



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Incremento de la tasa de hidrólisis para mejorar la productividad de metano a partir de sargazo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Jimena Barrientos Parás

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Adalberto Noyola Robles
Instituto de Ingeniería, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Amelia Sabina Farrés González
Facultad de Química, UNAM

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Junio 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Incremento de la tasa de hidrólisis
para mejorar la productividad de
metano a partir de sargazo**

JIMENA BARRIENTOS PARÁS

DEDICATORIA

A mi familia y amigos, que siempre me apoyan y me motivan. Gracias por creer en mi e impulsarme a seguir persiguiendo mis pasiones.

Raúl, Mariana y Fabiola, saben lo importantes que son para mí y en toda mi trayectoria. Gracias por ser mis incondicionales y por caminar conmigo cada fracaso y victoria. Esto lo logro gracias a todo su apoyo.

Mabis, me encantaría poder compartir este momento contigo, gracias por todo lo que me diste que me permite crecer e intentar ser mejor cada día. Sentir tu presencia y tus enseñanzas me hace nunca rendirme, esto es para ti.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Adalberto Noyola por sus asesoría y guía constante, gracias por ser un gran ejemplo.

Al Dr. Daniel de los Cobos y Mtra. Margarita Cisneros por su apoyo técnico y su enorme compromiso.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Amelia Farrés y el Dr. Alfredo Martínez, por guía y apoyo excepcional.

A la Dra. Brenda Alcántar por su apoyo para la realización de análisis TGA.

A mis sinodales, la Dra. Carmina Montiel, el Dr. Luis Capeta, el Dr. Agustín López-Munguía, la Dra. Liliana Pardo y el Dr. De los Cobos, por sus valiosas contribuciones.

A Iván Martínez y Luis Ramírez por apoyarme en la realización de muchos experimentos, fueron el mejor equipo.

Al grupo de GIPA, gracias por su apoyo, compañía y buenos momentos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para realizar mi proyecto de maestría. CVU: 1083149.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por permitirme presentar mi proyecto en el congreso AD17.

Este trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015. No. de Certificado CMX C SGC 209 2020, válido en el período del 12 de noviembre de 2020 al 11 de noviembre de 2023.

ÍNDICE GENERAL

Resumen 17

Capítulo 1: Introducción 19

Capítulo 2: Antecedentes 21

2.1. SARGAZO Y LA PROBLEMÁTICA DERIVADA 21

2.2. APROVECHAMIENTO DEL SARGAZO 25

2.3. BIOENERGÍA Y DIGESTIÓN ANAEROBIA 28

2.4. PRUEBAS DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO 31

2.4.1. Ecuaciones tipo Michaelis-Mente y de Gompertz modificada 32

2.5. DIGESTIÓN ANAEROBIA DE ALGAS 32

2.6. DIGESTIÓN ANAEROBIA DE *S. NATANS* Y *S. FLUITANS*.. 34

2.6.1. Factores que afectan la digestión anaerobia en *S. natans* y *S. fluitans*..... 37

2.6.2.1. Lignocelulosa 38

2.6.2.2. Polisacáridos estructurales 40

2.6.2.3. Cenizas 42

2.6.2.4. Metales pesados 42

2.6.2.5. Sales y minerales 43

2.6.2.6. Fenoles 43

2.6.2.7. Relación Carbono/Nitrógeno 44

2.6.2.8. Especie, morfotipos y espacio-temporalidad del sargazo 44

2.7. PRETRATAMIENTOS 46

2.7.1 Pretratamiento biológico 47

2.7.1.1. Pretratamiento microbiano 48

2.7.1.2. Pretratamientos enzimáticos 48

2.7.2. Pretratamiento biológico en sargazo 49

2.7.3. Codigestion 50

Capítulo 3: Justificación y Objetivo 55

3.1. HIPÓTESIS 55

3.2. OBJETIVO	55
3.2.1. Objetivos específicos	55

Capítulo 4: Materiales y Método 57

4.1. CARACTERIZACIÓN DE SARGAZO	57
4.1.1. Análisis termogravimétrico	57
4.1.2. Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles	57
4.1.3. Determinación de monosacáridos	58
4.1.4. Hidrólisis ácidas de sargazo	58
4.1.5. Análisis Infrarrojo-ATR	58
4.2. Obtención y aislamiento de un consorcio microbiano que degrade sargazo	58
4.3. Pretratamientos de sargazo	59
4.4. Pruebas de Potencial Bioquímico de Metano	61
4.4.1. Condiciones experimentales aplicadas en las pruebas PBM de Componentes recalcitrantes	61
4.4.2. Condiciones experimentales aplicadas en las pruebas PBM de Sargazo fresco, sargazo almacenado, sargazo sometido a pretratamiento microbiano y a codigestión con estiércol bovino	62
4.4.3. Condiciones experimentales aplicadas en las pruebas PBM de Sargazo sometido a pretratamiento enzimático	63
4.4.4. Determinación de parámetros fisicoquímicos	64
4.4.5. Modelos con ecuación de Gompertz modificada	65
4.4.6. Modelos con ecuación tipo Michaelis-Menten ...	65
4.4.7. Análisis estadísticos	65

Capítulo 5: Resultados y Discusión 67

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL SARGAZO	67
5.1.1. Análisis termogravimétrico	67
5.1.2. Sólidos totales, volátiles y fijos del sargazo	70
5.1.3. Cuantificación de monosacáridos	71
5.1.4. Análisis infrarrojo-ATR iniciales del sargazo	72
5.2. DIGESTIÓN ANAEROBIA	73
5.2.1. Prueba de PBM del alginato y la celulosa	73
5.2.2. Pretratamiento microbiano	81

5.2.2.1. Desarrollo de un consorcio microbiano capaz de degradar sargazo	81
5.2.3. Prueba de PBM del sargazo, sargazo pretratado microbianamente, sargazo almacenado	84
5.2.4. Aislamiento de microorganismos del consorcio microbiano.....	90
5.3. PRETRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS	92
5.3.1. Alginato liasa en alginato de sodio	92
5.3.2. CellicCTec2 en celulosa	95
5.3.3. Efecto de las enzimas en sargazo	96
5.3.4. PBM de sargazo acoplado a pretratamientos enzimáticos	97
5.4. COMPARACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS EN LA SÍNTESIS DE METANO A PARTIR DE SARGAZO	101
5.4.1. Contribución de las condiciones experimentales aplicadas	101
5.4.2. Estiércol como codigestión	102

Conclusiones	109
Perspectivas	111

Referencias	113
-------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Mapa que muestra la posición del “Mar de sargazo” y el recientemente fenómeno denominado “Nuevo mar de sargazo” o “Cinturón de sargazo”	22
Figura 2.2. Imágenes satelitales que muestran la formación del cinturón de sargazo y su amplitud, en diferentes años	25
Figura 2.3. Proceso de digestión anaerobia. Se presentan las cuatro fases con sus productos y sustratos	31
Figura 2.4. Factores clave que vuelven a la biomasa recalcitrante. Estrategias de descomposición y fases de la DA	40
Figura 2.5. Estructura de compuestos fenólicos inhibitorios de la DA	44
Figura 2.6. Pretratamientos químicos, físicos, fisicoquímicos y biológicos	47
Figura 5.1. Análisis térmico (TGA) de nuestra muestra de sargazo	68
Figura 5.2. Análisis TGA de diferentes morfotipos del <i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> y porcentaje de humedad, materia orgánica, carbonato de calcio y cenizas (Tomado de Davis <i>et al.</i> , 2021)...	68
Figura 5.3. Espectros de absorción de sargazo obtenidos en IR-ATR..	73
Figura 5.4. Espectros de absorción de las dos partes del sargazo y sargazo molido	74
Figura 5.5. Curvas de rendimientos (mL CH ₄ /g SV) obtenidos en la prueba de PBM de alginato y celulosa	75
Figura 5.6. Diferencias del rendimiento de metano y tasa de producción máxima en las pruebas de PBM de celulosa y alginato	76-77
Figura 5.7. Pretratamiento biológico del sargazo	82
Figura 5.8. Comparación de las dos secciones de sargazo pretratado y sin pretratar analizadas por IR-ATR	82
Figura 5.9. Comparación de espectro de absorción del sargazo pretratado molido y sin pretratar molido, analizadas por IR-ATR	83
Figura 5.10. Curvas de rendimiento de metano en la prueba de PBM de sargazo, sargazo pretratado microbianamente y sargazo almacenado	85
Figura 5.11. Diferencias del PBM y tasa de producción en las pruebas de los tratamientos de sargazo fresco, sargazo pretratado pretratado microbianamente y sargazo almacenado	88
Figura 5.12. Cultivos de hongos aislados del sargazo	91
Figura 5.13. Observaciones al microscopio de hongos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 a resolución 40X y 100X	93
Figura 5.14. Prueba Tukey de la absorbancia final de cada cinética de alginato con alginato liasa	94
Figura 5.15. Espectro de absorción de alginato pretratado con distintas concentraciones de enzima y sin pretratar con alginato liasa analizadas por IR-ATR	95
Figura 5.16. Cinética enzimática de CellicCTec2 en celulosa	96
Figura 5.17. Comparación del espectro de celulosa pretratado y sin pretratar con CellicCTec2 analizadas por IR-ATR	96
Figura 5.18. Cinéticas enzimáticas en sargazo	97
Figura 5.19. Prueba Tukey de la absorbancia final en el sargazo que no se sometió a enzimas (control) y el sargazo sometido a las enzimas CellicCTec2 o alginato liasa	97
Figura 5.20. Curvas de rendimiento de metano en la prueba de PBM de sargazo pretratado con enzimas	98
Figura 5.21. Diferencias del PBM y tasa de producción en las pruebas de sargazo control, sargazo pretratado con CellicCTec2 y/o alginato liasa	100
Figura 5.22. Curvas de rendimiento bruto de metano en la prueba de PBM de sargazo con estiércol en codigestión (5:1)	103
Figura 5.23. Diferencias significativas del rendimiento de metano y tasa de producción en las pruebas de PBM de sargazos con o sin codigestión con estiércol bovino	104-105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Tabla de composición del sargazo reportado por diversos grupos de investigación	26-27
Tabla 2.2. Rendimientos de metano de algas marinas reportados en el trabajo de Barbot y colaboradores (2016)	33
Tabla 2.3. Rendimiento teórico de metano, experimental e incrementado por procesamientos en los trabajos realizados de DA en <i>S. natans</i> y/o <i>S. fluitans</i>	36-37
Tabla 2.4. Presencia y concentración de factores inhibitorios de la DA reportados en trabajos realizados en <i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	38-39
Tabla 2.5. Resultados de codigestión de <i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> con diferentes cosustratos. Los rendimientos son reportados como mL CH ₄ /g SV	52
Tabla 4.1. Contenido de los tratamientos del experimento de PBM de componentes recalcitrantes	62
Tabla 4.2. Contenido de los tratamientos del experimento de PBM con sargazo fresco, almacenado y sometido a pretratamiento microbiano..	62
Tabla 4.3. Contenido de los tratamientos del experimento PBM de sargazo estéril sometido a pretratamientos enzimáticos	63
Tabla 5.1. Componentes del sargazo seco empleado en este estudio...	69
Tabla 5.2. Composición química de los sólidos del <i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> muestreada en Puerto Morelos, México en agosto 2021..	70
Tabla 5.3. Contenido de monosacáridos al realizar la liberación de monosacáridos totales y la hidrólisis con ácido diluido con cargas de 5 y 10% peso/peso	71
Tabla 5.4. Análisis de PBM de celulosa, alginato de sodio comercial y alginato de socio grado reactivo	76-77
Tabla 5.5. Rendimiento experimental de tratamientos con celulosa y alginato de sodio, rendimientos teóricos calculados con la ecuación de Buswell con la fórmula química de los sustratos y porcentaje de conversión obtenido experimentalmente respecto al rendimiento teórico	85
Tabla 5.6. Análisis de PBM de sargazo fresco, sargazo pretratado microbianamente y sargazo almacenado	86-87
Tabla 5.7. Análisis de PBM de sargazo pretratado con enzimas	99
Tabla 5.8. Rendimiento de metano de <i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> en distintas condiciones y efectividad de los pretratamientos	102
Tabla 5.9. Análisis de PBM (bruto) de sargazo con y sin codigestión con estiércol	104-105
Tabla 5.10. Rendimientos de metano en la DA del sargazo fresco, pretratado microbianamente y almacenado a 6°C con lodo y el efecto de la codigestión con estiércol bovino (5 sargazo:1 estiércol) en el PBM	106

LISTA DE ABREVIACIONES

AGVs: Ácidos grasos volátiles
BH: Base húmeda
BS: Base seca
C/N: Relación carbono/nitrógeno
DA: Digestión anaerobia
DQO: Demanda química de oxígeno
PBM: Potencial bioquímico de metano
SV: Sólidos volátiles
ST: Sólidos totales
S:I: Relación sustrato:inóculo

RESUMEN

Los arribazones de sargazo actualmente representan un grave problema en la costa del Sureste de México. Esta biomasa debe ser manejada adecuadamente, para evitar impactos negativos en la zona, siendo su conversión a metano una opción. Estudios previos muestran que la producción de este gas a partir de sargazo es baja, siendo su hidrólisis el proceso limitante, por lo que realizar un pretratamiento biológico o codigestión con estiércol bovino podría acelerar la tasa de reacción, incrementar la producción del metano y aumentar la reducción de la biomasa de sargazo al final del proceso (digestato).

En este trabajo se realizó la digestión anaerobia (DA) de *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans* acoplada a dos pretratamientos biológicos (microbiano con un consorcio adaptado a la biomasa y enzimáticos con las enzimas CellicCtec2 y alginato liasa), así como codigestión con estiércol bovino, para mejorar la hidrólisis del sargazo y optimizar la producción de metano. Para probar la efectividad de cada tratamiento, se realizaron pruebas de potencial bioquímico de metano (PBM), además del ajuste de la ecuación de Gompertz modificada o tipo Michaelis-Menten, para obtener parámetros característicos (velocidad máxima de producción de metano, fase *lag* y R_2).

Se obtuvo que, al realizar el pretratamiento con la enzima CellicCTec2 en el sargazo estéril, el aumento en el rendimiento de metano fue del 69% comparado con el sargazo estéril sin pretratar. Agregar estiércol bovino como cosustrato hidrolítico al sargazo fresco con lodo metanogénico llevó a un aumento del 37% en el rendimiento de metano (97 ± 4 vs 71 ± 2 mL CH_4 /g Sólidos Volátiles (SV)) con respecto al sargazo fresco al cual solamente se le agregó lodo metanogénico. También se determinó que almacenar el sargazo a 6°C aumenta el rendimiento de metano en un 30% (92 ± 9 vs 71 ± 2 mL CH_4 /g SV), lo que se relacionó con la actividad de los microorganismos hidrolíticos presentes en el sargazo. La codigestión en proporción 5:1 sargazo:estiércol, sin sustraer el aporte del estiércol (producción bruta), llevó a un aumento del 57% en el rendimiento de metano frente al sargazo fresco sin codigestión (76 ± 2 vs 119 ± 4 mL CH_4 /g SV).

Los resultados muestran que, aunque la DA de sargazo no lleva a una producción de biogás deseable a nivel industrial, codigerirlo con estiércol bovino mejora el rendimiento de metano por su capacidad hidrolítica y su aporte como cosustrato. También, se obtuvo y asiló un consorcio capaz de degradar sargazo como pretratamiento que aumente la productividad de metano, pero el PBM se ve afectado negativamente, posiblemente debido a que los productos de hidrólisis son inmediatamente consumidos por microorganismos presentes en el sargazo. Realizar pretratamientos enzimáticos permitió identificar que degradar la celulosa del sargazo con la enzima CellicCTec2 incrementa el rendimiento de metano en un 69%, respecto al sargazo sin pretratamiento con enzima. La enzima alginato liasa comercial utilizada no tuvo efecto en la hidrólisis ni en el rendimiento de metano del sargazo, pero la degradación del alginato dentro del sargazo es deseable y es un reto que requiere una enzima o microorganismo que pueda degradar el alginato específico presente en *S. natans* y *S. fluitans*.

Capítulo

1

INTRODUCCIÓN

El sargazo es una macroalga planctónica que, en años recientes, las especies *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans* han presentado arribazones considerables en las costas del caribe (Gower y King, 2019). Esto ha ocasionado un impacto grave en los ecosistemas costeros, en el turismo y la industria pesquera de dichas zonas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2016). Se espera que en los años siguientes continúe habiendo arribos de altas cantidades de sargazo a las costas caribeñas, incluido el caribe mexicano. Ante ello, diversos estudios se llevan a cabo para estimar los volúmenes de sargazo que llegarán a las costas, y planear su manejo, para mitigar el problema derivado de su acumulación en las playas (Trinanes *et al.*, 2021).

Esta biomasa algal puede ser aprovechada, por ejemplo, para producir bioenergía en forma de metano (Soto *et al.*, 2015). Además, la producción de bioenergía es una forma de aprovechar la biomasa para reducir la dependencia energética de los combustibles fósiles y reducir el deterioro ambiental y los efectos del cambio climático asociados a su empleo (Thompson *et al.*, 2019). La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico en el que, en ausencia de oxígeno, se produce biogás a partir de materia orgánica. Así se puede utilizar la biomasa, como sargazo, para producir bioenergía, siendo el primer paso de la DA la hidrólisis, seguido por la acidogénesis, la acetogénesis y, por último, la metanogénesis (Li *et al.*, 2019).

Dentro de los procesos de la DA, la hidrólisis es la etapa limitante si no se favorece, ya que la biomasa del sargazo es recalcitrante y, por lo tanto, su descomposición biológica es lenta y limitada (Xu *et al.*, 2019). Los componentes recalcitrantes son los polisacáridos que presentan resistencia

a la degradación y liberación de azúcares, en el sargazo son las fibras de lignocelulosa (compuesta por lignina, hemicelulosa y celulosa) y los polisacáridos estructurales como el alginato, el fucoidan y la laminina (López-Sosa *et al.*, 2020; Davis *et al.*, 2021). La característica recalcitrante limita la producción de metano, por lo que se busca degradar dichos compuestos, para así optimizar la hidrólisis y obtener una mayor producción de metano (Alzate-Guivira *et al.*, 2020).

Entre las propuestas para este fin se encuentra la aplicación de pretratamientos físicos, químicos y biológicos a la biomasa fresca (Wu *et al.* 2019). Se ha observado, que los pretratamientos biológicos poseen la ventaja de que no producen inhibidores para el proceso de DA y consumen poca energía y reactivos, por ello son de interés para lograr un incremento en la tasa de hidrólisis de sargazo, aunque tienen la desventaja de ser lentos en algunos casos (Abraham *et al.*, 2020).

Además de lo recalcitrante de los polisacáridos estructurales, la biomasa algal de *S. natans* y *S. fluitans*, presenta otros inconvenientes para la DA, como lo es su alto contenido de metales pesados, sales, fenoles, así como una proporción de carbono/nitrógeno (C/N) desfavorable (fuera del rango 16/1 a 40/1). Al realizar una codigestión con otros sustratos se puede diluir la concentración de los compuestos inhibitorios y balancear la proporción C/N (Saratale *et al.*, 2018). En este trabajo se buscó aplicar pretratamientos biológicos microbianos y enzimáticos en *S. natans* y *S. fluitans* y codigerirlo con estiércol bovino, para favorecer su hidrólisis y así identificar estrategias para mejorar la producción de metano.

Capítulo

2

ANTECEDENTES

2.1. SARGAZO Y LA PROBLEMÁTICA DERIVADA

Las algas se clasifican por los pigmentos que poseen y se han dividido en tres grupos: algas verdes, rojas y pardas. Las algas pardas (Phaeophyta) se caracterizan por presentar un color marrón, debido a que contienen fucoxantina y dentro de este grupo se encuentra el género *Sargassum* (sargazo) que presenta alrededor de 350 especies. Dentro del género hay un subgrupo de algas planctónicas que se caracterizan por poseer vesículas de gas que las hace flotadoras. Éstas requieren de poco nitrógeno y fósforo para su supervivencia y tiene estructuras de polisacáridos resistentes que presentan en su pared celular (Uribe-Martínez *et al.*, 2020).

