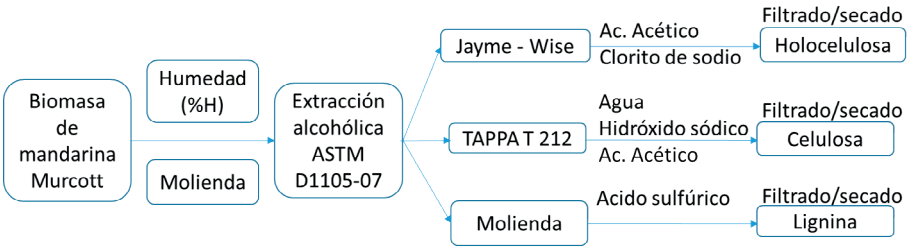


Figura 12. Esquema del análisis lignocelulósico.
Fuente: Elaboración a partir de Césare *et al*., 2019.

6.4.2 Análisis Proximal (Termogravimétrico)

El análisis proximal (% Humedad, % Material Volátil, % Ceniza, % Carbono Fijo) se realizó con el equipo LECO TGA701, el cual emplea la metodología (ASTM D7582 - 15),

establecido en el manual del equipo TGA701; este análisis se realizó en base húmeda, previamente acondicionada.

6.4.3 Análisis Elemental

El análisis elemental (C, H, O, N, S) se realizó siguiendo la metodología propuesta (ASTM D 5373 - 16), tal como lo indica el manual del equipo analizador elemental CHN628, O628 y S628 de la marca LECO. Este análisis se realizó con la muestra en base seca, previamente acondicionada.

6.4.4 Análisis de Contenido energético (poder calórico)

Se usó un calorímetro LECO AC600, llevando a cabo una combustión en atmósfera de oxígeno seco, usando 0.4 g de muestra sólida en base seca. El cálculo del poder calorífico se realizó de acuerdo con la norma (ASTM D5865 - 07), la cual es indicada en el manual del equipo LECO AC600.

7. Datos y cálculos

Para la caracterización tanto de la materia prima y del carbón, se consideró la determinación de los siguientes parámetros: porcentaje de humedad, ceniza, materia volátil y materia residente o recalcitrante (carbón fijo). Para evaluar las propiedades fisicoquímicas se usó la norma internacional ASTM D 1762 – 84 (ASTM, 2001) (Tabla 3).

Tabla 3. Ecuaciones utilizadas para determinar las propiedades físicas de la materia prima y del carbón de la mandarina Murcott.

Parámetro	Ecuaciones
Rendimiento (R)	$R = \frac{PI - PF}{PI} \times 100$
Contenido de humedad (CH)	$CH = \frac{A - B}{A} \times 100$
Material volátil (MV)	$MV = \frac{B - C}{B} \times 100$
Contenido de Cenizas (CC)	$CC = \frac{D}{B} \times 100$
Carbón fijo (CF)	$CF = 100 - CH - MV - CC$

Nota: PI = Peso de biomasa inicial (kg), PF = Peso (kg) después de la calcinación a 500°C. A= Masa inicial de la muestra molida y cribada (g), B= Masa de la muestra después de ser sometida a 107°C (g), C= Masa de la muestra después de ser sometida a 950°C (g), D = Masa del residuo (g), CH= Contenido de humedad (%) MV= Materia volátil (%), CC= Contenido de Cenizas (%), CF= Carbón fijo.

8. Resultados y discusión

Los resultados de los análisis lignocelulósicos y fisicoquímicos (proximal y elemental) realizados a la biomasa de la mandarina Murcott como el carbón producido a partir de este material en este estudio se presentan en las Figuras 12, 13 y 14, respectivamente. Asimismo, en la Figura 16 se muestra el análisis de contenido energético de la biomasa y el carbón producido, todos los resultados fueron obtenidos a partir de 3 repeticiones y en cada caso éstas contienen los valores promedios de cada análisis realizado.

8.1. Rendimiento de la producción de carbón

En la Tabla 4, se muestran los resultados promedios obtenidos del carbón de mandarina elaborado, el cual consistió en determinar el rendimiento de la producción en función de la temperatura y el tiempo de la pirólisis de los residuos de las tablillas de bambú.

Tabla 4. Rendimiento de la producción de carbón de la biomasa de la mandarina W. Murcott.

Rendimiento	R (%)
Carbón (Tn)	35

8.2. Análisis lignocelulósico de la biomasa y carbón de mandarina W. Murcott

En la Figura 13, se observa el contenido de los componentes lignocelulósicos de la biomasa de mandarina W. Murcott. La composición lignocelulósica de esta biomasa presenta diferentes porcentajes, los cuales no suman 100%, debido a que la biomasa lignocelulósica contiene otros compuestos. Así mismo, cuando se realiza el proceso termoquímico como la pirólisis, cada estructura lignocelulósica (celulosa, lignina y hemicelulosa) se va a descomponer en diferente forma, tal como lo indica Yang *et al*. (2007), la celulosa y la hemicelulosa son los constituyentes de la biomasa que producen la mayor cantidad de volátiles, en cambio, la lignina es la principal responsable de la producción de biochar.