Al ser algas que se encuentran flotando en la superficie marina, el sargazo se mueve con las corrientes oceánicas y se acumula en algunos sitios, como el conocido “mar de los sargazos”. Éste se refiere a una zona que abarca una parte del Océano Atlántico y el Caribe, en donde las especies de sargazo que predominan son *S. fluitans* y *S. natans* (Gower y King, 2019). La conglomeración de estas algas en el mar de sargazo ha sido observada desde el siglo XV, pero recientemente se ha reportado un nuevo fenómeno de acumulación masiva en otras zonas y se ha formado lo que denominan “el cinturón de sargazo” o “nuevo mar de sargazo” (**Fig. 2.1**). Por el crecimiento extensivo y el cambio de corrientes marinas, una enorme cantidad de algas se está aglomerando en el Mar Caribe, el Golfo de México y en el oeste africano, causando arribazones de enormes cantidades de sargazo en las costas de estas zonas (Wang *et al.*, 2019).

La proliferación desmedida de especies de sargazo en el Océano Atlántico se debe al incremento en la descarga de nutrientes al mar, transportados por los ríos, producto de la deforestación, actividades agrícolas y centros urbanos (Wang *et al.*, 2019). La presencia de nutrientes en el agua marina favorece el crecimiento inusual de especies como el sargazo. La descarga

del río Amazonas y las descargas en las costas africanas tienen gran impacto en este aumento de nutrientes. Por otro lado, se ha observado que el cambio climático también es un factor que contribuye al extenso crecimiento del sargazo, ya que, el incremento en la temperatura de la superficie marina favorece el crecimiento masivo del sargazo (Wang y Hu, 2016).

En el Mar de sargazo la presencia de algas tiene un papel positivo, ya que es utilizado por muchas especies marinas como refugio, zona de desove, para buscar alimento o para transportarse. Además, las algas tienen una alta eficiencia fotosintética, por lo que absorben altas cantidades de dióxido de carbono y producen oxígeno. Se ha calculado que el sargazo absorbe el 7% del CO₂ del planeta (Thompson *et al.*, 2020a).

Los impactos negativos de *S. fluitans* y *S. natans* son principalmente por su acumulación en las costas, en donde altas cantidades de algas y otras especies planctónicas forman una capa superficial que impide la entrada de luz y oxígeno a especies que se encuentran en zonas más profundas, provocando la muerte de muchos organismos (Marx *et al.*, 2021). En particular, el arribo masivo de sargazo al Caribe Mexicano es considerado un florecimiento algal nocivo. Esto ha provocado la muerte de animales como tortugas, peces, crustáceos, equinodermos, moluscos, poliquetos e insectos. Así mismo, el sargazo depositado en las costas impide el anidamiento de tortugas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2016).

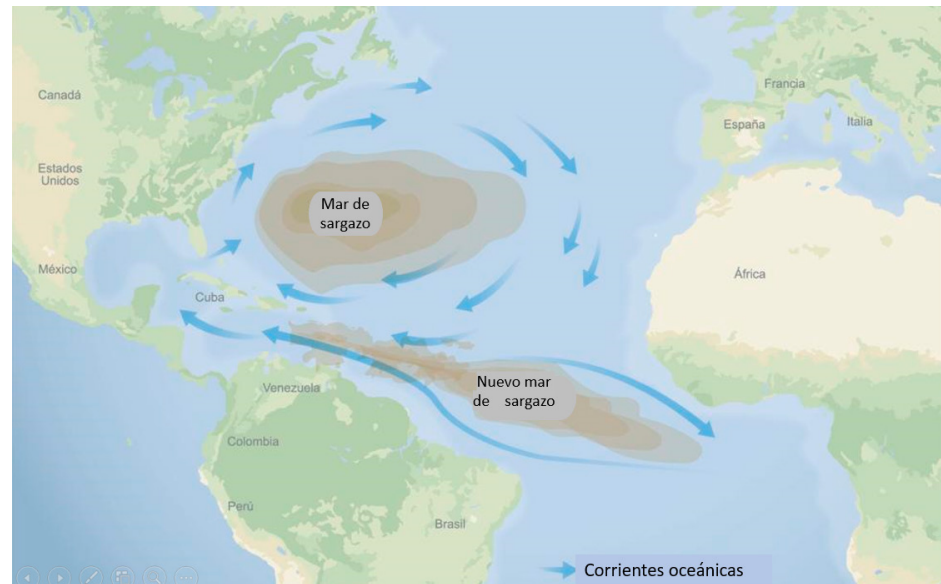


Figura 2.1. Mapa que muestra la posición del "Mar de sargazo" y el recientemente fenómeno denominado "Nuevo mar de sargazo" o "Cinturón de sargazo" (Gráfico modificado de Alexis Robles, 2021).

Los ecosistemas de arrecifes coralinos, manglares, pastos marinos y humedales también se han deteriorado. En el Caribe se ha destruido el 80% de los arrecifes coralinos, siendo el sargazo uno de los factores que lo han provocado (Thompson *et al.*, 2020a). Por otro lado, el sargazo, al descomponerse, libera metales pesados e incrementa el contenido de carbono orgánico. Su manejo incorrecto lleva a la contaminación del agua epicontinental y subcontinental, provocando problemas ambientales severos (Ayala-Mercado *et al.*, 2022)

Así mismo, una gran cantidad de sargazo se deposita en la costa y al descomponerse libera ácido sulfhídrico que, además de provocar olores desagradables, puede llegar a alcanzar concentraciones tóxicas para los humanos y otras especies. Este gas es tóxico en concentraciones bajas, provocando dermatitis, conjuntivitis y afecciones al sistema respiratorio, nervioso, muscular y circulatorio por su capacidad de pasar por las membranas respiratorias e inhibir a la enzima citocromo oxidasa. (Martínez-González, 2020).

El mar comúnmente azul y cristalino de las costas del sureste de México se ha pintado de café y tienen un olor a podredumbre, por lo que el impacto negativo económico provocado por los arribos de sargazo en las costas del Gran Caribe ha sido enorme (Muñoz, 2019). Se ha generado decremento notable en el turismo, que es la actividad que representa la fuente de ingresos primordial para 35 países, estados y territorios del Caribe, representando el 15% del producto interno bruto y el 14% de los empleos. En México, la mitad de los ingresos nacionales del sector turístico se generan en destinos del mar Caribe, ingresos que han disminuido por los arribos masivos de sargazo en estas zonas. El Consejo del Caribe ha reportado que los turistas evitan estos destinos en temporadas de llegada de sargazo, presentando un decremento del 35% en el turismo. Así mismo, la industria pesquera se ha visto afectada, llevando a fuertes pérdidas económicas (Milledge *et al.*, 2020).

Remover y prevenir los arribos de sargazo también tiene como consecuencia una fuerte pérdida económica. La limpieza del sargazo en las costas se ha realizado de forma manual y por máquinas, lo que representa un costo de 129 a 285 dólares por kilómetro y lleva a la compactación de arena y erosión de playas porque las máquinas extraen mucha arena. Así mismo, desechar el sargazo cuesta entre 10 y 150 dólares por día (Ayala-Mercado *et al.*, 2022). Remover el sargazo de todas las costas mexicanas y todo el Caribe se estima que tiene un costo de \$5 millones y \$120 millones de dólares al mes, respectivamente (Milledge *et al.*, 2020).

El fenómeno del cinturón del sargazo se observó desde el 2011 (Fig. 2.2) y en 2014 la cantidad de sargazo observada en el cinturón fue 300 veces

mayor que el récord histórico (Dibner *et al.*, 2022). Así mismo, en 2015 se registró un incremento de 20 veces, respecto al 2010. En las costas de México llegaron 2,360 metros cúbicos de sargazo en cada km de costa en meses de poco arribo, mientras que en julio y agosto se acumularon 9,726 metros cúbicos de sargazo en cada km de costa al mes (Thompson *et al.*, 2020a; Marx *et al.*, 2021). En 2020 y 2021 se obtuvo presencia considerable de sargazo en las costas de Quintana Roo (Trinanes *et al.*, 2021).

Aunque la llegada de sargazo a las costas ha variado anualmente, se ha reportado que existe una clara estacionalidad en los arribos de sargazo en las costas caribeñas. La biomasa de estas algas llega con volumen considerable desde abril hasta septiembre, siendo mayor en julio y agosto, mientras que en diciembre y enero los arribos son menores. Esta información es necesaria para planear recolecta de sargazo y evitar, en la medida de lo posible, que se dañen los ecosistemas costeros y limitar el impacto ambiental y económico en las zonas afectadas. Asociado a ello, es necesario conocer y generar herramientas para predecir los volúmenes de sargazo que llegarán a las costas en cada época, para así poder mejorar y agilizar soluciones (García-Sánchez, 2020).

Actualmente, se están analizando datos de sensores satelitales que permiten cuantificar cantidades del alga en el cinturón de sargazo; se han integrado modelos matemáticos que buscan estimar volúmenes de arribo en diferentes sitios de costa y eso se ha comparado con observaciones *in situ*. Con base en esto, se han realizado predicciones de la cantidad de sargazo que llega a las costas, pero aún son métodos imprecisos debido a que depende de la interacción compleja entre corrientes oceánicas, viento, oleaje, marea y las propiedades físicas del sargazo (Johnson *et al.*, 2020). Todos estos factores dificultan realizar predicciones que permitan anticipar cómo será la problemática del sargazo en el futuro. Se espera que la presencia de sargazo continúe en años futuros y que, posiblemente, se siga incrementando los volúmenes de sargazo en las costas, teniendo diferencias en la cantidad de arribo dependiendo del año (Ody *et al.*, 2019).

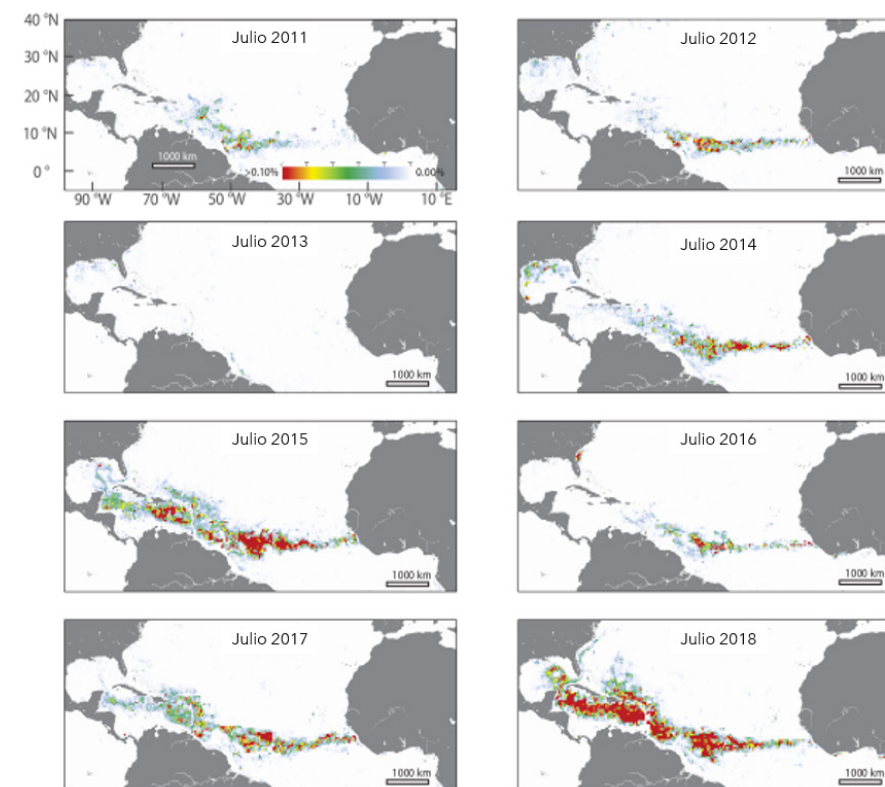


Figura 2.2. Imágenes satelitales que muestran la formación del cinturón de sargazo y su amplitud, en diferentes años. Se muestra que abarca zonas costeras y va desde África hasta el Caribe (Modificado de Wang *et al.*, 2019).

2.2. APROVECHAMIENTO DEL SARGAZO

Por la problemática ya descrita, derivada por la gran cantidad de biomasa de sargazo que se está depositando en las costas, se ha buscado el aprovechamiento de esta alga. Por ejemplo, en la industria alimenticia se analizó su potencial nutricional y se encontró un bajo contenido de proteínas y lípidos (**tabla 2.1**), pero el perfil completo de aminoácidos esenciales. Así mismo, se encontró que los ácidos grasos polinsaturados que contiene el sargazo son beneficiosos y su alto contenido de fibra es positivo para modular la absorción de nutrientes, mejorando el metabolismo y favoreciendo la microbiota del colon (Amador-Castro *et al.*, 2021). Las desventajas principales de emplear el sargazo como alimento es el contenido de metales pesados tóxicos (arsénico, aluminio, cadmio, cromo, mercurio, plomo y zinc) y sus altos niveles de minerales, que pueden llegar a ser tóxicos (Amador-Castro *et al.*, 2021).

Tabla 2.1. Tabla de composición del sargazo reportado por diversos grupos de investigación.

Región	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Alginato (%)	Fucoidan (%)	Proteínas (%)	Lípido (%)	Carbohidratos (%)	Fibra (%)	Fenoles mg/g	Humedad (5)	Cenizas	Referencia
Islas Turcas y Caicos	ND	ND	ND	ND	ND	3 a 4	4 a 5	19 a 27	31 a 37	2 a 7	82 a 87 BH	34 a 36 BS	Milledge <i>et al.</i> , 2020
Jamaica	ND	ND	ND	6 a 16	ND	ND	ND	ND	ND	1 a 10	8 a 13 BS	34 a 56	Machado <i>et al.</i> , 2022
México	ND	ND	ND	30 a 34	8 a 9	8 a 10	2 a 3	14 a 17	ND	6 a 9	ND	18 a 24	Vázquez-Delfín <i>et al.</i> , 2021
México	8 a 9	9 a 13	8 a 10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15 BS	ND	López-Sosa <i>et al.</i> , 2020

BH= Base húmeda, BS= Base seca

Por otro lado, se ha evaluado el uso del sargazo como bioestimulante y fertilizante, obteniendo resultados favorables, ya que mejora la germinación, desarrollo y crecimiento de las plantas. El uso de sargazo como composta mejora la calidad de suelos y el crecimiento de la vegetación. El problema derivado de esta aplicación es que el alto contenido de sales y minerales en la biomasa puede provocar que los suelos se salinicen y cambiar sus propiedades. También, si se utiliza como fertilizante, los metales pesados en el sargazo pueden liberarse en el suelo y llegar a concentraciones tóxicas. Estos problemas se pueden contrarrestar realizando pretratamientos, pero son costosos y tardados (Tejeda-Tejeda *et al.*, 2021; Walsh y Waliczek, 2020).

Además, se está buscando utilizar la biomasa de sargazo para la construcción civil, donde se ha demostrado que, por su alto contenido de fibras y cenizas, funciona para hacer adobe, pavimento, techos y fachadas (Rossignolo *et al.*, 2022). Recientemente, se han desarrollado tabiques de sargazo que son resistentes y de alta durabilidad. Se ha avalado que los tabiques tienen una vida útil de aproximadamente 120 años y representan un material orgánico, biodegradable y de bajo costo. La ventaja de esta aplicación es que se utilizan grandes cantidades de biomasa, cada tabique está compuesto en 60% de sargazo (Zavala-Arceo *et al.*, 2019).

El sargazo tiene un alto contenido de alginato (**tabla 2.1**) y este es de interés en la industria textil y cosmética. En la industria alimenticia se emplea como agente emulsificante, estabilizante, como preservador y se ha probado su potencial como fuente de proteína económica. También en el área biomédica se utiliza como apósito para heridas por su capacidad de absorción y mantenimiento de humedad y para tabletas médicas, utilizado para medicamentos de liberación rápida. La desventaja es que la extracción de alginato se lleva en 6 procesos lo cual es lento y costoso (Mohammed *et al.*, 2020).

Así mismo, el sargazo produce metabolitos secundarios que tienen

aplicaciones médicas. La fucoxantina es un carotenoide con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y reduce el riesgo de cáncer, obesidad y diabetes. El fucosterol tiene propiedades antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas y reductoras de colesterol. Los compuestos fenólicos y flavonoides son antioxidantes y los fucoidanos son anticoagulantes, inmunomoduladores, antitumorales y antiinflamatorios. La desventaja es que la extracción de estos compuestos es costosa y complicada (Amador-Castro *et al.*, 2021).

En la biorremediación el sargazo ha recibido interés ya que de manera natural absorbe contaminantes como metales pesados. El sargazo puede ser empleado para tratamiento de aguas residuales derivadas de la industria minera y textil (López-Miranda *et al.*, 2020). Otra aportación del sargazo en la biorremediación es para evitar procesos de eutrofización en aguas con alto contenido de nutrientes, ya que estas algas utilizan altos niveles de nitrógeno y fósforo del agua para su crecimiento y así se evita que estén disponibles para otros organismos (Saldarriaga-Hernández *et al.*, 2020).

La combustión del sargazo tiene pocos usos ya que sus entalpías de combustión son bajas y además se necesita secarlo (Milledge y Harvey, 2016). Varios estudios han demostrado que el sargazo es un recurso energético con potencial para producir biogás por medio de DA, representando una energía sustentable (López-Sosa *et al.*, 2020). Aunque estas algas tienen componentes recalcitrantes, esta aplicación se plantea como una opción ya que se puede utilizar una gran cantidad de biomasa y se obtiene además un beneficio económico al producir biogás y digestato; este último puede ser empleado como fertilizante (López-Aguilar *et al.*, 2021).

Utilizar el sargazo para producir biogás tiene beneficios sociales, económicos y ecológicos ya que incrementa los trabajos locales, aumenta la salud y seguridad energética, reduce los costos de limpieza en las costas, beneficiando al turismo y a la industria pesquera. Ambientalmente, reduce

los gases tóxicos y de efecto invernadero, se reutilizan productos ricos en los gases tóxicos y de efecto invernadero, se reutilizan productos ricos en nitrógeno en la agricultura y controla el reciclaje de micro y macronutrientes de regreso a la tierra (Marx *et al.*, 2021). Sin embargo, se han obtenido bajos rendimientos en la producción de biogás al realizar DA de biomasa de *S. natans* y *S. fluitans*, por lo que conocer la composición del sargazo es de gran interés, para entender los componentes que vuelven a esta biomasa difícil de degradar y buscar mejorar su hidrólisis (Maneein *et al.*, 2018).

La caracterización del sargazo se ha realizado por algunos grupos de investigación. Sin embargo, el empleo de técnicas similares lleva a resultados variables que dificultan su comparación e interpretación. La variabilidad dentro de los reportes de composición general de esta biomasa puede deberse a los cambios en la composición de la misma por factores espacio-temporales (Robledo *et al.*, 2021).

La baja producción de metano no correlaciona con el contenido de carbohidratos en el sargazo, por lo que se argumenta que las paredes celulares deben formar redes muy complejas que sean difíciles de hidrolizar. Así mismo, su alto contenido de fibra (31-37%) y cenizas (22-34%) puede limitar su degradación, así como los factores inhibitorios que se mencionarán más adelante (Thompson *et al.*, 2021; Ayala-Mercado *et al.*, 2022).

2.3. BIOENERGÍA Y DIGESTIÓN ANAEROBIA

El consumo de energía está en aumento mundialmente, provocando una demanda muy alta de combustibles fósiles. El impacto ambiental por el uso de estos recursos no renovables es enorme y se ha asociado al cambio climático. Estas fuentes de energía promueven el calentamiento global por la emisión de gases de efecto invernadero. Se ha determinado que desde los 70s hasta el 2015 la emisión de dióxido de carbono global se triplicó (Thompson *et al.*, 2019). La dependencia de combustibles fósiles, además de contribuir al calentamiento global, también provocan el deterioro de la calidad del aire, lluvia ácida y riesgos de derrames de petróleo durante su transporte (Borines *et al.*, 2013)

La mayoría de los países, incluido México, tienen un sistema energético dependiente de combustibles fósiles, donde más del 60% de la energía es generada por estos (López-Sosa *et al.*, 2020). Se ha estimado que el petróleo explotable desaparecerá dentro de 25 a 30 años si no hay un cambio en el sistema energético hacia energías renovables. La búsqueda hacia fuentes de energía renovables, amigables con el ambiente y económicas se ha convertido en una de las prioridades más importantes en la actualidad (Del Río *et al.*, 2020).

Así mismo, el consumo de energía para transporte representará un 25% del consumo de energía global en 2040. Una alternativa para reducir el consumo de combustibles fósiles es utilizar biomasa como fuente de energía, ya que los biocombustibles se generan de recursos renovables que contribuyen a reducir la emisión de gases de efecto invernadero (Akila *et al.*, 2019). De esta forma, valorizar los residuos puede ayudar a disminuir la contaminación, diversificar la producción de energía y mejorar la economía. La bioenergía producida a partir de biomasa puede contribuir a la seguridad energética de los países y aportar para llegar al objetivo de mitigar el cambio climático en una escala global (Lopresto *et al.*, 2021)

La biomasa puede ser empleada para producir biocombustibles al ser rica en carbohidratos, renovable y muy abundante; además de que puede obtenerse a bajo costo (Jeoh *et al.*, 2017). Aparte de mitigar el calentamiento global, emplear biomasa para producir biocombustibles representa una reducción en la emisión de dióxido de carbono ya que las plantas o algas empleadas realizan fotosíntesis y consumen dióxido de carbono antes de su uso para producir energía (Xu *et al.*, 2019).

La producción de bioenergía por medio de digestión anaerobia (DA) es un proceso en el cual el producto final es el biogás que está compuesto mayoritariamente por metano (60-70%) y dióxido de carbono (30-40%) que puede ser empleado para generar electricidad, energía térmica o como combustible en motores a gas. En este proceso, la materia orgánica en ausencia de oxígeno y pH neutro se convierte en biogás y el material digerido (digestato) puede ser utilizado como biofertilizante (Membere y Sallis, 2018). La DA tiene alta eficiencia de conversión, se lleva a cabo en condiciones no extremas (37°C y 1 atmósfera de presión) y evita el problema de desechar la biomasa. Así mismo, recupera residuos (biomasa) y se produce energía de fuentes renovables, evitando la liberación de metano a la atmósfera (Arango-Osorio *et al.*, 2019).

La producción de metano por DA es un proceso que ocurre en la naturaleza, también se puede producir en bioreactores en forma controlada como opción para el manejo de aguas residuales y residuos orgánicos, teniendo la ventaja de producir energía en biogás a partir de desechos (Rasmussen *et al.*, 2014). El proceso consta de 4 fases (**Fig. 2.3**): la primera fase es la hidrólisis, que lleva a la degradación de moléculas complejas (carbohidratos, proteínas, grasas) a moléculas sencillas (monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos). La segunda fase es la acidogénesis en la cual microorganismos consumen las moléculas sencillas y producen ácidos grasos volátiles (AGVs), hidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂). Posteriormente se da la acetogénesis que consiste en la producción de ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. Por último, se lleva a cabo la metanogénesis en la que se produce metano

y dióxido de carbono (Najafi *et al.*, 2019).

La hidrólisis se lleva a cabo por bacterias anaerobias facultativas, comúnmente pertenece a géneros de *Clostridium*, *Enterobacterium* y *Streptococcus* que producen hidrolasas para romper la matriz celular rígida de la biomasa. La acidogénesis la llevan a cabo microorganismos anaerobios facultativos (*Clostridium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*) y la acetogénesis se desarrolla por bacterias sintróficas, que viven de los productos metabólicos de los microorganismos acidogénicos (como *Syntrophobacter wolinii* o *Syntrophomonas Wolfe*). La metanogénesis tiene 3 rutas: la acetoclástica que produce del 60-70% del metano al consumir acetato, la hidrogenotrófica, en la que el CO₂ y el H₂ forman el 30% del metano y la metilotrófica que convierte el metanol a metano (Abdelgadir *et al.*, 2014).

En la DA, los parámetros que afectan el rendimiento de biogás son: el equilibrio en la proporción de C/N, la carga (alimentación) de sólidos volátiles, la temperatura, el pH, la fuente de inóculo, la proporción inóculo-sustrato, la composición y estabilidad de la comunidad microbiana, la configuración del reactor, la presencia o formación de compuestos inhibitorios, la composición y lo recalcitrante de la biomasa y la escala de producción. En general, la proporción de demanda química de oxígeno (DQO): nitrógeno (N): fósforo (P): azufre (S) debe estar entre 1000:5:1:1 y 350:5:1:1 para que se lleve a cabo la hidrólisis y metanogénesis. En los parámetros mencionados los rangos óptimos son: Proporción C/N de 17-32, pH de 5 a 8.2 (5-7 hidrólisis, 7-8.2 metanogénesis), temperatura de 15-55°C y sólidos de 2 - 30% (Cheng y Brewer, 2021). Valores superiores del 20% de sólidos se considera una digestión anaerobia “seca”, lo que modifica algunas condiciones de operación y el equipamiento de mezclado (Rocamora *et al.*, 2020).

Los biocombustibles se han dividido en aquellos de primera generación, segunda generación y tercera generación. Los de primera generación son producidos por biomasa que puede ser alimento o sus derivados, por ejemplo: granos, maíz, soya, aceite, sacarosa, etc. y llevan a problemas de seguridad alimenticia y alta demanda de espacio en tierras fértiles. Los biocombustibles de segunda generación se producen de biomasa lignocelulósica que necesita procesos de pretratamiento para lograr su degradación. Por otro lado, los biocombustibles de tercera generación se producen con micro o macroalgas que no ocupan espacio en la tierra. Además, al remover algas de cuerpos acuáticos para producir biocombustibles es posible mitigar procesos de eutrofización y disminuir los problemas generados por algas invasoras (Wu *et al.*, 2019).

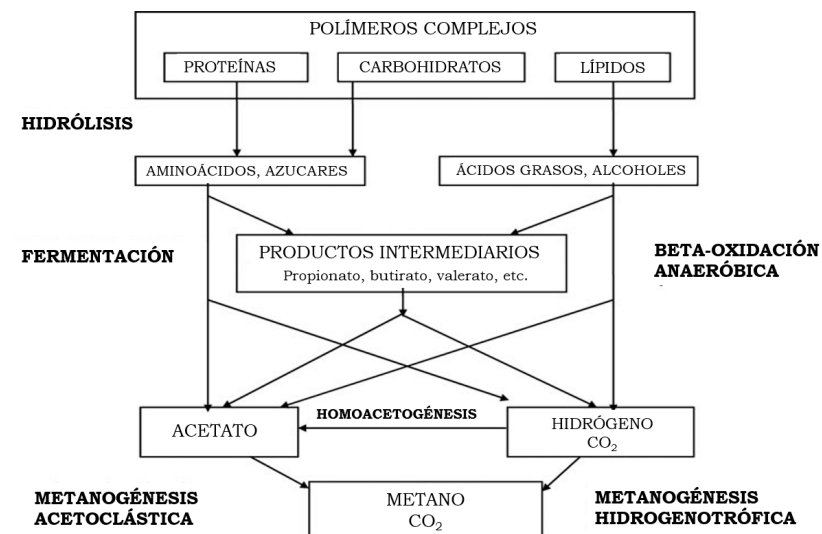


Figura 2.3. Proceso de digestión anaerobia. Se presentan las cuatro fases con sus productos y sustratos (Modificado de Gujer y Zehnder, 1983).

2.4. PRUEBAS DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO

Para estimar los rendimientos de metano de un sustrato se pueden llevar a cabo una variedad de métodos. Existen métodos a largo plazo, que toman de 1 a 2 años y se realizan en reactores diseñados para probar las condiciones de biorreactores comerciales y estudiar el rendimiento en el tiempo. También hay digestores anaerobios, normalmente en laboratorio se trabajan por lotes a corto plazo, entre 1 y 3 meses, para dar una primera aproximación del rendimiento de metano de un sustrato. El método a corto plazo más empleado es el de potencial bioquímico de metano (PBM), que permite determinar la biodegradabilidad y el rendimiento de metano de un sustrato de una forma simple, rápida y precisa (Labatut, Angenent y Scott, 2011).

El PBM es la máxima cantidad de metano que una matriz orgánica puede producir por medio de DA y se obtiene de manera experimental. El PBM varía con la estructura molecular, es un indicador del rendimiento de metano y la biodegradabilidad de un sustrato. El PBM se verá afectado dependiendo de la degradación de un sustrato. Cuando se trata de moléculas estructurales más complicadas, la degradación y el PBM son menores. Para medir el PBM de un sustrato, este se somete a un tratamiento anaerobio con lodo metanogénico y por medio de cromatografía de gases se cuantifica la producción de biogás o metano periódicamente, hasta que la acumulación de metano llegue a fase estacionaria. La producción de metano al final de la prueba se reporta como el rendimiento máximo de metano o PBM del sustrato con unidades de mililitros de metano/ gramo de sólido volátil de la biomasa (mL CH₄/g SV) (Cheng y Brewer, 2021).

Realizar pruebas de PBM permiten estudiar el fenómeno de producción de metano de un sustrato, calculando el valor máximo de metano que puede ser recuperado del sustrato por gramo de sólido volátil (SV); con esta prueba también se obtiene la tasa máxima de producción del gas. Dichas pruebas son una opción para variar ciertas condiciones del proceso de DA, permitiendo evaluar la mejor condición para su escalamiento. Así mismo, permiten evaluar el impacto de un pretratamiento en la degradabilidad del sustrato, lo que ayuda a definir condiciones y tratamientos eficientes. Es importante tener en cuenta que el rendimiento de metano empleando el mismo sustrato en fermentadores a mayor escala será menor que el obtenido en pruebas de PBM y es necesario estudiar el proceso durante el escalamiento (Koch *et al.*, 2020).

2.4.1. Ecuaciones tipo Michaelis-Mente y de Gompertz modificada

Al determinar el PBM de un sustrato en condiciones variables, es común utilizar modelos para describir los datos y determinar parámetros que permitan comparar los tratamientos realizados. Las ecuaciones de tipo Michaelis-Menten y Gompertz modificada se utilizan por ser modelos no estructurales que permiten ajustar a curvas de comportamiento de producción de metano en el tiempo durante el proceso de DA (Membere y Sallis, 2018).

Se ha determinado que el modelo de Gompertz modificado es el más adecuado para describir la producción de metano en el tiempo cuando la biomasa es recalcitrante y el biogás tarda en producirse, ya que presenta un coeficiente de correlación alto, ajustando de la mejor manera las curvas de producción de biogás o metano. En particular, permite considerar la fase *lag* que generalmente estas pruebas presentan en las primeras horas. Este modelo permite determinar la tasa de producción de metano, fase *lag* y potencial máximo de metano (Zhu *et al.*, 2019). Por otro lado, el modelo tipo Monod o tipo Michaelis-Menten es adecuado cuando la producción de biogás es inmediata, demostrando que la hidrólisis del sustrato es rápida (Membere y Sallis, 2018).

Recientemente se ha popularizado el uso de la ecuación de Gompertz modificada para ajustar curvas de PBM porque requiere solamente los datos de acumulación de biogás contra tiempo, provee de parámetros fácilmente interpretados (rendimiento de biogás, tasa de producción de biogás y duración de la fase *lag*) y ajusta correctamente los datos (Siripatana *et al.*, 2015). Por otro lado, el modelo da resultados comparables que permiten analizar el efecto de cambiar las condiciones dentro de la DA como la temperatura, la relación Sustrato:Inóculo (S:I), pretratamientos, etc. (Zhu *et al.*, 2019).

2.5. DIGESTIÓN ANAEROBIA DE ALGAS

Las macroalgas verdes, rojas y pardas son organismos multicelulares con

alto contenido de carbohidratos y polisacáridos, alto nivel de humedad y bajo contenido de lignocelulosa por lo que son materia prima atractiva para la producción de biogás (Milledge *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2015). Utilizar macroalgas como biomasa para la producción de bioenergía de tercera generación tiene ventajas sobre la biomasa terrestre, unas de ellas son que las algas son organismos muy abundantes con alta tasa de crecimiento, tienen una distribución geográfica extensiva, no se les tiene que suministrar agua ni nutrientes para su crecimiento y no compiten por espacio terrestre para su producción y cultivo (Sudhakar *et al.*, 2018).

La DA de algas es un proceso simple en términos de ingeniería y elimina la necesidad de secar la biomasa, ya que la humedad puede favorecer la producción de metano al facilitar el acceso de microorganismos o enzimas a los compuestos orgánicos. Esta tecnología comúnmente es de bajo costo y requiere bajo aporte energético, siendo un negocio redituable al producir bioenergía y digestato, que puede ser utilizado como fertilizante (Fujiwara *et al.*, 2022). El biogás producido en la DA de algas es comúnmente de alta calidad, con un mayor porcentaje de metano respecto al dióxido de carbono y bajo porcentaje de hidrógeno y sulfuro de hidrógeno (Milledge *et al.*, 2019). También, las algas producen la mayor parte del oxígeno del planeta y absorben gran parte del dióxido de carbono, lo que ofrece un biocombustible neutro en emisiones de carbono (Del Río *et al.*, 2020).

Se ha determinado el rendimiento de metano de diferentes algas marinas, obteniendo rendimientos similares en géneros que pertenecen al mismo grupo (**tabla 2.2**) (Barbot, Al-Ghaili y Benz, 2016). Estos valores demuestran que las algas marinas representan una biomasa prometedora para la producción de biogás, pero el rendimiento de metano varía dependiendo de la especie, la composición química, la localidad y la estación del año (Milledge *et al.*, 2020). Los factores que pueden afectar la DA de las algas marinas son el contenido de fibras difíciles de digerir, polifenoles, sales, sulfuro y metales pesados, la relación C/N y que la disponibilidad y la calidad de la biomasa puede cambiar dependiendo de la temporada del año (Ward *et al.*, 2014).

Tabla 2.2. Rendimientos de metano de algas marinas reportados en el trabajo de Barbot y colaboradores (2016)

Alga	Grupo	Rendimiento reportado (mL CH ₄ /g SV)
<i>Sargassum</i>	Pardas	120-190
<i>Laminaria sp.</i>	Pardas	180-300
<i>Ascophyllum</i>	Pardas	110
<i>Gracilaria</i>	Rojas	280-400
<i>Ulva lactuca</i>	Verdes	200-480

Utilizar macroalgas invasoras con crecimientos masivos, como el sargazo en las costas del Caribe Mexicano, para generar metano convierte un problema en un beneficio, representando ventajas económicas y ambientales. Al emplear sargazo como materia prima en la DA, se realiza la remoción de estas algas del ambiente, evitando problemas de anoxia y su descomposición en la costa y se ofrece una alternativa para manejar correctamente este desecho biológico (McKennedy y Sherlock, 2015). Así mismo, se minimizan impactos económicos por la pérdida de turismo y alteración en la industria pesquera. También, por medio de DA se puede producir energía renovable y se revaloriza la biomasa de sargazo, reduciendo el costo de su manejo. Es una oportunidad que no requiere cultivar el alga, sino utilizar la que se remueve de las costas (Barbot, Al-Ghaili y Benz, 2016).

Las algas pardas contienen una gran cantidad de polisacáridos como alginato, fucoidan, celulosa, almidón y laminarina, por lo que se consideran valiosas para la biometanización (Saratale *et al.*, 2018). Su productividad, considerando las toneladas que producen por cada hectárea, es mayor que la de las algas verdes y rojas y se ha demostrado la factibilidad de utilizarlas para la producción de biocombustible por medio de DA, ya que pueden ser procesadas fácilmente para producir AGVs (Song *et al.*, 2015).

La producción de biocombustible empleando algas pardas se ha determinado prometedora por los niveles de humedad, carbohidratos y la baja presencia de lignina y celulosa en dichos organismos, pero se ha encontrado que la producción de metano a escala de laboratorio ha sido menor al 50% del potencial bioquímico de metano teórico (PBMT) en distintas especies de algas pardas (Thompson, Young y Baroutian, 2021). Esto es bajo comparado con otros sustratos, por ejemplo, con residuos de papel, alimento y jardinería, se obtuvo un porcentaje de conversión de metano de 82 a 100% respecto al teórico (Yasim y Buyong, 2023). Se están buscando formas de mejorar la productividad de metano en algas pardas, logrando mejoras en la DA empleando pretratamientos y codigestión con residuos alimenticios. Esto demuestra que hay procesos que pueden mejorar la productividad de metano para el aprovechamiento del sargazo (Thompson, Young y Baroutian, 2021).

2.6. DIGESTIÓN ANAEROBIA DE *S. NATANS* Y *S. FLUITANS*

Como se estableció anteriormente, utilizar la biomasa de sargazo para producir metano, permitirá aprovechar la biomasa, contribuiría a reducir el impacto negativo en el ambiente que se ha inducido antropogénicamente y a migrar a las energías renovables. Se ha encontrado que el PBM de diferentes especies de sargazo es muy variable, entre 41.8 a 541 mL de CH₄/g SV, dependiendo de la especie, estación del año, condiciones de operación y pretratamiento (Lopresto *et al.*, 2022). Se han realizado trabajos

de DA en las especies que se encuentran en el cinturón de sargazo (*S. natans* y *S. fluitans*) donde se ha determinado que, sin realizar ningún tratamiento, el rendimiento de metano de dichas especies es bajo, respecto al teórico (**tabla 2.3**).

Se argumenta que estos resultados son debido a la baja degradabilidad del sargazo no tratado, siendo su hidrólisis el paso limitante que determina la eficiencia de conversión. Aunado a lo anterior, existen varios factores que pueden ser inhibitorios de la DA del sargazo: los polímeros recalcitrantes (polisacáridos, fibras inorgánicas, lignina), la presencia de sales, polifenoles y metales pesados y el bajo rango C/N (Chikani-Cabrera *et al.*, 2022). Así mismo, existen diferencias en la composición química entre especies y morfotipos, además de los cambios espaciotemporales (Robledo *et al.*, 2021). Todo esto afecta el rendimiento de metano, por lo que se deben encontrar estrategias para realizar pretratamientos, con el fin de modificar las paredes celulares, o bien considerar codigestiones, para aminorar los efectos inhibitorios, que lleven a mejorar la hidrólisis y la DA de *S. natans* y *S. fluitans* (Lopez-Aguilar *et al.*, 2021).

El rendimiento teórico de metano de un sustrato se calcula con la cantidad de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno dentro de la biomasa que se va a digerir y puede variar entre cada especie, morfotipo e incluso cada muestra del sargazo (Thompson, Young y Baroutian, 2021). Para obtener el rendimiento teórico de metano es necesario caracterizar la biomasa, obtener la composición química de la molécula orgánica (C_aH_bO_cN_d) y utilizar la ecuación de Buswell a continuación:

$$Y_{\text{CH}_4}^{\text{Buswell}} = \frac{(4a+b-2c-3d) \times 22.4}{(12a+b+16c+14d) \times 8}$$

Este dato permite determinar la eficiencia de conversión de un sustrato a metano, para así determinar si un sustrato es de interés para realizar su DA a nivel industrial (Labatut *et al.*, 2011).

Tabla 2.3. Rendimiento teórico de metano, experimental e incrementado por procesamientos en los trabajos realizados de DA en *S. natans* y/o *S. fluitans*. Todos los rendimientos están reportados en mL CH₄/g SV.