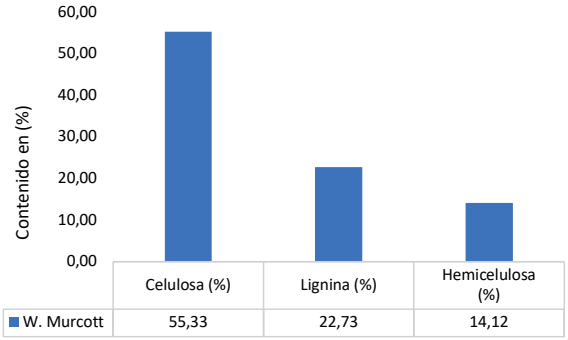


Figura 13. Análisis Lignocelulósico de la biomasa y carbón de mandarina W. Murcott.

8.2 Análisis Proximal de la biomasa y carbón de mandarina W. Murcott

Los resultados obtenidos en el análisis proximal se detallan en la Figura 14, donde el contenido de humedad tanto de la biomasa como del carbón presentan valores menores al 10%. En el caso de la biomasa leñosa, el contenido del material volátil y carbono fijo presentan valores menores y el contenido de cenizas es mayor a lo obtenido por Williams *et al*. (2017) para diferentes tipos de biomasa leñosa. Así mismo, Escalante *et al*. (2011) mencionan que el aprovechamiento energético de la biomasa seca por medio de procesos termoquímicos depende del contenido de humedad con valores menores al 50%, poder calorífico, concentración de carbono fijo, material volátil, contenido de cenizas y de los metales alcalinos presentes. El contenido de carbono fijo del carbón resultó del 72.91%, por ello, podría ser utilizado como enmienda para suelos tal como lo indica Alonso-Gómez *et al* (2016), al agregarlo a los suelos, se convertirían en sumideros de carbono debido a los elevados valores de contenido de carbón fijo que ratifican el secuestro de carbono y de esta manera contribuir a la disminución de gases de efecto invernadero.

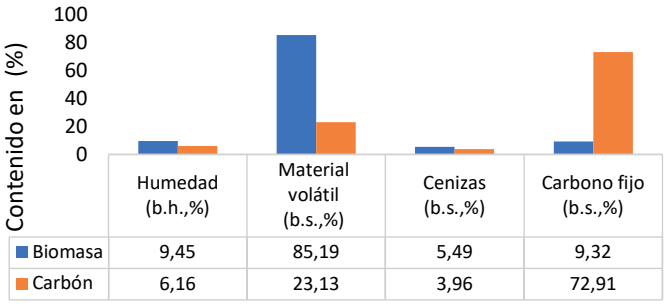


Figura 14. Resultados del análisis Proximal de la biomasa y carbón de mandarina W. Murcott. Nota: (b.h.): base humedad y (b.s.): base seca.

8.3 Análisis elemental de la biomasa y carbón de mandarina W. Murcott

El análisis elemental tanto de la biomasa como del carbón de mandarina se presenta en la Figura 15, donde los resultados de azufre son similares, exceptuando el contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. La biomasa agrícola y forestal se caracteriza en general, por poseer un bajo contenido en carbono (menores al 50%) y un alto contenido en oxígeno (menores al 40%), así como por su bajo contenido en azufre y cenizas (IDAE, 2008), siendo estos factores favorables para su aprovechamiento energético.

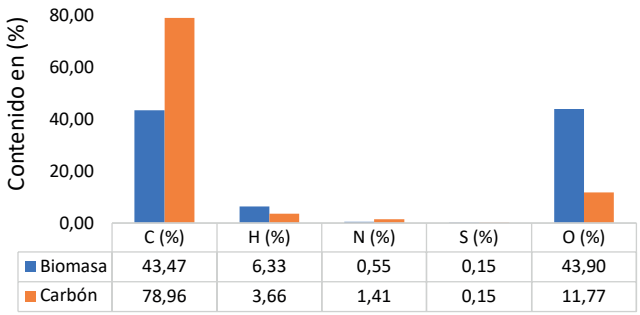


Figura 15. Análisis Elemental de la biomasa y carbón de mandarina W. Murcott.

En la Figura 16 se observa, que el contenido de carbono y nitrógeno del carbón de la mandarina Murcott son mayores al de la biomasa de mandarina Murcott, en cambio, los contenidos de hidrógeno y oxígeno son menores, mientras que el contenido de azufre es similar. No obstante, si el biochar se usa como enmienda para suelos, es preciso determinar el contenido de micro y macronutrientes, así como, su caracterización química y física

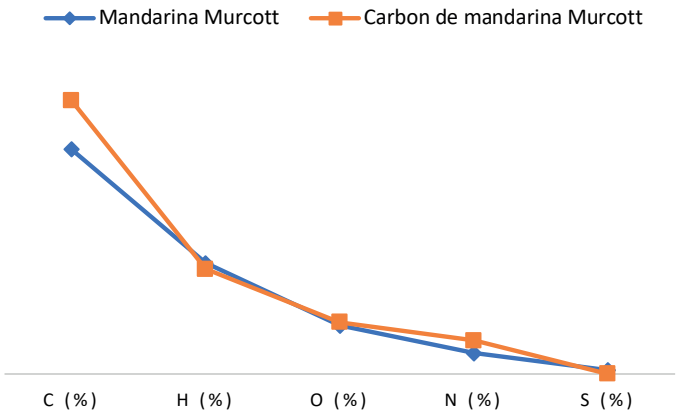
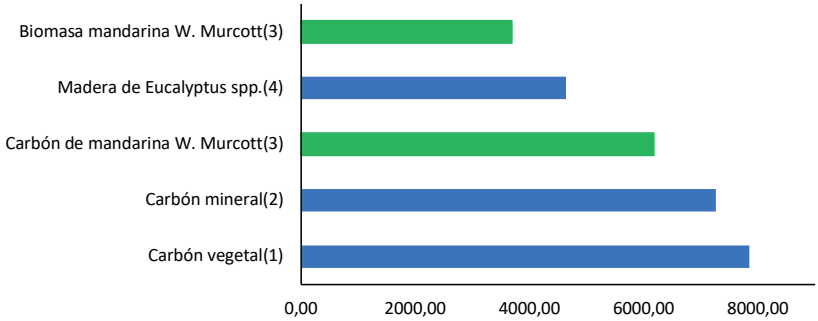


Figura 16. Tendencia del Análisis elemental de la mandarina Murcott y del carbón de mandarina Murcott.

8.4 Análisis del contenido energético de la biomasa y carbón de mandarina W. Murcott

El análisis del contenido energético tanto de la biomasa como del carbón de mandarina se presenta en la Figura 17, donde se observa que el poder calórico superior de la biomasa de mandarina W. Murcott es menor a la madera de *Eucalyptus* spp, así como, el carbón de mandarina W. Murcott, es menor al carbón mineral y carbón vegetal. Sin embargo, Okoroigwe & Saffron (2012) señalan que el poder calorífico tiene una relación directamente

proporcional con el contenido de carbono fijo, es decir, a mayor contenido de carbono fijo, mayor es el poder calorífico del biochar.



	Carbón vegetal(1)	Carbón mineral(2)	Carbón de mandarina W. Murcott(3)	Madera de Eucalyptus spp.(4)	Biomasa mandarina W. Murcott(3)
Poder Calórico Superior (kcal/kg)	7850,00	7257,31	6175,21	4633,61	3689,38

Figura 17. Análisis del contenido energético de la biomasa y carbón de mandarina W. Murcott.
Nota: (1) Marcos (1989), (2) Quijandría (2016), (3) Presente estudio, (4) Herguedas & Taranco (2012).

9. Conclusiones

- El contenido energético del carbón de la biomasa de mandarina W. Murcott representa aproximadamente el doble al de la biomasa de la mandarina, lo cual es óptimo para su valorización como combustible sólido, de fácil transporte y almacenaje para reducir su volumen debido al tratamiento térmico.
- El análisis proximal del carbón obtenidos de la biomasa del cultivo de mandarina W. Murcott presentan bajos contenidos de cenizas y compuestos volátiles, lo contrario a la biomasa de la mandarina W. Murcott.
- Las podas del cultivo de mandarina W. Murcott presentan importantes porcentajes de biomoléculas (lignina, celulosa y hemicelulosa) para fines energéticos.

10. Agradecimiento

A la empresa Pozo Alto, por su apoyo en esta investigación. Laboratorio de Energías Renovables y Laboratorio de Química de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

11. Referencias

Acevedo, R. H. (2016). *Manejo agronómico de Citrus reticulata Blanco Variedad W. Murcott en Chao – La Libertad*. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Trujillo - Perú. Recuperado de: http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3132

Agusti, M. (2003). *Citricultura* (2da ed). Madrid: Mundi-Prensa

Alonso-Gómez, L., Cruz-Domínguez, A., Jiménez-Madrid, D., Ocampo-Duran, Á., Parra-González, S. 2016. Biochar como enmienda en un oxisol y su efecto en el crecimiento de maíz. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient., 19*(2): 341-349. https://doi.org/10.31910/rudca.v19.n2.2016.88

Becerra, M. (2017). Caracterización del carbón vegetal a partir de bambú (*Guadua angustifolia* kuth) en dos estadios de madurez producido en un horno metálico. Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Urbanismo.