Biomasa	Rendimiento teórico	Rendimiento control	Procesamiento	Rendimiento incrementado	Efectividad	Referencia
<i>S. fluitans</i>	485	61	Codigestión sargazo: residuos orgánicos 1:2*	346 (526 teórico)**	13% a 66% conversión	Morrison y Gray, 2017
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	ND	81 ± 1.2	Cultivo enzimático	86 ± 0.7	6%	Tapia-Tussel <i>et al.</i> , 2018
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	ND	81 ± 1.2	Hongo: <i>Trametes hirsuta</i>	104 ± 1-4	28%	Tapia-Tussel <i>et al.</i> , 2018
<i>S. natans</i> VIII	207 sin fibra, 449 con fibra	145	NA	NA	70% teórico	Milledge <i>et al.</i> , 2020
<i>S. natans</i> I	187 sin fibra, 460 con fibra	66	NA	NA	35% teórico	Milledge <i>et al.</i> , 2020
<i>S. fluitans</i>	221 sin fibra, 464 con fibra	113	NA	NA	51% teórico	Milledge <i>et al.</i> , 2020
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	143	41.83 ± 3.07	Pretratamiento hidrotérmico	117 ± 2.14	179% incremento	Thompson <i>et al.</i> , 2020b
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	143	48.23 ± 5.11	Pretratamiento hidrotérmico	102 ± 3.18	114% incremento	Thompson <i>et al.</i> , 2021
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	143	48.23 ± 5.11	Pretratamiento hidrotérmico y codigestión residuos orgánicos 1:3	292 ± 9**	508% incremento	Thompson <i>et al.</i> , 2021
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	840***	348***	NA	NA	41% teórico	López-Aguilar 2021
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	308	50±10	Tratamiento de extrusión	108±6	118% incremento	Ayala-Mercado <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	308	50±10	Explosión de vapor	114±4	128% incremento	Ayala-Mercado <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento físico + carbono activado	224±9	55% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento físico	153±2	38% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento químico + carbono activado	240±3	59% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022

Biomasa	Rendimiento teórico	Rendimiento control	Procesamiento	Rendimiento incrementado	Efectividad	Referencia
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento químico	231±12	57% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento enzimático + carbono activado	180±1	44% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento enzimático	173±1	43% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento químico + enzimático + carbono activado	386±5	95% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento químico + enzimático	387±1	95% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento térmico + químico + enzimático + carbono activado	318±10	78% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	405±19	ND	Tratamiento térmico + químico + enzimático	365±8	90% teórico	Chikani-Cabrera <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	ND	44±9	Pretratamiento enzimático	72±15	66% incremento	Este trabajo
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	ND	82±2	Co-digestión estiércol bovino 5:1	128±8	29% incremento	Este trabajo

*Proporciones calculadas en sólidos volátiles (SV). **Sin eliminar la aportación del co-sustrato. ***Sin eliminar la aportación del inóculo (150 mL inóculo, 10 g sustrato). +Rendimiento control indica que es el rendimiento obtenido con el sargazo sin ser sometido a ningún tipo de pretratamientos

2.6.1. Factores que afectan la digestión anaerobia en *S. natans* y *S. fluitans*

Los factores que afectan la bioconversión de sargazo a metano son: la resistencia de su pared celular asociado a sus polisacáridos estructurales, la acumulación de metabolitos tóxicos con actividad antimicrobiana y la presencia de inhibidores como polifenoles, sales y metales pesados, así como proporciones desfavorables de C/N (Barbot, Al-Ghaili y Benz, 2016). Dependiendo de la concentración de los compuestos tóxicos, se puede inhibir la degradación microbiana. En la **tabla 2.4** se compila lo reportado en los trabajos de DA realizados en *S. natans* y *S. fluitans* referente a los factores inhibitorios que afectan el PBM. Se puede ver que en distintos momentos del año y lugares la concentración de compuestos inhibitorios, polisacáridos e incluso la relación de C/N cambia, lo cual explica que haya tanta variabilidad en lo reportado en las pruebas de PBM.

Tabla 2.4. Presencia y concentración de factores inhibitorios de la DA reportados en trabajos realizados en *S. natans* y *S. fluitans*.

Especie	Sitio y fecha	Rendimiento control* mL CH ₄ /g SV	Polisacáridos (ps)	Cenizas (%)	Sales (% ps)	Metales pesados mg/kg	Fenoles	C/N	SV/ST (%)	Referencia
<i>S. fluitans</i>	NR	61	13% laminarina, 6% fucoidan, 15% alginato	22	Sulfato 3.8	Pb (0.32), I (85.3), As (45)	ND	30	78	Morrison y Gray, 2017
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	Enero 2017 Yucatán	81 ± 1.2	16% lignina, 31% celulosa, 10% hemicelulosa	35	ND	ND	19% ps	ND	75	Tapia-Tussel <i>et al.</i> , 2018
<i>S. natans VIII</i>	Junio 2019 Islas Turcas y Caicos	145	37% fibra, 22% carbohidratos	34	% ps: NaCl 19. % en cenizas: 18 CaCO ₃ , 9 KCl, 57 NaCl, 7 MgO, 1 K ₃ Na(SO ₄) ₂ , 6 CaSO ₄ , 1 Na ₂ SO ₄	Al (16), As (21), Cd (0.1), Cr (0.36), Cu (1), Pb (82), Fe (0.5), Mn (<3), Zn (26)	4 mg/g SV	17	66	Milledge <i>et al.</i> , 2020
<i>S. natans I</i>	Junio 2019 Islas Turcas y Caicos	66	37% fibra, 19% carbohidratos	36	% ps: NaCl 23. % en cenizas: 12 CaCO ₃ , 0.3 KCl, 72 NaCl, 8 MgO, 0.28 K ₃ Na(SO ₄) ₂ , 3 CaSO ₄ , 3 Na ₂ SO ₄	Al (21), As (30), Cd (0.12), Cu (3), Pb (998), Fe (0.28), Hg (0.01), Zn (31)	10 mg/g SV	22	64	Milledge <i>et al.</i> , 2020
<i>S. fluitans</i>	Junio 2019 Islas Turcas y Caicos	113	31% fibra, 27% carbohidratos	34	% ps: NaCl 19. % en cenizas: 12 CaCO ₃ , 0.3 KCl, 72 NaCl, 8 MgO, 8 K ₃ Na(SO ₄) ₂ , 8 CaSO ₄ , 0.24 Na ₂ SO ₄	Al (28), As (26), Cd (0.12), Cr (0.43), Cu (3), Pb (282), Fe (0.4), Hg (0.01), Zn (36)	6 mg/g SV	19	66	Milledge <i>et al.</i> , 2020
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	Junio 2018 Barbados	42 ± 3	33% fibra	32	ND	As (35), Cd (0.8), Hg (1.4), Pb (0.4), Al (2300)	ND	22	68	Thompson <i>et al.</i> , 2020
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	Junio 2019, Quintana Roo	348**	ND	26	ND	Cu (0.01), Fe (0.26), Zn (0.05)	ND	27	74	López-Aguilar <i>et al.</i> , 2021
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	Agosto 2019, Puerto Morelos	50±10	ND	34	ND	Al (0.032), Ba (0.243), Cr (0.011), Cu (0.036), Fe (0.251), Zn (0.098)	ND	9	66	Ayala-Mercado <i>et al.</i> , 2022
<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	Otoño 2020 y 2021, Puerto Morelos	ND	Fibra: 7-75%, Lignina 16-30%	22	15-23	15-23 DW	25% ps	24	78	Chikani- Cabrera <i>et al.</i> , 2022

Ps= peso seco. SV/ST= sólidos volátiles/sólidos totales. ND= No determinado. *Rendimiento del sargazo sin ser sometido a ningún pretratamiento ni codigestión. **Sin eliminar la aportación del inóculo (150 mL inóculo, 10 g sustrato).

2.6.1.1. Lignocelulosa

La lignocelulosa está compuesta por hemicelulosa, celulosa y lignina, compuestos que le confieren resistencia estructural a las plantas y algas y determinan la degradabilidad de la biomasa. Aunque el sargazo no tenga alto contenido de lignocelulosa, estos compuestos forman estructuras complejas que vuelven a la biomasa altamente recalcitrante. La eficiencia en la degradación de estos compuestos es dependiente de la hidrólisis, que es el proceso más lento y la fase determinante de la DA. La hidrólisis es la descomposición biológica de polímeros orgánicos a moléculas pequeñas

(Corrales *et al.*, 2015). Aunque ciertas algas son menos recalcitrantes que las plantas terrestres, el rompimiento de su pared celular puede ser limitado y provocar bajo rendimiento de metano (Barbot, Al-Ghaili y Benz, 2016).

Los factores clave para la degradación de la lignocelulosa (**Fig. 2.4**) son la accesibilidad del área superficial, la polimerización y cristalinidad de la celulosa, la estructura entrecruzada de la hemicelulosa y la protección ejercida por la lignina (Wu *et al.*, 2019). Emplear estrategias de hidrólisis para contender con la dificultad de degradar la biomasa lignocelulósica es clave

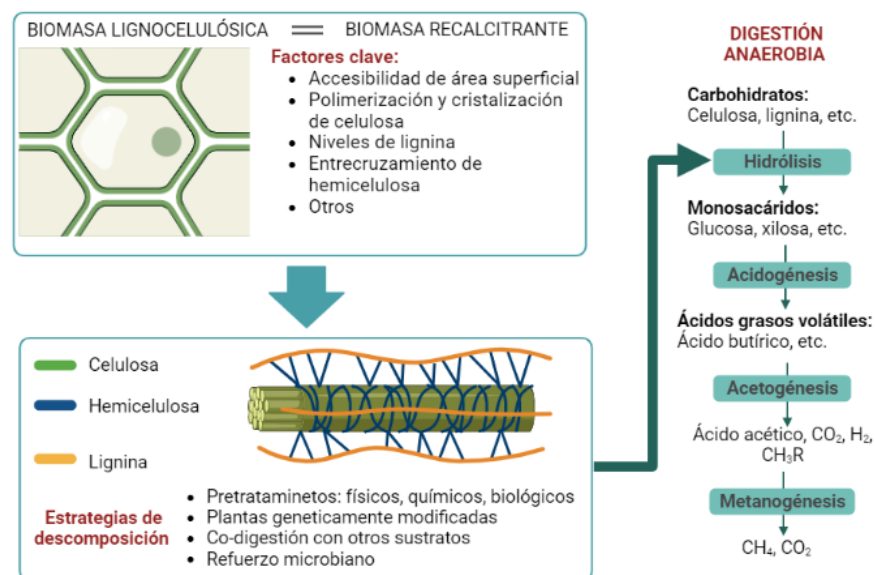


Figura 2.4. Factores clave que vuelven a la biomasa recalcitrante. Estrategias de descomposición y fases de la DA (Modificado de Wu *et al.*, 2019).

para lograr mejorar la producción de biocombustibles. Esto se puede lograr aplicando pretratamientos a la biomasa, lo cual se ha utilizado para buscar mayor rendimiento de metano por DA del sargazo (Milledge *et al.*, 2018).

2.6.2.2. Polisacáridos estructurales

El PBM del sargazo es menor que el obtenido en plantas terrestres que contienen mayores fracciones de lignocelulosa, lo que indica que hay otros componentes que están provocando la baja degradabilidad de estas algas. Se ha reportado que las algas pardas contienen aproximadamente 76% del peso seco de polisacáridos estructurales, y estos son diferentes a los de plantas terrestres. Los más abundantes son el alginato, el fucoidan y la laminina que, por su complejidad estructural y los entrecruzamientos que forman, dificultan la degradación de la biomasa (Barbot, Al-Ghaili y Benz, 2016). En *S. natans* y *S. fluitans* se ha encontrado un alto contenido de alginato y de fucoidan y no hay ningún reporte del contenido de laminina en estas especies de sargazo (tabla 2.1).

Las algas pardas que contienen polisacáridos estructurales como alginato, laminina y fucoidan presentan PBM similares (*S. natans* y *S. fluitans*: 152 mL CH_4/g SV (Álvarez *et al.*, sin publicar), *S. muticum*: 163 mL CH_4/g SV (Menein *et al.*, 2021) y *Laminaria sp.*: 150 mL CH_4/g SV (Montigelli *et al.*, 2015)), mientras que *Ulva lactuca* (271 mL CH_4/g SV (Bruhn *et al.*, 2011)), que es un alga verde que no tiene dichos polisacáridos, tiene un PBM mucho

más alto. Este antecedente genera interés para profundizar en los efectos de estos polisacáridos estructurales en la degradación de la biomasa algal que los contiene (Milledge *et al.*, 2019).

La laminarina es un polisacárido lineal de glucano, tiene cadenas laterales de manitol y glucosa y su función es almacenar energía. El fucoidan es un polisacárido sulfatado que se encuentra en el tejido fibroso de la pared celular, interconectado con enlaces glicosídicos; está compuesto de fucosa, glucosa, manosa, ramnosa, xilosa y ácido urónico. El alginato es un polisacárido poliurónico conformado por ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G), que forman bloques MM, GG y GM. Cada especie puede tener un tipo de alginato con características diferentes, como la proporción de M/G, peso molecular y grado de acetilación. Cuando un tipo de alginato tiene más bloques GG es más soluble en agua y el alginato con mayor contenido de bloques MM tiene mayor viscosidad (Dobrincic *et al.*, 2020).

Sargassum spp. contiene de 16 a 54% de ácido manurónico, 46 a 84% de ácido gulurónico, que son los monosacáridos del alginato, y una proporción de M/G de 0.19 a 1.18% (Liu *et al.*, 2019). En *S. natans* y *S. fluitans* el ácido manurónico y ácido gulurónico representan del 65 a 67% de los monosacáridos presentes (Davis *et al.*, 2020). De los polisacáridos anteriormente mencionados, el más abundante en algas pardas es el alginato, siendo más concentrado en los meses con temperaturas más altas en el océano ya que tiene la función de prevenir la deshidratación de las células. La laminarina y el manitol tienen mayor concentración en la primavera y verano, mientras que los fucoidanos son prevalentes en otoño (Thompson *et al.*, 2020a).

La DA del sargazo se puede ver afectada por los polisacáridos ya mencionados, ya que en las algas pardas se forman microfibrillas de celulosa que están embebidas en una mezcla compleja de alginato, fucanos, hemicelulosa, fenoles y compuestos proteicos, que dificultan la degradación del alga. Por lo tanto, es de interés buscar la hidrólisis previa del alginato y la celulosa al ser los polisacáridos más abundantes que limitan la DA. El alginato, al solubilizarse, genera un gel que incrementa la viscosidad, lo que impide la entrada de enzimas y microorganismos para la degradación de la biomasa (Barbot, Al-Ghaili y Benz, 2016).

Se ha determinado que el ácido algínico tiene un rendimiento de metano de 73 mL de CH_4/g SV, lo cual equivale al 23% de su potencial de metano teórico. En la DA de polisacáridos en grado reactivo, la laminarina se reduce a menos del 5% en las primeras 24-48 horas en un digestor anaerobio, mientras que alrededor del 30% del alginato continúa sin ser hidrolizado después de 30 días, esto lleva a pensar que la hidrólisis del alginato es de

los factores más limitantes de la DA de algas pardas (Milledge *et al.*, 2019).

2.6.2.3. Cenizas

Las cenizas de la biomasa comprenden metales pesados y sales minerales que no se volatilizan al exponer la biomasa a una temperatura de 550°C; se trata de material inerte. El sargazo tiene un alto contenido de cenizas (22-34%) y si se suma con el contenido de fibra, se tiene que aproximadamente 67% del peso seco de la biomasa no se puede degradar o es de difícil degradación (Milledge *et al.*, 2020). Por ser una matriz biológica absorbente, el sargazo tiene alto contenido de metales, macronutrientes y elementos traza que dificultan el funcionamiento de los reactores (Tapia-Tussel *et al.*, 2017).

2.6.2.4. Metales pesados

Se ha detectado la presencia de metales pesados en el sargazo, ya que las algas comúnmente absorben metales e incluso se emplean para su remoción en cuerpos de agua (Davis *et al.*, 2020). Los metales pesados pueden interferir en la DA, provocando bajo rendimiento de metano, ya que son inhibitorios de las fases de la DA, afectando la actividad de los microorganismos involucrados (Lin, 1993). Hay una gran variedad de metales pesados en *S. natans* y *S. fluitans*, y estos pueden estar afectando la producción de metano (Davis *et al.*, 2020).

Como se ha mencionado anteriormente, el digestato resultante de la DA del sargazo puede ser empleado como fertilizante, pero se debe monitorear la concentración de metales pesados presentes, ya que éstos pueden llegar a niveles tóxicos en los suelos y generar problemas ecológicos y amenaza a la salud. Se ha detectado presencia de metaloides, metales de transición y metales pesados como Al, Ba, Cr, Cu, Zn, Pb, Cd, Hg, y Fe en *S. natans* y *S. fluitans*. Sin embargo, en todos los casos, las concentraciones de estos elementos no son consideradas dañinas para los ecosistemas, de acuerdo con la NOM-001-SEMARNAT, por lo que se permite utilizar estas algas como fertilizantes (López-Aquilar *et al.*, 2021).

La presencia de As puede ser inhibitorio para la DA en concentración de 0.7 a 1.1 mg/L y, también ha llamado la atención por ser una amenaza a la salud humana. Alzate-Gavira y colaboradores (2021) determinaron que su concentración en el sargazo no llega a niveles tóxicos. Por otro lado, Lopresto y colaboradores (2022) obtuvieron una concentración de 24-172 mg/kg de As en sargazo recolectado de México y República Dominicana, lo que debe ser monitoreado. El máximo permitido en la NOM-004-SEMARNAT 2002 (biosólidos) es de 41 mg/kg base seca para clase “excelentes” y de 75 mg/kg base seca para clase “buenos”, en la **tabla 2.4** se observa que lo obtenido de As en muestra de sargazo utilizadas en los trabajos que realizan su DA va de 21 a 45 mg/kg, estando dentro de lo permitido por la NOM.

Oxenford y colaboradores (2021) encontraron que el As, Cu, Mb y Mn exceden los límites seguros en algunas de las muestras de sargazo colectado en México. Se ha demostrado que la DA reduce la cantidad de arsénico y otros metales pesados en la biomasa del sargazo hasta por 2/3, al solubilizarse estos metales y quedar en el sobrenadante, lo cual permite utilizar el digestato como fertilizante; sin embargo, estos se transfieren al efluente, por lo que requiere tratamiento para su remoción (Milledge *et al.*, 2020).

En el sargazo también hay elementos metálicos como el Fe, Ni, Zn, Mo y Cu, que pueden actuar como micronutrientes para balancear los microorganismos y, en algunos casos, como cofactores enzimáticos. También tiene macronutrientes como Na, Mg, Al, P, K y Ca que son esenciales para el crecimiento microbiano, pero en concentraciones muy altas pueden inhibir la DA. El Pb, Cd, Hg, As y Cr pueden ser potencialmente tóxicos para los microorganismos y en, altas concentraciones, el Mg, K y Na también resultan tóxicos (Thompson *et al.*, 2020a).

2.6.2.5. Sales y minerales

Las algas tienen un alto contenido de sales, en las cuales predomina el cloruro de sodio (NaCl). El sodio en concentraciones bajas ayuda al crecimiento microbiano, pero es moderadamente inhibitorio en una concentración superior a 2 g/L y se vuelve muy inhibitorio a una concentración de 8 g/L, ya que ocasiona que las células se deshidraten y mueran (Zhao *et al.*, 2017). Por su origen marino las algas pardas contienen aproximadamente 15% de su peso seco de sal cuando no se les lava. Se ha reportado que concentraciones de sal mayores a 10 g/L disminuye la actividad microbiana por la presión osmótica, reduciendo la productividad de metano, siendo el cloruro de sodio y el sulfato los componentes más dañinos y abundantes (Thompson *et al.*, 2020a).

2.6.2.6. Fenoles

El sargazo tiene compuestos fenólicos en sus paredes celulares. Estos sirven para protegerse contra herbívoros. Sin embargo, los fenoles impactan negativamente la DA ya que inactivan enzimas y dañan estructuras membranales de los microorganismos dentro de los reactores, alterando su permeabilidad y generando fuga de componentes intercelulares (Ayala-Mercado *et al.*, 2022). Milledge y colaboradores reportan que estos compuestos inhiben la DA desde etapas tempranas del proceso (hidrólisis). En su trabajo encuentran altos niveles de compuestos fenólicos en el sargazo, teniendo diferencias significativas entre las distintas especies y morfotipos del sargazo y concluyen que estos compuestos juegan un papel importante en el bajo rendimiento de metano obtenido (Milledge *et al.*, 2020). Los polifenoles pueden llegar a una concentración de 29.5 mg/g peso seco de sargazo, la cual es inhibitorio para la DA (Lopresto *et al.*, 2022).

Dentro de los fenoles presentes en algas pardas, el ácido gálico puede representar del 7-30% del peso seco e inhibe la producción de biogás al 75% cuando se encuentra en una concentración de 10 mg/L. Otros fenoles inhibitorios reportados en algas pardas son el floroglucinol y los florotaninos que en una concentración de 17.5 mg/L y 200 mg/L, respectivamente, reducen el rendimiento de metano aproximadamente un 50% (fig. 2.5). Se ha determinado que los compuestos fenólicos inhiben la degradación de moléculas complejas como alginato, almidón, celulosa y que la co-digestión con otros sustratos puede reducir el nivel de fenoles y su efecto inhibitorio en el rompimiento de moléculas complejas (Milledge *et al.*, 2019).

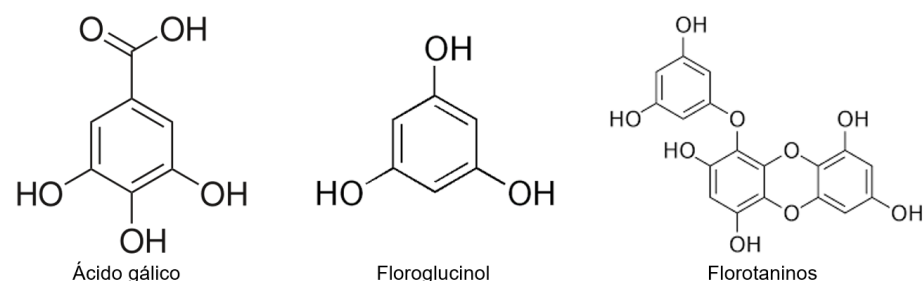


Figura 2.5. Estructura de compuestos fenólicos inhibitorios de la DA.

2.6.2.7. Relación Carbono/Nitrógeno

La relación de carbono/nitrógeno contenida en el sargazo puede limitar su DA; lo recomendado para que el digestor trabaje de forma correcta, sin inhibición, y se produzca buena cantidad de biogás, es tener una relación C/N entre 16 y 45, aunque el rango óptimo de C/N es de 20-30 (Chikani-Cabrera *et al.*, 2022). Si la proporción es menor a 15, el nitrógeno se acumula, se produce amoníaco, que inhibe la metanogénesis, resultando en acumulación de ácidos grasos volátiles (AGVs), lo que baja el pH dentro del digestor agravando la inhibición de la producción de la producción de metano (Lopresto *et al.*, 2022). En biomasa de algas se ha reportado rangos de C/N entre 8.72 a 58 (López-Aguilar *et al.*, 2021).

En los trabajos realizados en *S. natans* y *S. fluitans* solo Ayala-Mercado y colaboradores obtuvieron un rango fuera de lo recomendado de C/N (8.6), en los demás estudios no hubo correlación entre el rango C/N y la baja producción de metano, por lo que no se considera que ese sea el factor inhibitorio en la DA de sargazo (tabla 2.4). El rango C/N puede variar por la localidad y temporada de colecta del sargazo, por lo que no se descarta que esto pueda afectar en ciertos casos la DA del sargazo (Milledge *et al.*, 2020).

2.6.2.8. Especie, morfotipos y espacio-temporalidad

Para el aprovechamiento del sargazo se debe tomar en cuenta que no se

conoce la cantidad que llegará a las costas de las localidades cada mes, lo que dificulta determinar apropiadamente el potencial de su uso para producir bioenergía. Se ha observado un patrón a través de los años, donde el pico de arribos en el caribe mexicano es en julio y agosto, y en diciembre y enero hay poca llegada de sargazo. Esto es debido a que, de enero a mayo, el sargazo se encuentra en la corriente ecuatorial del norte y se transporta al mar caribe para llegar a México 2-3 meses después (García-Sánchez *et al.*, 2020). Se ha reportado que cada año la temporada de mayores arribos de sargazo es más larga, en 2019 fue de abril a julio y en 2020 comenzó en marzo y se extendió hasta agosto. Además, en 2020 y 2021 se registró mayor acumulación de sargazo que en años anteriores (Iporac *et al.*, 2022).

Por otro lado, en el mar y cinturón de sargazos hay diferentes especies y morfotipos. El mar de los sargazos está conformado por *S. fluitans* morfotipos III y X y *S. natans* morfotipos I, II, VIII y IX. En el golfo de México *S. natans* I consta del 86% y el resto es *S. fluitans* III, en el caribe 50% es *S. fluitans* III, 30% *S. natans* I y 20% *S. natans* VIII. En 2018 en las costas mexicanas se registró llegada de *S. fluitans* III, *S. natans* I y *S. natans* VIII, predominando *S. fluitans* III (Dibner *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que la proporción de diferentes morfotipos en el caribe mexicano cambia anualmente desde el 2015, mostrando variaciones intermensuales y anuales (Oxenford *et al.*, 2021). Esto tiene efecto en la DA, ya que cada morfotipo tiene diferente composición bioquímica y por ende diferente PBM. Se ha determinado que *S. fluitans* III, *S. natans* I, *S. natans* VIII tienen un rendimiento de metano experimental de 113, 66 y 187 mL CH₄/g SV, respectivamente, lo que demuestra que cada morfotipo tiene diferente potencial para la producción de metano. En la tabla 2.4 se observa que *S. natans* I tiene mayor porcentaje de fenoles, sales y cenizas y menor porcentaje de carbohidratos que los otros dos morfotipos de sargazo, lo cual puede disminuir su rendimiento de metano (Milledge *et al.*, 2020).

El sargazo tiene cambios en su composición debido a factores bióticos: especie, estadio y ciclo de vida, y por factores abióticos: pH, salinidad, corrientes de agua, luz, minerales y contaminantes. Hay poco conocimiento de la composición química del sargazo del Caribe y su variación espacio-temporal, por lo que es necesario realizar análisis de muestras a largo plazo y en diferentes sitios, pero el costo de análisis es alto (Oxenford *et al.*, 2021). En un estudio de *S. fusiforme* se encontró que la biomasa colectada de distintos sitios tiene diferencias significativas en su composición (Zhang *et al.*, 2020). Así mismo, en *S. horridum* se comprobó que hay variación en la composición química cada mes, teniendo diferencias significativas en niveles de humedad, cenizas, fibra, carbohidratos, proteínas y lípidos (Di Filippo-Herrera *et al.*, 2018).

Los cambios espaciotemporales también tienen un efecto en el rendimiento de metano. En *L. digitala* hay menor rendimiento en marzo que en julio, incrementando 30% en julio (Thompson *et al.*, 2020^a). En *S. muticum* la producción de metano varía significativamente dependiendo de la temporada; en las muestras de primavera se comenzó a producir metano a los 3 días de la PBM, y la biomasa de verano comenzó a producir después de 6 días, lo que puede deberse a que la biomasa de primavera tiene sustratos fáciles de degradar, como el manitol, y en verano tiene más sustratos difíciles de degradar, como el alginato (Meneein *et al.*, 2021).

Por los rendimientos teóricos en *S. natans* y *S. fluitans* mostrados en la **tabla 2.3** se presume que son diferentes por el cambio en la composición en la biomasa utilizada, ya que en cada trabajo se recolectó el sargazo en sitios, años y épocas distintas. Los rendimientos experimentales varían y difieren del teórico por la composición, y porque la concentración de compuestos inhibitorios como las cenizas, el sulfuro, sales, fibras insolubles, polisacáridos estructurales y proporción de C/N también tienen cambios espaciotemporales (**tabla 2.4**) (Oxenford *et al.*, 2021). Para contrarrestar las problemáticas de la DA en *S. natans* y *S. fluitans* que se han detallado, se pueden realizar pretratamientos y codigestión del sargazo con otros sustratos.

2.7. PRETRATAMIENTOS

El rendimiento de metano en la DA a partir de algas pardas comúnmente es menor al 50% del valor teórico, por lo que se debe considerar el pretratamiento de esta biomasa para aminorar su característica recalcitrante y los efectos inhibitorios de los factores anteriormente analizados (Song *et al.*, 2015). Con esto se busca solubilizar la biomasa y liberar una mayor cantidad de azúcares fermentables para continuar con la acetogénesis (Thompson *et al.*, 2019).

Con pretratamientos se puede incrementar el área superficial de la biomasa a hidrolizar, reducir la cristalinidad y polimerización de la celulosa y remover la lignina. La selección de un método correcto de pretratamiento es crucial para la producción de metano (Millati *et al.*, 2020). Se ha probado que con esto se disminuye la característica recalcitrante de la lignocelulosa, modificando la disponibilidad de polisacáridos para su hidrólisis a azúcares y así lograr mayores rendimientos de biogás. En el caso del metano, se ha reportado que los rendimientos suben de 19-68%, cuando la biomasa es sometida a algún pretratamiento (Milledge *et al.*, 2018).

Los pretratamientos pueden ser físicos, químicos, fisicoquímicos o biológicos y cada uno y sus variantes tienen ventajas y desventajas (**fig. 2.6**). Se han empleado pretratamientos en macroalgas, pero es necesario realizar más estudios para determinar la viabilidad de estos procesos. En

S. natans y *S. fluitans* se han realizado diversos pretratamientos, de los cuales todos han incrementado el rendimiento de metano en grado diverso (**Tabla 2.3**). Los pretratamientos biológicos son efectivos para degradar la biomasa porque no producen inhibidores, son amigables con el ambiente, aplicables en el sitio permitiendo un balance tecno-económico adecuado (Tapia-Tussel *et al.*, 2018).

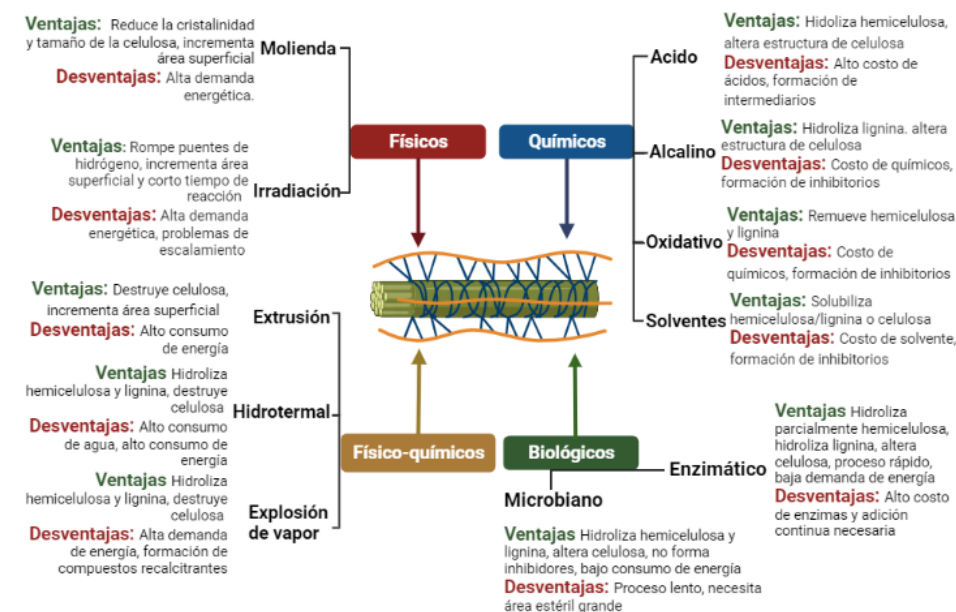


Figura 2.6. Pretratamientos químicos, físicos, fisicoquímicos y biológicos. Se muestran los subgrupos de cada uno y la ventajas y desventajas que representan (Modificado de Abraham *et al.*, 2020).

2.7.1 Pretratamiento biológico

Dentro de los pretratamientos biológicos existen dos categorías que incluyen los enzimáticos y los microbianos. Los enzimáticos presentan una rápida degradación, pero se inactivan pronto y son costosos. Los pretratamientos microbianos no son costosos y pueden ser fúngicos, bacterianos o de consorcios microbianos, en estos los microorganismos degradan polisacáridos complejos, pero también pueden consumir las azúcares liberadas. Los más empleados y estudiados son los fúngicos que, aunque presentan lento crecimiento, llevan a una alta degradación de lignina. Por otro lado, los bacterianos son veloces porque las bacterias son de crecimiento rápido, pero baja degradación de lignina. Los pretratamientos que emplean consorcios microbianos son de interés, ya que contrarrestan la lentitud de crecimiento de los hongos y la baja degradación de lignina de las bacterias, teniendo la posibilidad de contener tanto hongos como bacterias (Chen *et al.*, 2010).

2.7.1.1. Pretratamiento microbiano

Los pretratamientos biológicos microbianos son relativamente económicos y necesitan poca energía. En pretratamientos de tipo químico o fisicoquímico pueden generarse intermediarios y, aunque se mejora el proceso hidrolítico, podrían inhibir otras fases de la DA. Una ventaja del pretratamiento biológico microbiano es que esto no sucede. Otras ventajas son que es capaz de degradar los compuestos lignocelulósicos en diverso grado (celulosa, hemicelulosa y lignina) y que aumenta tanto la hidrólisis, como la producción de metano. Existen pocos estudios que utilicen este pretratamiento en algas pardas, por lo que explorar sus efectos es de gran interés (Thompson *et al.*, 2019).

Los pretratamientos biológicos con consorcios microbianos se llevan a cabo substrayendo el consorcio de un ambiente natural, donde hay biomasa lignocelulósica en descomposición. Para su mejor entendimiento y empleo es necesario secuenciar y caracterizar el consorcio, para identificar qué microorganismos están presentes. Se ha determinado que este tipo de pretratamiento es eficiente y evita problemas de represión de metabolitos, cuando se utilizan las cepas separadas (Orlando y Borja, 2020).

2.7.1.2. Pretratamientos enzimáticos

Los pretratamientos enzimáticos son más costosos que los microbianos, pero tienen la ventaja de ser más rápidos y potencialmente más efectivos. Las enzimas actúan de manera específica, por lo que es necesario conocer la estructura del componente celular que se desea hidrolizar. Identificar los polímeros clave en tejidos vegetales que deban ser hidrolizados permite desarrollar métodos para degradarlos y mejorar la DA (Obata, Akunna y Walker, 2015)

Los pretratamientos enzimáticos se han utilizado en algas pardas para la producción de biocombustibles, para la sacarificación del sustrato, para extraer polisacáridos comerciales y para analizar la biodegradabilidad. En todos los estudios se ha aumentado la hidrólisis de las algas, permitiendo obtener un mejor resultado en la aplicación que se les ha dado (Fasahati, Woo y Liu, 2015; Ravanal *et al.*, 2017; Dobrinčić *et al.*, 2020). Aplicar este método en el sargazo requeriría identificar los compuestos más recalcitrantes del sustrato y mejorar su hidrólisis por vía enzimática para llegar a la mayor producción de metano.

Así mismo, los microorganismos que producen enzimas hidrolíticas, comúnmente, las liberan al medio para degradar la biomasa. Es posible cultivar a los microorganismos en condiciones óptimas, para producir las enzimas hidrolíticas de interés y utilizar los extractos enzimáticos como pretratamiento. Este procedimiento resulta relativamente poco costoso y

ha presentado buenos resultados (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2017).

2.7.2. Pretratamiento biológico en sargazo

La hidrólisis de compuestos lignocelulósicos ha sido ampliamente estudiada, por lo que se conocen muchas enzimas y microorganismos capaces de degradar lignocelulosa. La hemicelulosa es el compuesto menos recalcitrante de la lignocelulosa y puede ser degradado por medio de enzimas xilanasas o beta-xilosidasas. Los microorganismos más estudiados que producen dichas enzimas son: *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus* sp. y *Humicola insolens*. La celulosa puede ser degradada con celulasas presentes en microorganismos como: *Apergillus* (*niger*, *nidulans*, *oruzar*), *Trichodemra reesei*, *Penicillium* sp., *Phanerochaete* sp., *Pycnoporus* sp. y *Humicola* sp. La lignina es el componente más recalcitrante de la lignocelulosa, las enzimas capaces de degradarla son las lacasas, peroxidadas y beta-eterasas y los microorganismos más estudiados para su hidrólisis son: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ceriporia ceratan*, *Cyathus stercoleris*, *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus cinnarbarinu* (Sindhu, Binod y Pandey, 2016).

De los polisacáridos presentes en algas pardas, se ha demostrado que el más recalcitrante y que representa un mayor problema en la DA es el alginato, el cual puede ser degradado por medio de enzimas alginato liasas, entre otras. Como se mencionó anteriormente, el alginato puede formar diferentes estructuras que dependen de su composición de G y M. Así mismo, existe una amplia variedad de alginato liasas y cada una es capaz de degradar estructuras específicas de alginato. Dentro de los organismos más estudiados que contienen alginato liasa son: *Sphingomonas* sp., *Bacillus* sp., *Vibrio* sp., *Flavobacterium* sp. y *Pseudomonas* sp. (Liu *et al.*, 2019).

Hay estudios que aplicaron pretratamientos biológicos, en sustratos diferentes al sargazo que alcanzaron incrementos en el rendimiento de metano hasta un 134% (Lalak *et al.*, 2016; Wagner *et al.*, 2018). Con sargazo, Tapia-Tussie y colaboradores realizaron un pretratamiento biológico en *S. natans* y *S. fluitans* empleando el hongo *Trametes hirsuta* aislado de madera en descomposición en Yucatán, México. En dicho trabajo realizaron dos tratamientos; en el primero cultivaron el hongo *T. hirsuta* en condiciones óptimas para producir lacasas y agregaron los extractos enzimáticos al sargazo, obteniendo 6% de incremento en el rendimiento de metano. En una segunda prueba, agregaron los micelios en suspensión de *T. hirsuta* y obtuvieron mejores resultados, incrementando 20%, en el rendimiento de metano (Tapia-Tussell *et al.*, 2018). Los micelios productores de enzimas tuvieron mayor efectividad que las enzimas solas, posiblemente porque los micelios rompen las estructuras compactas de la lignocelulosa, teniendo más área superficial para degradar lignina. Por otro lado, las lacasas

degradan la lignina que está en la superficie, pero la mayoría se encuentra compacta dentro de la lignocelulosa (Chen *et al.*, 2010)

Chikani-Cabrera *et al.* (2022) utilizaron los micelios en suspensión de *T. hirsuta* en las condiciones óptimas obtenidas por Tapia-Tussell *et al.*, (2018). Al realizar pretratamientos enzimáticos obtuvieron un rendimiento de 180 mL CH₄/g SV, que, aunque no determinaron el rendimiento control, está por arriba del promedio de lo obtenido en otros trabajos (**tabla 2.3**). Los resultados más llamativos son los de los pretratamientos combinados, ya que se alcanza un rendimiento de metano de hasta 386 mL CH₄/g SV en el pretratamiento químico y enzimático. Con el pretratamiento físico y enzimático también alcanzan un rendimiento de metano alto, comparado con lo obtenido en los pretratamientos por separado (365 mL CH₄/g SV). Ese trabajo sugiere que combinar pretratamientos es muy efectivo, lo que puede deberse a que los pretratamientos químicos y físicos tiene la capacidad de descompactar los polisacáridos estructurales, aumentando el área superficial, para que las enzimas puedan hidrolizarlos. Otro resultado interesante es que los pretratamientos enzimáticos combinados con tratamientos térmicos o químicos mejoran la calidad del biogás incrementando el contenido de metano de 50% hasta 80% (Chikani-Cabrera *et al.*, 2022).

Por otro lado, Davis *et al.* (2021) realizaron degradación de sargazo, empleando enzimas comerciales: Cellic2® CeTec2 que degrada la pared celular de plantas, una enzima alginato liasa, una laminarina y una amiloglucosidasa. Posteriormente, cuantificaron la producción de monosacáridos y obtuvieron los mejores resultados con la enzima Cellic2® CeTec2, que degrada celulosa. También se obtuvo la liberación de monosacáridos con la enzima amiloglucosidasa, capaz de romper enlaces glucosídicos presentes, por ejemplo, en la hemicelulosa. Con la enzima alginato liasa y laminarina obtuvieron una liberación de monosacáridos limitada, siendo posible que la primera enzima haya presentado baja liberación de monosacáridos por ser poco específica al alginato del sargazo y que la segunda no haya sido tan efectiva, porque la laminina no es un componente muy abundante en el sargazo.

2.7.3. Codigestion

La codigestión o cofermentación es un proceso en el cual se lleva a cabo la digestión de una combinación de diferentes residuos orgánicos, para obtener mayor rendimiento de metano, siendo un método económicamente viable. En algas, realizar codigestión con otros sustratos mejora la proporción C/N, aumenta la capacidad buffer del medio, diluye compuestos inhibitorios como sales, fenoles y metales pesados, mejora el balance de nutrientes, genera fertilizante de mejor calidad y aumenta el rendimiento de biogás (Saratale *et al.*, 2018).

En un caso de estudio en Barbados se señala que codigerir sargazo con residuos de alimentos en una proporción 25:75 base húmeda (BH), podría llevar a una ganancia económica de \$12.76 millones de dólares al año, habiendo tratado 15,750 toneladas de sustrato, generando 0.69 GWh de electricidad, 1.04 GWh de calefacción y 15,750 toneladas de digestato (Lopresto *et al.*, 2022)

Akila y colaboradores reportan con *Ulva sp.* un rendimiento de metano de 408 mL CH₄/g SV, pero al codigerirlo con estiércol de vaca (3:1) se obtuvo un rendimiento de 574 mL CH₄/g SV. Argumentan que el incremento se debe al aumento de C/N de 11.2 a 24.8 al mezclarlos (Akila *et al.*, 2019). En *Sargassum sp.* se obtuvo que al codigerirlo con glicerol, el rendimiento de metano aumentó 56% (5 g/L Sólidos totales (ST) de sargazo y 3 g/L de glycerol) y co-digerirlo con residuos orgánicos propició un aumento del 46% en el rendimiento de metano (13 g/L ST de sargazo y 0.88 g/L de residuos de comida); cabe recalcar, que en los resultados no se elimina el metano producido por el cosustrato (Oliveira *et al.*, 2015).