Carrillo, N., Hernández, A. y Castellanos-Potenciano, B.P. (2021). El comercio del carbón vegetal y su transitar hacia la bioeconomía en México. Recuperado de: https://journals.uco.es/bioeconomy/article/view/13527/12598.

Césare, M.F., Hilario, F., Callupe, N., Cruz, L., Calle, J.L., Gonzales, H.E. 2019. Caracterizaciòn quìmica y fìsica del bambù. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, *10*(4), 1-13. Recuperado: https://www.executivebs.org/publishing.cl/aci/2019/Vol10/Nro4/1-ACI1336-19-full.pdf

Cítricos Paraguay (2020). Mandarina Murcott. Recuperado de: https://www.facebook.com/citricosparaguay/posts/2510628549177745/

Citrus Variety (2008). W. Murcott Afourer - *Citrus reticulata* Blanco. Recuperado de: https://citrusvariety.ucr.edu/crc3953

El tiempo. (2019). Un 85% de pollerías usa carbón de origen prohibido. Recuperado de: https://eltiempo.pe/un-85-de-pollerias-usa-carbon-de-origen-prohibido-rv/

Escalante Hernández, H., Orduz Prada, J., Zapata Lesmes, H.J., Cardona Ruiz, M.C., Duarte Ortega, M. (2011). *Atlas del Potencial Energético de la Biomasa Residual en Colombia*. Santander, Colombia: Bucaramanga (Colombia): Universidad Industrial de Santander.

Fairhurst, T., Härdter, R. (2003). Oil Palm: Management for Large and Sustainable Yields. In: *El International Plant Nutrition Institute*. Trad, español, por E. Maldonado, F. Maldonado, R. Jaramillo. Medellín, Colombia. 404 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1983). *Métodos simples para fabricar carbón vegetal*. Recuperado de: https://www.fao.org/3/x5328s/X5328S00.htm

Fernández, J. (2020). *Energía de las Biomasa*. Iderdrola.

Fuentes, A. (2022). *Oportunidades para el agro peruano*. Maestría en Agro negocios UNALM – EPG (26 set). Recuperado de: https://www.youtube.com/watch?v=hSts3Pevp2g

Herguedas, A.I. & Taranco, C. (2012). *Biomasa, biocombustibles y sostenibilidad. Bloque I: Materias primas*. Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario. ITAGRA.CT, Instituto Universitario de Investigación en Gestión.

Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE). (2008). *Biomasa: Experiencias con biomasa agrícola y forestal para uso energético*. Madrid.

Marcos, F. (1989). *El Carbón Vegetal propiedades y obtención*. Madrid, España. Mundi-presa. 99 p.

Okoroigwe, E.C., Saffron, C.M. 2012. Determination of bio-energy potential of palm kernel shell by physicochemical characterization. *Nigerian J. Technol., 31*(3): 329-335.

Quijandría, J. (2016). Evaluación del carbón mineral para disminuir el contenido de azufre y mejorar su calidad. *Revista del Instituto de Investigación, FIGMMG-UNMSM,19*(38), 61-66.

Tafur, A., Fuks, M.A. (2017). Plan de Negocio comercialización de carbón vegetal "Leñas Lentu" año 2017 Trabajo de suficiencia profesional para optar el título profesional de Contador Público y el título profesional de Licenciada en Turismo y Hotelería. Universidad Científica del Perú. Recuperado de: http://repositorio.ucp.edu.pe/bitstream/handle/UCP/491/TAFUR%20CASTILLO%20ALSIA%20Y%20MERCEDES%20DE%20LA%20AURORA%20FUKS%20BACA_TSP.pdf?sequence=3&isAllowed=y

Vásquez, G.A.H (2019). "*Propuesta de un plan de negocio para una plantación de mandarina W. Murcott, en la primera etapa de la irrigación Majes, provincia de Caylloma, Región Arequipa - 2018*". Tesis para optar al grado académico de: Doctor en Ciencias Empresariales. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa - Perú. Recuperado de: http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/9169/CODvadugah.pdf

Williams, C., Emerson, R., Tumuluru, J.S. (22 de Febrero de 2017). *Biomass compositional analysis for conversion to renewable fuels and chemicals*. 251-270. Idaho Falls, USA: US Department of Energy. https://doi.org/10.5772/65777

Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C. 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel, 86*(12–13): 1781-1788. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013

PROGRAMA IBEROAMERICANO

CYTED

CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO

RED IBEROMASA