En la **tabla 2.5** se presentan los trabajos de codigestión que se han realizado en *S. natans* y *S. fluitans*, donde se varía la proporción de sustrato:cosustrato, y se observa que los mejores rendimientos se obtienen cuando se utiliza el cosustrato en mayor proporción. Esto confirma que el sargazo es una biomasa recalcitrante para la DA y, si bien la codigestión es una herramienta útil para aumentar la producción de metano, utilizar menor proporción de sargazo no es deseable, ya que es esa la biomasa que se busca aprovechar.

Tabla 2.5. Resultados de codigestión de *S. natans* y *S. fluitans* con diferentes cosustratos. Los rendimientos son reportados como mL CH₄/g SV. En entre paréntesis y negritas se especifica la proporción que se agregó de sustrato y cosustrato.

Artículo	Biomasa (p.s.*)	Codigestión (p.s*)	Rendimiento teórico	Rendimiento experimental	Efectividad**
Morrison y Gray, 2017	<i>S. fluitans</i>	No	485	61	13% conversion
Morrison y Gray, 2017	<i>S. fluitans</i> (1)	Residuos orgánicos (1)	432	255	59% conversion
Morrison y Gray, 2017	<i>S. fluitans</i> (2)	Residuos orgánicos (1)	422	218	52% conversion
Morrison y Gray, 2017	<i>S. fluitans</i> (3)	Residuos orgánicos (1)	437	173	39% conversion
Morrison y Gray, 2017	<i>S. fluitans</i> (1)	Residuos orgánicos (2)	526	346	66% conversion
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	No	143	48± 5	33% conversion
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	Pretratamiento térmico	143	102± 3	71% conversion
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> (3)*	Residuos de comida (1)*	ND	97 ± 51	NA
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> (1)*	Residuos de comida (1)*	ND	182 ± 3	NA
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> (1)*	Residuos de comida (3)*	ND	202± 6	NA
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> pretratado (3)*	Residuos de comida (1)*	ND	149± 8	NA
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> pretratado (1)*	Residuos de comida (1)*	ND	205± 14	NA
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> pretratado (1)*	Residuos de comida (3)*	ND	255± 6	NA
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> pretratado (3)*	Residuos de comida pretratada (1)*	ND	189±17	NA
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> pretratado (1)*	Residuos de comida pretratada (1)*	ND	238± 32	NA
Thompson <i>et al.</i> , 2021	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> pretratado (1)*	Residuos de comida pretratada (3)*	ND	292±9	NA
Este trabajo	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i>	No	ND	82±2	NA
Este trabajo	<i>S. natans</i> y <i>S. fluitans</i> (5)	Estiércol bovino (1)	ND	128±8	Aumento del 56%

*En el trabajo de Thompson y colaboradores (2021), se calcularon las proporciones con la BH de los sustratos. **Sin diferenciar que parte corresponde a cada componente de la co-digestión.

Capítulo

3

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los arribazones de sargazo actualmente representan un grave problema en la costa del sureste de México. Esta biomasa debe ser manejada adecuadamente para evitar impactos negativos en la zona, siendo una opción sustentable su conversión a metano. Para la producción de metano a partir de sargazo, la hidrólisis de las estructuras poliméricas es el factor limitante, por lo que realizar un pretratamiento biológico o una codigestión con estiércol bovino que acelere la tasa de conversión daría mayor factibilidad al proceso, al incrementar la productividad del metano y aumentar la reducción de la masa al final del proceso (digestato).

3.1. HIPÓTESIS

Integrar un pretratamiento biológico o codigestión con estiércol bovino en la digestión anaerobia del sargazo incrementa la tasa de hidrólisis y con ello, aumentar la degradación de esa biomasa y mejora la productividad de metano.

3.2. OBJETIVO

Incrementar la tasa de hidrólisis y la productividad de metano de *S. natans* y *S. fluitans*, mediante la aplicación de pretratamientos biológicos y la codigestión anaerobia con estiércol bovino.

3.2.1. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de los pretratamientos microbianos con cepas hidrolíticas adaptadas al sustrato sobre el potencial bioquímico de metano, a partir del sargazo.
- Determinar el efecto de aplicar pretratamientos enzimáticos en el sargazo y sus componentes recalcitrantes en el potencial bioquímico de metano.
- Determinar el efecto al utilizar estiércol bovino como co-sustrato hidrolítico y en codigestión con sargazo y con sargazo pretratado sobre el potencial bioquímico de metano.

Capítulo

4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE SARGAZO

Este trabajo se llevó a cabo con muestras de *S. natans* y *S. fluitans* recolectada frente a la costa de Puerto Morelos Yucatán en agosto del 2021. El material, alrededor de 10 kg de peso húmedo, fue drenado, colocado en una bolsa negra de polietileno y enviado por servicio de paquetería al Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería UNAM en Ciudad Universitaria. A su llegada, el sargazo fue enjuagado en agua de la llave y colocado en bolsas de cierre hermético de 5 litros, que fueron almacenadas en el cuarto frío (6°C) del Laboratorio. Esta mezcla de *S. natans* y *S. fluitans* se utilizó para todas las pruebas experimentales a continuación.

4.1.1. Análisis termogravimétrico

Se realizó la descomposición mediante calor de la muestra de *S. natans* y *S. fluitans*, previamente secada y molida. La prueba se llevó a cabo con 30 mg de sargazo en flujo de N₂ (60mL) con una rampa de calor de 10°C/ minutos, desde temperatura ambiente hasta 800°C en un equipo Labsys Evo, Setaram.

4.1.2. Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles

Se colocaron cápsulas de porcelana a peso constante en un desecador con sílica seca por 15 minutos, posteriormente se pesaron en una balanza analítica para registrar el peso inicial (**P1**). Se les agregó 20 g de muestra (sustrato, inóculo o cosustrato) y se colocaron en la estufa por 12 horas a 105°C. Pasadas las 12 horas se colocaron las muestras en el desecador por 30 minutos y se volvieron a pesar en balanza analítica para obtener el peso con muestra (**P2**). Se regresaron las muestras a la estufa por 15 minutos y, posteriormente, se colocaron en la mufla a 550°C de 30 minutos (para reactivos puros) a 2 horas (para muestras complejas), pasado el tiempo se pasaron a la estufa 15 minutos, después al desecador 45 minutos y, por último, se pesaron en la balanza analítica para obtener el peso seco final

de la muestra (**P3**). Esto se realizó por duplicado en cada muestra y se promediaron los resultados.

Los cálculos de sólidos se realizaron de la siguiente forma:

- Peso seco= P2-P1
- Sólidos volátiles= P2-P3
- Cenizas= P3-P1

4.1.3. Determinación de monosacáridos

Este análisis fue realizado en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología, UNAM. Se secó y molió el sargazo a un tamaño de partícula de 8 mm, para después agregar 300 mg de peso seco a una solución de 20 mL H_2SO_4 al 72%. Se hidrolizó por 1 hora a 30°C, posteriormente, se colocó la biomasa en una solución de 20 mL de H_2SO_4 al 4% por 1 hora a 121°C en la autoclave. Se neutralizó una muestra de 1.5 mL con NaOH 10N, para cuantificar los monosacáridos totales resultantes por HPLC (Waters, Miliford, MA) equipado con una columna Aminex HPX-87H y con fase móvil de H_2SO_4 5 mM a un flujo de 0.5 mL/minutos a 50°C. Detectados con un detector de índice de refracción diferencial.

4.1.4. Hidrólisis ácidas de sargazo

Este análisis fue realizado en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las hidrólisis ácidas del sargazo se realizaron con H_2SO_4 , probando las cargas de 10% y 5% peso H_2SO_4 / peso sargazo. Las condiciones de hidrólisis fueron de 30 min a 130°C, en autoclave. Se neutralizó 1 mL del hidrolizado con NaOH 10N, para poder analizarlas y cuantificarlas por HPLC.

4.1.5. Análisis Infrarrojo-ATR

Las muestras se analizaron utilizando un equipo FT-IR de la Marca Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700, serie APW1200392. Los espectros se obtuvieron entre longitudes de onda de 4000 y 600 cm^{-1} en un modo de atenuación de la reflectancia total (ATR). Se realizó un total de 16 barridos que se promediaron y, posteriormente, los espectros de infrarrojo se procesaron utilizando el Software OMNIC.

4.2. Obtención y aislamiento de un consorcio microbiano que degrade

Se realizó un muestreo de sustrato lignocelulósico en descomposición en el Parque Nacional Cumbres del Ajusco y se mezcló con sargazo fresco enjuagado con agua de la llave, con humedad de 88% Base Húmeda (BH) del sargazo. Una muestra se mantuvo en la intemperie bajo la sombra, cubierta por una malla, y otra se mantuvo en incubadora a 30°C, ambas se rociaron cada 3 días con agua, para mantener humedad.

Al obtener un crecimiento microbiano, donde se observaron micelios blancos algodonosos sobre el sargazo, se removió el sustrato lignocelulósico y se colocó el sargazo con crecimiento microbiano junto con sargazo fresco. Se mantuvo en la incubadora a 30°C y se roció con agua cada 3 días. Se agregó sargazo fresco cada 2 semanas, hasta obtener un consorcio adaptado al sargazo. Se siguió adaptando el consorcio en el sargazo como único sustrato. Después de 3 meses se obtuvo un consorcio capaz de crecer en sargazo a la semana de su inoculación.

El aislamiento de microorganismos con capacidad de utilizar el sargazo como sustrato se realizó como se describe a continuación.

Medio de cultivo papa dextrosa- Se prepararon medios selectivos para hongos: 100 mL de H_2O destilada, 3.9 g de papa dextrosa y 1.5 g de agar. Se inoculó el medio tomando asadas de sargazo pretratado, donde se observó el crecimiento de microorganismos.

Medio sargazo- Se prepararon medios con sargazo como única fuente de carbono: 100 mL de H_2O destilada, 5 g de sargazo seco molido y 1.5 g de agar. Se inoculó el medio, a partir de los microorganismos obtenidos en las cajas Petri con medio papa dextrosa y tomando asadas de sitios donde observó mayor crecimiento de microorganismos en el sargazo con crecimiento microbiano.

Medio celulosa + alginato- Se prepararon medios con los componentes de la pared celular del sargazo que interesa hidrolizar (celulosa y alginato) como fuente de carbono: 100 mL de H_2O destilada, 2.5 g de celulosa, 2.5 g de alginato y 1.5 g de agar. Se inoculó el medio con los microorganismos obtenidos en las cajas Petri con medio de cultivo con sargazo como única fuente de carbono.

Las cajas Petri se incubaron a 30°C por 2 días; al observar crecimiento de microorganismos se determinó por el fenotipo si se tenían cultivos aislados o con consorcios microbianos. Cuando se detectó más de un microorganismo por caja, se re-inoculó cada uno en nuevas cajas, hasta obtener un solo fenotipo visible en cada caja. Se realizaron preparaciones de cada microorganismo en portaobjetos y se observaron al microscopio, comprobando que se trataba de un solo microorganismo en cada caja.

4.3. Pretratamientos de sargazo

El pretratamiento con el consorcio microbiano previamente aislado se realizó agregando 50 g de sargazo fresco con 20 g de sargazo con crecimiento microbiano. Diez días después, el sargazo estaba completamente cubierto de micelios de color gris. Se molió y se realizó una prueba de PBM con la biomasa pretratada.

Con el objetivo de determinar diferencias en las estructuras moleculares del sargazo antes y después del pretratamiento, se realizó lectura de FT-IR-ATR con las especificaciones ya mencionadas.

Se realizaron dos pretratamientos enzimáticos, con enzima alginato liasa y con celulasa. Previamente a su aplicación al sargazo, se realizaron pruebas para determinar la capacidad de hidrólisis de estas enzimas, mediante la cuantificación de la producción de azúcares reductores.

Para la degradación de alginato se utilizó una enzima alginato liasa (Weifang Yuexiang Chemical Co.) a pH 7, variando la concentración (0.2, 0.6 y 1% enzima respecto al peso de sustrato) y la temperatura (35, 40 y 45°C). Se realizaron cinéticas enzimáticas por triplicado con una agitación de 350 rpm, tomando muestra de 3 mL a los 10, 20, 30, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 150, 180 y 250 minutos. Se realizó la técnica de DNS (Miller) para determinar de forma cualitativa la producción de glucosa.

Para la degradación de celulosa se utilizó una enzima celulasa (CellicCTec 2, Sigma-Aldrich) a pH 5, con concentración de 150 FPU/g sustrato, variando la temperatura (45, 50°C). Se realizaron cinéticas enzimáticas con 100 mL de agua buffer de citratos, 2 g de celulosa y 200 µL de CellicCTec2 por triplicado con una agitación de 350 rpm, tomando muestra de 3 mL a los 10, 20, 30, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 150, 180, 250 min. Se realizó la técnica de DNS (Miller) para determinar de forma cualitativa la producción de los ácidos producto de la hidrólisis del alginato.

Pretratamientos en sargazo: se secó 1 kg de sargazo a 37°C por 2 semanas y, posteriormente, se esterilizó. Se sometió la biomasa a las enzimas en condiciones que presentaron mejor funcionamiento: alginato liasa pH 7, 0.4% de sólidos totales, 45°C (100 mL agua destilada, 2 g sargazo y 0.024 g alginato liasa); CellicCTec2 a pH 5, 150 FPU/g sustrato, 45°C (100 mL de agua buffer de citratos, 2 g de sargazo y 200 µL de CellicCTec2). Los pretratamientos se realizaron por triplicado, de las enzimas por separado y juntas. Se realizaron las cinéticas enzimáticas en una incubadora orbital SEV-PRENO INO 650 V14 con agitación de 350 rpm, tomando 3 mL de muestra a los 10, 20, 30, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 150, 180 y 250 minutos. Se realizó la técnica de DNS (Miller) para determinar de forma cualitativa la formación de los productos de la degradación de celulosa y alginato.

La técnica de DNS (Miller, 1959) se realizó preparando 1 L de la solución DNS de la siguiente manera:

- Se preparó la solución 1, consistente en 300 g de tartrato sodio y potasio en 500 mL de H₂O destilada.
- La solución 2 se preparó con 10 g de ácido 3,5-dinitrosalísílico (DNS) en

200 mL de hidróxido de sodio 2 mol/L.

- Para preparar la solución DNS se mezclaron la solución 1 y 2 y se afora a 1 L. Se vertió en agua hirviendo por 5 minutos, posteriormente se agregaron 5 g de sulfato y 20 g de fenol cristalino.

Durante la cinética se tomaron 3 mL de muestra en los tiempos establecidos y al terminar la cinética; a cada muestra se le agregó 1 mL de solución DNS. Todas las muestras mezcladas con DNS se colocaron a baño maría al mismo tiempo por 10 minutos y, posteriormente, se dejaron enfriar. Después se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro HACH 5000.

4.4. Pruebas de Potencial Bioquímico de Metano

Se utilizó un equipo AMPTS II (Bioprocess Control®), manteniendo la temperatura de 37 °C y 60 rpm de agitación. Se agregó el inóculo, sustrato y cosustrato (de ser el caso) en las botellas y, posteriormente, fueron aforadas a un volumen de 450 mL con medio mineral. El espacio de cabeza se cambió por gas nitrógeno mediante burbujeo durante 3 min antes de ser selladas. Se colocaron trampas de CO₂, con NaOH 3M para cuantificar solamente el CH₄ producido. Cuando se utilizó sargazo (fresco, almacenado o pretratado) como sustrato, se molió en licuadora a tamaño de partícula 3-5 milímetros, agregando 50 mL de agua a cada 500 g de sargazo, determinando los sólidos del sargazo molido, para agregar la cantidad correcta de SV en cada prueba. Se utilizó lodo metanogénico de industria cervecera como inóculo y estiércol bovino como cosustrato e inóculo hidrolítico en algunos tratamientos. El estiércol bovino se colectó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, San Miguel Topilejo.

4.4.1. Condiciones experimentales aplicadas en las pruebas PBM de Componentes recalcitrantes

Se determinó el PBM del alginato de sodio comercial (Droguería Cosmopolita), alginato de sodio grado reactivo (Sigma-Aldrich) y la Celulosa grado reactivo (J.T. Baker), para conocer su biodegradabilidad y así tener un parámetro de referencia sobre lo que se espera con su presencia en el sargazo. Se comenzó con una relación de sustrato:inóculo (S:I) de 4:1. En algunos tratamientos se probó la capacidad hidrolítica de estiércol bovino, comenzando con una relación de estiércol-sustrato de 0.25 (S:E=5:1) (Tabla 4.1). Se midió la producción de metano hasta llegar a fase estacionaria. Todos los ensayos se realizan por duplicado y algunos por triplicado

Tabla 4.1. Contenido de los tratamientos del experimento de PBM de componentes recalcitrantes

Frasco	Sustrato	g SV	Inóculo	g SV	Co-sustrato	g SV
1,2	Celulosa	20	Lodo granular	5	-	0
3,4	Celulosa	20	-	0	Estiércol bovino	5
5,6	Celulosa	20	Lodo granular	5	Estiércol bovino	5
7,8	Alginato comercial	10	Lodo granular	2.5	-	0
9,10	Alginato comercial	10	-	0	Estiércol bovino	2.5
11,12	Alginato comercial	10	Lodo granular	2.5	Estiércol bovino	2.5
1,2,3	Alginato puro	10	Lodo granular	2.5	-	0
4,5,6	Alginato puro	10	-	0	Estiércol bovino	2.5
7,8,9	Alginato puro	10	Lodo granular	2.5	Estiércol bovino	2.5
10,11	-	0	Lodo granular	2.5	-	0
12,13	-	0	-	0	Estiércol bovino	2.5
14,15	-	0	Lodo granular	2.5	Estiércol bovino	2.5

4.4.2. Condiciones experimentales aplicadas en las pruebas PBM de Sargazo fresco, sargazo almacenado, sargazo sometido a pretratamiento microbiano y a codigestión con estiércol bovino

Se determinó el PBM del sargazo sometido a pretratamiento y sin pretratamiento. Se comenzó con una relación de sustrato:inóculo (S:I) de 2.86:1. En algunos tratamientos se probó la capacidad hidrolítica de estiércol bovino, comenzando con una relación de estiércol-sustrato de 0.25 (S:E=5:1) (Tabla 4.2). Se midió la producción de metano hasta llegar a fase estacionaria. Todos los ensayos se realizan por duplicado o triplicado.

Tabla 4.2. Contenido de los tratamientos del experimento de PBM con sargazo fresco, almacenado y sometido a pretratamiento microbiano

Frasco	Sustrato	g SV	Inóculo	g SV	Co-sustrato	g SV
1,2	Sargazo fresco	8.58	Lodo granular	3	-	0
3,4	Sargazo fresco	8.58	Lodo granular	3	Estiércol bovino	1.72
5,6	Sargazo pretratado	8.58	Lodo granular	3	-	0
7,8	Sargazo pretratado	8.58	Lodo granular	3	Estiércol bovino	1.72
1,2,3	Sargazo almacenado	8.58	Lodo granular	3	-	0
4,5,6	Sargazo almacenado	8.58	-	0	Estiércol bovino	1.72
7,8,9	Sargazo almacenado	8.58	Lodo granular	3	Estiércol bovino	1.72
11,12	-	0	Lodo granular	3	-	0
13,14	-	0	-	-	Estiércol bovino	1.72

4.4.3. Condiciones experimentales aplicadas en las pruebas PBM de Sargazo sometido a pretratamiento enzimático

Se determinó el PBM del sargazo sometido a pretratamiento con enzima CellicCTec 2, enzima alginato liasa, ambas enzimas y sin pretratamiento. Se comenzó con una relación de sustrato:inóculo (S:I) de 2.86:1 (Tabla 4.3). Se midió la producción de metano hasta llegar a fase estacionaria. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para agregar el sustrato, cosustrato e inóculo en las proporciones determinadas se determinó el porcentaje de humedad, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y cenizas en cada uno. Se comenzó pesando el volumen de muestra en un crisol y colocándolo en la estufa por 12 horas a 105°C. Se pesó nuevamente para determinar el nivel de humedad y ST, después se colocó en la mufla a 550°C por 1 hora. Se volvió a pesar para determinar la cantidad de SV y cenizas.

Tabla 4.3. Contenido de los tratamientos del experimento PBM de sargazo estéril sometido a pretratamientos enzimáticos

Frasco	Sustrato	g SV	Inóculo	g SV
1,2,3	Sargazo estéril pretratado Cellic	4.3	Lodo granular	1.5
4,5,6	Sargazo estéril pretratado alginato liasa	4.3	Lodo granular	1.5
7,8,9	Sargazo estéril pretratado Cellic y alginato liasa	4.3	Lodo granular	1.5
10,11,12	Sargazo estéril	4.3	Lodo granular	1.5
13,14,15	-	0	Lodo granular	1.5

4.4.4. Determinación de parámetros físico-químicos

Al terminar cada prueba de potencial bioquímico de metano se realizaron análisis de demanda química de oxígeno (DQO), pH, ácidos grasos volátiles (AGVs), alcalinidad y relación alfa mediante los siguientes protocolos tomados y en algunos casos modificados del "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 21st edition., New York, 2005":

pH: Para medir el pH se calibra previamente el potenciómetro HANNA HI 2210 con las soluciones de calibración a pH 4 y 7.

Alcalinidad y relación alfa: Se realizó una titulación en 20 mL de muestra, agregando H_2SO_4 0.2 N con una bureta a un volumen de muestra de 20 mL, hasta que llegar a un pH de 5.75, se anotó el volumen que se ocupó para alcanzar el pH. Posteriormente, se sigue agregando H_2SO_4 0.2 N, hasta que la muestra tenga un pH de 4.3 y se vuelve a anotar el volumen utilizado. La alcalinidad y la relación alfa (α) se determinan por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Alcalinidad} = \frac{((50000) \times (N) \times (\text{Vol}))}{(\text{mL de muestra})}$$

$$\alpha = \frac{(\text{alcalinidad a pH 5.75})}{(\text{alcalinidad a pH 4.3})}$$

DQO soluble: Para determinar la demanda química de oxígeno (DQO) soluble, se utilizó el sobrenadante de la muestra por lo que se comenzó filtrándola con filtro GF/A. Posteriormente, en un tubo de 10 mL se colocó 2.5 mL de muestra, 3.5 mL de solución digestora y 1.5 mL de solución catalítica. Se mezcló y se colocó en un digestor HACHDRB2000 a 150°C por 2 horas. Se dejaron enfriar las muestras y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro HACH 5000.

AGVs: Para la medición de AGVs se preparó cada muestra de 1.5 mL en un tubo Eppendorf como sigue: Se agregó una gota de solución de ácido clorhídrico 1:1 y se centrifugó a 3,500 rpm en microcentrífuga, para posteriormente filtrar el sobrenadante con filtro de nitrocelulosa de 0.22 μm . Se utilizó un cromatógrafo SRI 8610, con nitrógeno como fase móvil con una temperatura de columna de 110°C. Se inyectó cada muestra y se obtuvo la concentración (ppm) de AGVs en el software Clarity 7.1. Cada muestra se inyectó 3 veces y se reportó la concentración promedio.

4.4.5. Modelos con ecuación de Gompertz modificada

Con las curvas de rendimiento de metano de cada PBM se determinó la producción máxima de metano $CH_4 \text{ max}$ (PBM en mL CH_4/g SV) y el tiempo en alcanzarla, aplicando con el criterio de Holliger *et al.*, 2021 (cuando la producción de metano no tiene un incremento mayor al 1% por tres días se considera que llega a fase estacionaria y que se alcanzó el máximo de producción). También se ajustaron las curvas utilizando el software STATISTICA 10 con la ecuación de Gompertz modificada:

$$CH_4(t) = CH_4 \text{ max} \exp \left(-\exp \left(\frac{R}{CH_4 \text{ max}} (l-1) + 1 \right) \right)$$

Donde se obtienen dos parámetros: la tasa de producción máxima R en mL/días y fase lag l en días, que es el tiempo que tarda en comenzar a producirse metano en el tratamiento.

4.4.6. Modelos con ecuación tipo Michaelis-Menten

En las curvas en las cuales la ecuación de Gompertz modificada arrojó fases lag negativas, lo que demuestra que la producción de metano comenzó de forma inmediata, se optó por ajustar la ecuación tipo Michaelis-Menten por acoplarse mejor a las curvas de dichos tratamientos. Las curvas se ajustaron en el software STATISTICA 10 con la ecuación tipo Michaelis-Menten:

$$CH_4(t) = \frac{CH_4 \text{ max} * t}{T_p + t}$$

Donde se obtiene el parámetro T_p en días, es decir, el tiempo que tarda en llegar a la mitad el rendimiento de metano máximo en el tratamiento. La curva de cada modelo se utilizó para calcular la tasa de producción máxima (mL/días), siguiendo el criterio de determinar la pendiente del tiempo 0 al tiempo que tarda en alcanzar el 25% del rendimiento de metano del tratamiento, siendo ésta la pendiente máxima.

4.4.7. Análisis estadísticos

Se realizaron análisis estadísticos para comparar los resultados de los tratamientos y parámetros obtenidos, mediante pruebas de Tukey de las medias en el software JMP 16.

Capítulo

5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL SARGAZO

5.1.1. Análisis termogravimétrico

Para caracterizar nuestra muestra de *S. natans* y *S. fluitans* se realizó análisis térmico (TGA, por sus siglas en inglés) (**fig. 5.1**). Se pueden observar 4 pendientes (caídas) en la curva, que representan pérdida de peso por la pirólisis de componentes dentro del sargazo. La primera pérdida de peso de los 80°C a los 135°C corresponde al 8% de la biomasa (A). Posteriormente, se presenta un decremento rápido de peso desde los 230°C hasta los 296°C, que corresponde al 17% (B). En seguida, se presenta una pérdida de peso menos pronunciada, entre los 296°C y los 350°C, que representa el 13% del peso de la muestra (C). Así mismo, entre los 350 a 650°C se obtuvo una pérdida del 16% del peso de la biomasa. Por último, hay otro decremento rápido del porcentaje de peso desde los 680°C hasta los 760°C, representando el 10% del peso de la muestra (D).

En el trabajo de Davies y colaboradores, se realiza el análisis TGA de *S. natans* y *S. fluitans* y se calculan los porcentajes de algunos componentes de la biomasa (**fig. 5.2**). La primera pérdida de peso es el resultado de la evaporación del agua, comenzando a los 80°C y habiéndose evaporado por completo a los 135°C (A). Así mismo, la cuantificación de la materia orgánica la realizan calculando la pérdida de peso de los 200 a los 400°C (B y C) y el porcentaje de carbonato de calcio lo calculan de 617 a 720°C (D) (Davis *et al.*, 2020). Con esta información es posible comparar con los valores aquí obtenidos, identificando resultados similares (**Tabla 5.1**).

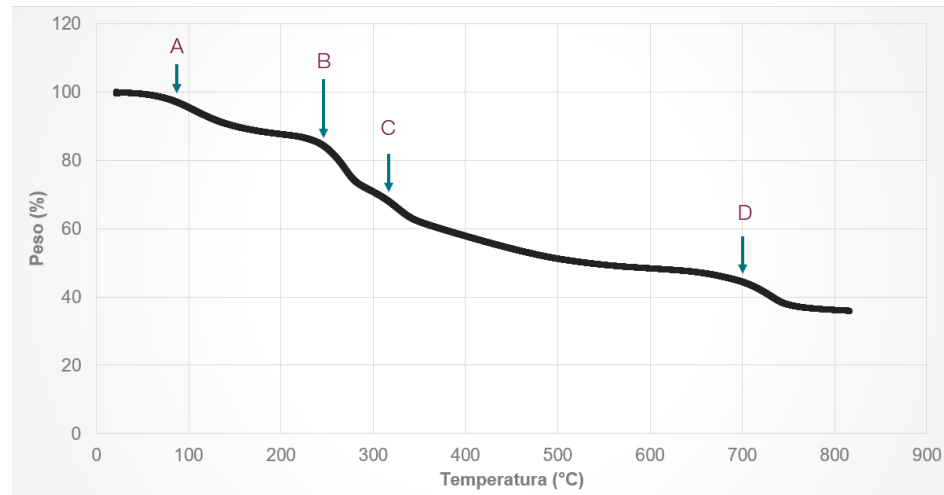


Figura 5.1. Análisis térmico (TGA) de nuestra muestra de sargazo. Pérdida de peso de la biomasa al incrementar la temperatura 10°C/minuto, desde temperatura ambiente hasta 800°C.

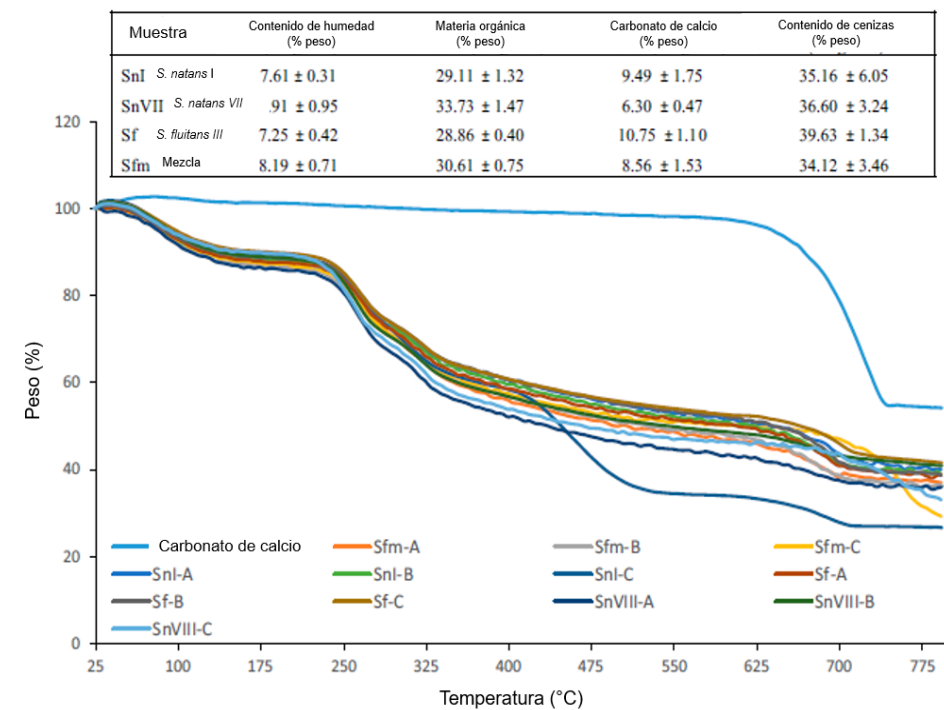


Figura 5.2. Análisis TGA de diferentes morfotipos del *S. natans* y *S. fluitans* y porcentaje de humedad, materia orgánica, carbonato de calcio y cenizas (Tomado de Davis *et al.*, 2021)

Tabla 5.1. Componentes del sargazo seco empleado en este estudio. Las letras A, B, C y D corresponden a las presentadas en la figura 5.1.

Humedad (%)	Materia orgánica (%)	Carbonato de calcio (%)	Cenizas (%)	Referencia
A=8	B+C=30 B=17 C=13	D=10	36	Este trabajo
8	31	9	34	Promedio: Davis <i>et al.</i> , 2021

En el estudio de las características del TGA de *Sargassum* spp. Kim y colaboradores (2013) discuten que, por debajo de los 180°C, la pérdida de peso corresponde a la evaporación de agua. También mencionan que la pérdida observada entre 200 y 270°C corresponde a la descomposición de carbohidratos y de 270 a 350°C se atribuye a la descomposición de proteínas, por lo que la pérdida de peso registrada en la muestra de sargazo a esos rangos de temperatura (230-296°C y 296-350°C) puede deberse a la descomposición de esos compuestos.

Sin embargo, un estudio del comportamiento de la pirólisis de los carbohidratos principales de las algas pardas demuestra que la pérdida de peso de carbohidratos no está restringida a los 200-270°C (Anastasakis *et al.*, 2011). En dicho trabajo determinan que la descomposición del alginato y el fucoidan sucede entre los 200 y 300°C, mientras que la descomposición térmica de la laminarina y del manitol se da entre los 300 y 400°C. Entonces, en la muestra del presente trabajo, la pérdida de peso en los rangos 230-296°C se asocia al alginato y fucoidan (B), mientras que entre 296-350°C correspondería a la laminarina y manitol (C).

Por otro lado, los componentes de la lignocelulosa se descomponen a distintas temperaturas. En sus formas puras, la celulosa tiene la mayor pérdida de peso a 369°C, la hemicelulosa a 309°C y la lignina a 380°C (Nowakowski *et al.*, 2008). Sin embargo, estos compuestos se comportan diferente dentro de la biomasa. Al realizar la pirólisis de 5 tipos de biomasa lignocelulósica, se encontró que la descomposición de la hemicelulosa y la celulosa amorfa tiene la mayor pérdida de peso entre los 321 y 350°C, por lo que la pendiente encontrada en la muestra de sargazo que va de los 296 a los 350°C también correspondería, junto con la laminarina y el manitol, a dichos componentes de la lignocelulosa (C) (Chen *et al.*, 2015). Así mismo, la celulosa cristalina y la lignina requieren de temperaturas mayores a 350°C para descomponerse, por lo que la pérdida de peso entre los 350 y 650°C corresponde a dichos componentes (Manals-Cutiño *et al.*, 2011).

Con base en la información anterior, en las muestras de *S. natans* y *S. fluitans* aquí analizadas, el 8% del peso de la biomasa corresponde al agua, el 17% de la misma estaría conformada por alginato y fucoidan, 13% por

proteínas, manitol, celulosa amorfa y hemicelulosa, 16 % celulosa cristalina y lignina, 10% carbonato de calcio y 36% de cenizas. El contenido de cenizas de la biomasa de sargazo analizada es muy alto, si se compara con otros sustratos, lo que es confirmado por otros estudios sobre este tipo de biomasa (**tabla 2.2**). Por ejemplo, sustratos lignocelulósicos, como el aserrín de pino, el tallo de helecho, bagazo de caña y palo de yute, tienen porcentaje de cenizas que van de 15 a 25% (Ariunbaatar *et al.*, 2014).

5.1.2. Sólidos totales, volátiles y fijos del sargazo

Al realizar la prueba de sólidos totales del sargazo, se obtuvo, de la base seca del sargazo, que el 66% de la biomasa son Sólidos Volátiles (SV), correspondiendo al peso que se pierde al colocar a la biomasa en la mufla y el 34% representa las cenizas (**tabla 5.2**), que es el peso que queda de la muestra al final. Esto se asemeja a lo obtenido en el análisis TGA (**tabla 5.1**). Se ha reportado que las cenizas en *S. natans* y *S. fluitans* corresponden a sales y metales pesados. De las sales contenidas en estas especies de sargazo se han encontrado, de mayor a menor concentración: NaCl, CaCO₃, MgO, CaSO₄, KCl, Na₂SO₄ y K₃Na(SO₄)₂. Así mismo, se han encontrado una amplia variedad de metales pesados, y los que se encuentran con mayor concentración son (de mayor a menor): calcio, magnesio, potasio, hierro, fósforo, arsénico, zinc y aluminio, siendo el arsénico el más preocupante por su alta toxicidad a bajas concentraciones (concentraciones presentadas en la **tabla 2.4**) (Milledge *et al.*, 2020), esto no corresponde a nuestra muestra de sargazo pero nos da una idea de lo que podrían contener las cenizas de la muestra con la que trabajamos

Tabla 5.2. Composición química de los sólidos del *S. natans* y *S. fluitans* muestreada en Puerto Morelos, México en agosto 2021. BH= base húmeda, BS= base seca, ST=sólidos totales, SV= sólidos volátiles, SF= sólidos finales

% Humedad BH	% Volátil BS	% Cenizas BS	ST (g/g BH)	SV (g/g BH)	SF (g/g BH)	SV/ST
88	66	34	12%	8%	4%	0.66

El porcentaje de cenizas concuerda con lo obtenido por Tapia-Tussel, Milledge, Thompson y Ayala-Mercado, aunque es más alto que el porcentaje obtenido por Morrison y Gray, López-Aguilar y Chikani-Cabrera (**tabla 2.4**).

Por otro lado, en este trabajo se obtiene una relación SV/ST de 0.66, lo que se acerca al valor determinado por Milledge, pero es más alto que en el caso de Thompson y Ayala-Mercado y más bajo que lo obtenido por Chikani-Cabrera, lo cual demuestra nuevamente la variabilidad en la biomasa (**Tabla 2.4**). Mientras más cercano a 1 es la relación SV/ST la producción de metano se ve favorecida, siendo baja esta relación en la muestra de sargazo estudiada, pero consistente con lo anteriormente reportado en estas especies de sargazo (Orhorho *et al.*, 2017).

5.1.3. Cuantificación de monosacáridos

Se determinó el contenido de monosacáridos en nuestra muestra de sargazo seca y estéril, realizando hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado, para la liberación de monosacáridos totales. Así mismo, se realizaron hidrólisis con ácido diluido, para probar el efecto de un pretratamiento ácido en la liberación de monosacáridos en la muestra de sargazo, probando la hidrólisis con ácido diluido a cargas de 5% y 10% peso H₂SO₄/peso de sargazo (**Tabla 5.3**).

Tabla 5.3. Contenido de monosacáridos al realizar la liberación de monosacáridos totales y la hidrólisis con ácido diluido con cargas de 5 y 10% peso/peso.

Tratamiento	% Con base a biomasa total
Totales	18%
Hidrólisis carga 10% p H ₂ SO ₄ /p Sargazo	13.2%
Hidrólisis carga 5% p H ₂ SO ₄ /p Sargazo	10.5%

En el trabajo de Davies y colaboradores se reporta que al realizar la hidrólisis con ácido trifluoroacético en diferentes morfotipos de *S. natans* y *S. fluitans* analizados, el contenido de monosacáridos corresponde a un porcentaje de entre 14.3 y 18.4% de la biomasa, siendo consistente con lo obtenido en este estudio. En dicho trabajo se obtuvo que los monosacáridos con mayor concentración son los liberados del alginato (ácido manurónico y ácido gulurónico) y representan del 65 al 68% del total de los monosacáridos. El contenido de otros monosacáridos fue el siguiente (de mayor a menor): fucosa (15-17 µg/mg de sargazo), galactosa (10-12 µg/mg), ácido glucurónico (7-9 µg/mg), xilosa (5 µg/mg), glucosa (4-5 µg/mg), manosa (3-5 µg/mg), manitol (2-7 µg/mg, ramnosa (1 µg/mg) y arabinosa (1 µg/mg) (Davis *et al.*, 2020). Estos monosacáridos forman a los polisacáridos estructurales y energéticos del sargazo: Fucoidan (fucosa, glucosa, galactosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico, manosa, xilosa, ramnosa), celulosa (glucosa, ácido glucurónico), hemicelulosa (glucosa, galactosa, fructosa, xilosa, arabinosa) y laminarina (glucosa, manitol) (Docrincic *et al.*, 2020)

Por otro lado, las hidrólisis con carga del 5% y de 10% liberaron un importante porcentaje de monosacáridos, pero no se obtiene el total de los mismos. Esto es debido a que los pretratamientos ácidos no se realizan con porcentajes altos de ácido, para evitar, en medida de lo posible, degradar los monosacáridos hidrolizados. Se probó que los pretratamientos ácidos son una forma eficaz de liberar monosacáridos de la biomasa de sargazo. Sin embargo, el aplicar pretratamientos ácidos previos a la DA, no es adecuado ya que la hidrólisis ácida produce intermediarios tóxicos como el furfural y el hidroximetilfurfural, inhiben enzimas del metabolismo central del carbono de los microorganismos, por lo que los microorganismos de la DA

son afectados y los rendimientos de metano disminuyen (Akobi *et al.*, 2016). Por otro lado, los ácidos son caros y las soluciones neutralizadoras también suman al costo del pretratamiento (Ariunbaatar *et al.*, 2014).

Milledge y colaboradores obtuvieron que la mezcla de sargazos tiene 12% de carbohidratos y, al separar por morfotipos, encontraron que *S. natans VIII* contiene 22% de carbohidratos, *S. natans I* 19% y *S. fluitans III* 27%. La muestra del presente estudio contiene una cantidad de carbohidratos (18%) que está dentro del rango de sus resultados (Milledge *et al.*, 2020).

5.1.4. Análisis infrarrojo-ATR iniciales del sargazo

Se realizaron análisis de infrarrojo-ATR para ampliar el conocimiento de los cambios por pretratamiento biológico a la biomasa. Los beneficios de la técnica consisten en que el grosor de la muestra no afecta el análisis, no es una prueba destructiva y no necesita un procesamiento de la muestra. Además, los espectros generados son bien definidos y permite distinguir características de las muestras. Al trabajar con muestras simples, con compuestos puros, el espectro que va desde los 1500 hasta los 4000 cm^{-1} corresponde a los grupos funcionales de la muestra y antes de los 1500 cm^{-1} se encuentra la “huella digital” del compuesto (Sun, 2009). Al trabajar con muestras complejas (como el sargazo), no es posible hacer dicha separación, pero es posible observar diferencias entre las muestras y, por medio de un análisis estadístico multivariado, encontrar cambios en los grupos funcionales (Sun, 2009).

Se comenzó con la búsqueda de las condiciones óptimas para la obtención de espectros infrarrojo de la superficie del sargazo. En la **fig. 5.3** puede observarse la comparación del espectro de absorción del sargazo fresco (húmedo), sometido a un secado a 102°C y otro a 37°C. El sargazo fresco tiene interferencia en el espectro antes de la longitud de onda de 1000 cm^{-1} y picos poco definidos, por lo que al analizar la superficie del sargazo de esa forma se pierde información. Por otro lado, al secar el sargazo a 102°C, aparentemente se pierden las propiedades de la biomasa, cambiando el espectro por completo. Se concluye que el mejor tratamiento para este análisis es el secado del sargazo a 37°C, ya que en este no se presentan interferencias, pérdida de información, ni pérdida de las propiedades de la biomasa.

La superficie del sargazo tiene dos morfologías aparentemente diferentes, una translúcida y amarilla y otra café y opaca, la cual se presenta de un solo lado de las hojas y pegada al tallo. Se obtuvieron los espectros de esas dos partes del sargazo, para analizar si realmente hay un cambio en su estructura; se encontró que sus espectros de absorción presentan diferencias (**fig. 5.4A**). Así mismo, se molió el sargazo, para conocer si el

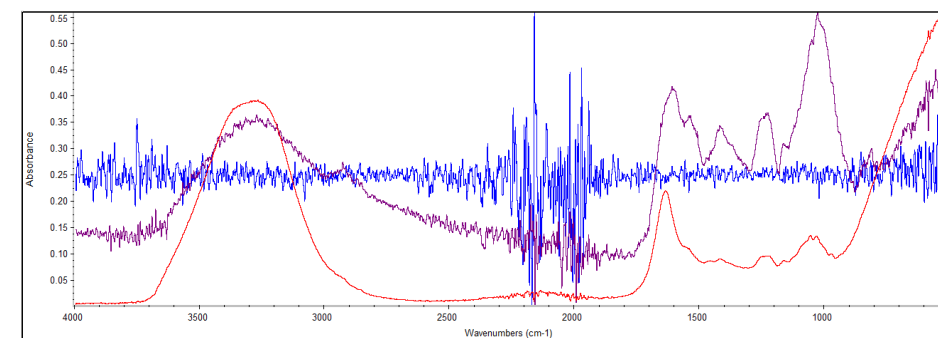


Figura 5.3. Espectros de absorción de sargazo obtenidos en IR-ATR. Rojo: sargazo fresco, azul: sargazo secado a 102°C y morado: sargazo secado a 37°C.

espectro del sargazo molido sería representativo de la parte amarilla y la parte café del sargazo. Se encontró que el espectro del sargazo molido es más parecido a la sección amarilla del sargazo, sugiriendo que la biomasa cuenta con mayor proporción de ese tipo.

En el programa OMNIC se observaron los espectros obtenidos de las morfologías diferentes ya descritas y fue posible hacer la suma de los dos espectros para ver cómo se vería la combinación de estos. Se encontró que el sargazo molido y la suma de las partes tienen un espectro de absorción similar (**fig. 5.4B**). Esto indica que, si se utiliza la biomasa molido, los espectros serán representativos de las partes del sargazo que presentaron espectros de absorción diferentes.

5.2. DIGESTIÓN ANAEROBIA

5.2.1. Prueba de PBM del alginato y la celulosa

Se realizó la prueba de PBM de celulosa (JT Baker) y alginato de sodio, usando lodo anaerobio como inóculo metanogénico y estiércol bovino como cosustrato (inóculo hidrolítico). Se utilizó alginato de sodio grado comercial (Farmacia Cosmopolita) y alginato de sodio grado reactivo (Sigma-Aldrich) para comparar los rendimientos. La evolución del rendimiento de metano se presenta en la **figura 5.5**.

Para cada tratamiento se determinó el PBM, es decir, la producción máxima de metano ($\text{mL CH}_4/\text{g SV}$), utilizando el criterio de Holliger y el tiempo que tardó en llegar a dicha producción (días). Por otro lado, se modelaron las curvas por medio de la ecuación de Gompertz modificada, para obtener parámetros de tasa de producción máxima, fase *lag* y la R^2 obtenido al ajustar cada curva, para poder analizar la eficiencia de producción de metano resultante de cada tratamiento. Así mismo, se obtuvieron parámetros de pH, alcalinidad, demanda química de oxígeno (DQO) y ácidos grasos volátiles

(AGVs) al final de la prueba de PBM (Tabla 5.4).

También se realizaron pruebas de Tukey, para determinar si existen diferencias significativas ente el rendimiento de metano y la tasa de producción obtenidos en cada tratamiento de las PBM de celulosa y alginato (fig. 5.6).

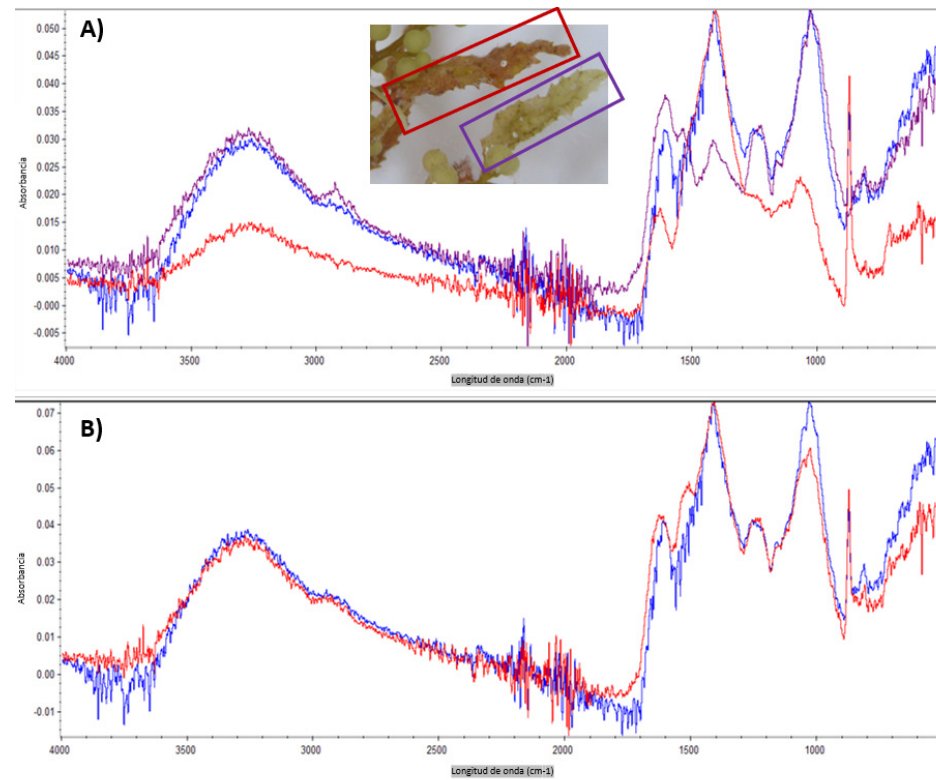


Figura 5.4. Espectros de absorción de las dos partes del sargazo y sargazo molido. A) Rojo: parte café, morado: parte amarilla, azul: sargazo molido. B) Azul: sargazo molido, rojo: suma de las dos partes del sargazo. Todos los espectros se obtuvieron del sargazo seco a 37°C.

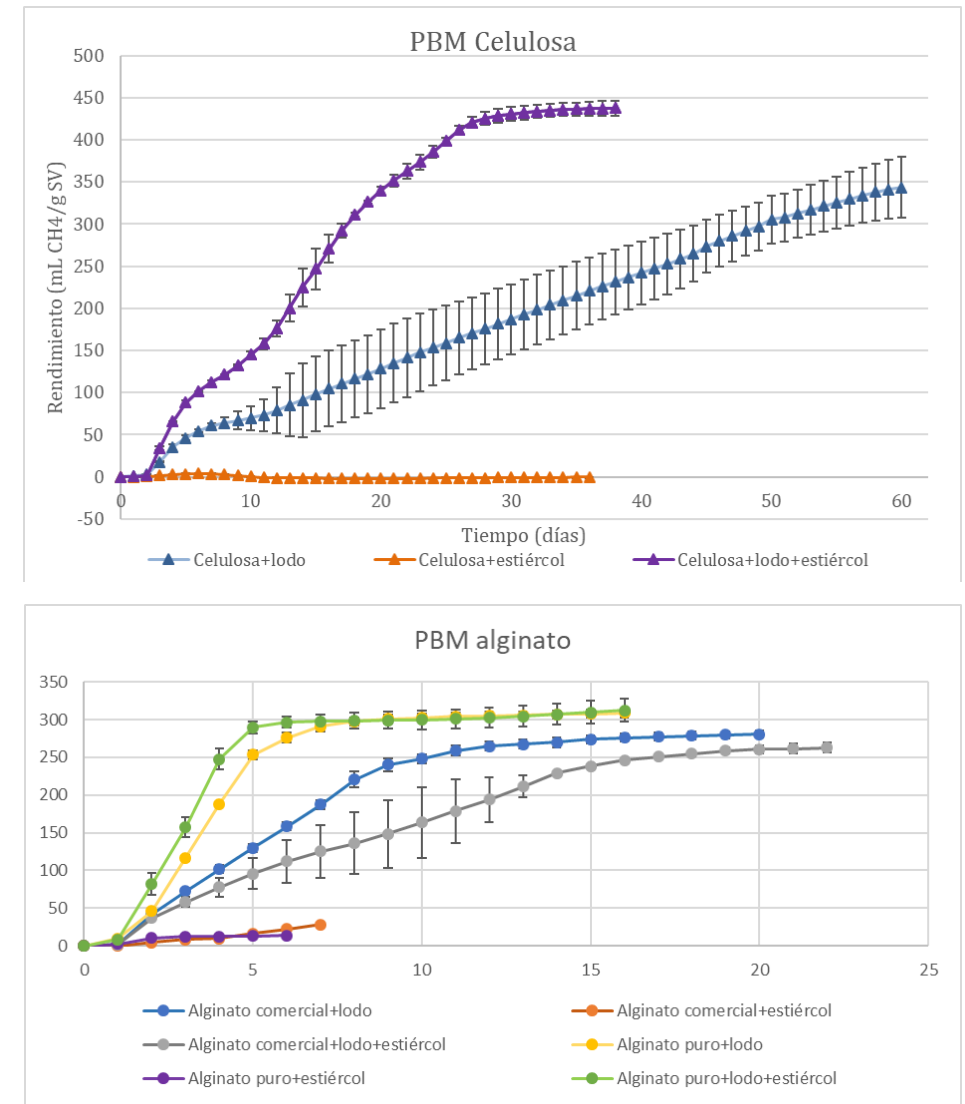


Figura 5.5. Curvas de rendimientos (mL CH₄/g SV) obtenidos en la prueba de PBM de alginato y celulosa. A) Azul: celulosa + lodo, naranja: celulosa + estiércol, morado: celulosa + lodo + estiércol. B) Azul: alginato comercial + lodo, naranja: alginato comercial + estiércol, gris: alginato comercial + estiércol + lodo, amarillo: alginato puro + lodo, morado: alginato puro+ estiércol, verde: alginato puro + lodo+ estiércol. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado o triplicado con una relación de sustrato:inóculo (S:I) de 4:1 y cosustrato-sustrato de (1:4).

Tabla 5.4. Análisis de PBM de celulosa, alginato de sodio comercial y alginato de sodio grado reactivo: PBM, tiempo en llegar al máximo y parámetros obtenidos por modelo de Gompertz: tasa de producción máxima, fase lag y R². Parámetros obtenidos al finalizar la prueba de PBM: pH, alcalinidad, relación alfa, DQO soluble y AGVs. NA= no aplica, por la fuerte inhibición que presenta el tratamiento o porque no puede ser determinado. ND= No detectado. *Valor elevado que puede ser debido a errores analíticos.

Tratamiento	PBM (mL CH ₄ /g SV)	Tiempo en llegar al máximo (días)	Tasa de producción máx. (mL CH ₄ /día)	Fase lag (días)	R ²	pH final	Alcalinidad mg CaCO ₃ /L	Relación alfa	DQO soluble (mg O ₂ /L)	AGVs (mg/L)
Celulosa + lodo	338±34	58	21±1.5	3.7±3.9	338±34	6.6	1720	0.46	1868	123
Celulosa + estiércol	NA	NA	NA	NA	NA	4.5	500	NA	8151	7674
Celulosa + estiércol+ lodo	425±7	28	62±0.2	3.1±0.3	425±7	7.1	6260	0.46	2180	ND
Alginato comercial + lodo	274±9	15	97±9	1.2±0.2	274±9	8.1	7220	0.82	2203	150
Alginato comercial + estiércol	28±3	7	14±1.4	1.7±0.05	28±3	5	2360	NA	20607	20163*
Alginato comercial + estiércol + lodo	259±4	19	54±3.5	0.8±0.10	259±4	7.4	9160	0.84	3523	62
Alginato puro + lodo	301±5	9	221±11	1.5±0.2	301±5	7.6	13760	0.44	3523	25
Alginato puro + estiércol	14±2	9	17±5	0.5±0.2	14±2	4.9	2933	NA	23681	9127
Alginato puro+estiércol + lodo	297±8	6	271±14	1.3±0.3	297±8	7.6	18626	0.46	2869	40

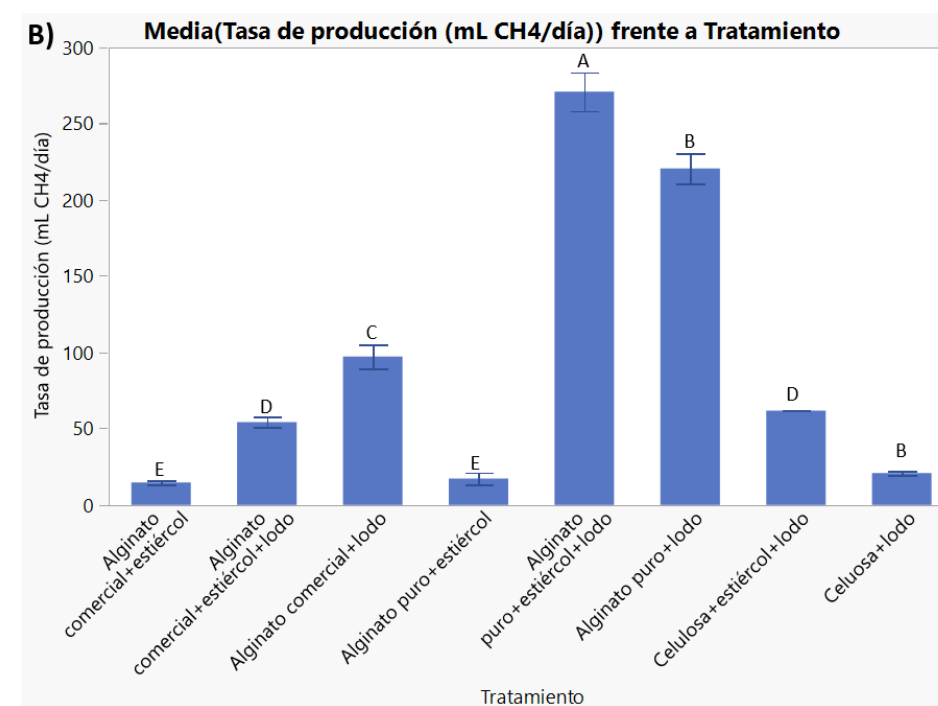
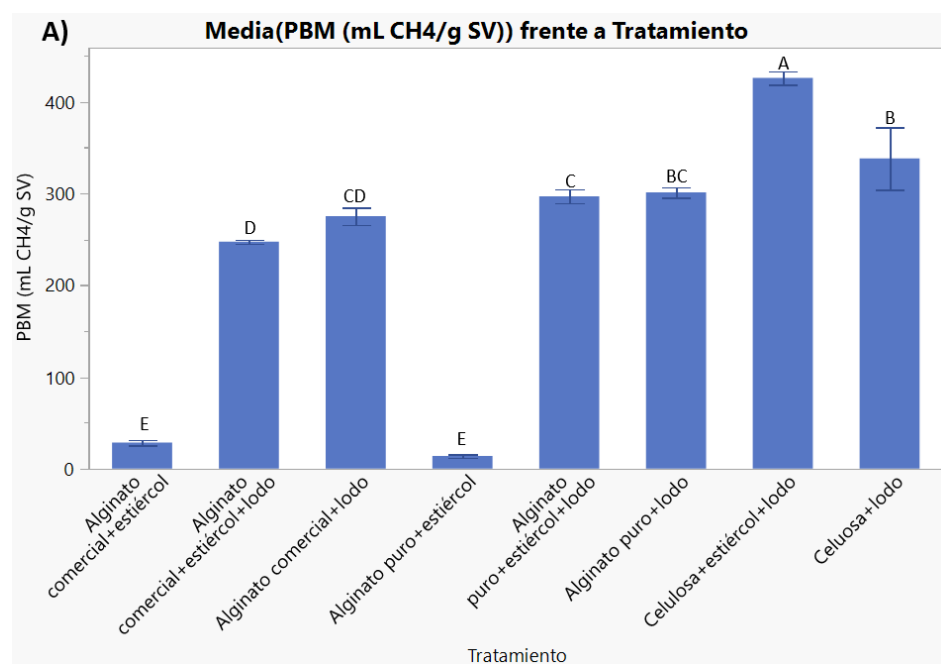


Figura 5.6. Diferencias del rendimiento de metano y tasa de producción máxima en las pruebas de PBM de celulosa y alginato, donde los tratamientos que presentan diferentes letras tienen diferencias significativas. **A)** Prueba Tukey del PBM en los tratamientos de la prueba de celulosa y alginato. **B)** Prueba Tukey de la tasa de producción máxima en los tratamientos de la prueba de celulosa y alginato.

De los resultados obtenidos, se observa que la menor (nula) producción de metano se presentó en el tratamiento en el cual se agregó celulosa + estiércol. La producción nula no permitió modelar la curva de producción e indica que la inhibición se dio desde etapas tempranas del proceso, debido a la actividad de las enzimas hidrolíticas del estiércol que degradaron la celulosa y produjeron rápidamente AGVs, bajando el pH de inmediato e inhibiendo a los microorganismos metanogénicos. El valor de pH final de 4.5, los AGVs (7674 mg/L) y la DQO (8151 mg/L) demuestran claramente esta inhibición.

Las pruebas con estiércol y el otro sustrato puro (alginato comercial y alginato puro en pruebas por separado con estiércol como inóculo) produjeron muy poco metano (28 mL CH₄/g SV y 14 mL CH₄/g SV, respectivamente) y únicamente hasta los días 7 y 6 días, respectivamente. Aparentemente, posterior a ese tiempo, se presentó una fuerte inhibición para los microorganismos metanogénicos, como se demuestra también con los valores de pH, DQO y AGVs obtenidos al final de la prueba. Al compararlo con el tratamiento de celulosa + estiércol, otro experimento con clara inhibición por acumulación de AGVs, se puede observar que la inhibición no es tan rápida, e incluso se generó una muy limitada cantidad de metano. Esto puede deberse a que el estiércol no hidroliza tan rápidamente el alginato, por lo que no tiene un pH inhibitorio en etapas tempranas. Otro factor que pudo haber ocasionado la diferencia con la prueba de celulosa, es la presencia de sodio en el alginato, que al producirse CO₂ en el medio, se favorece la formación de bicarbonato de sodio, actuando como buffer hasta que se agota (Valença *et al.*, 2021).

Entre los tratamientos de alginato comercial y alginato puro + estiércol no hay diferencia significativa en el rendimiento de metano ni en la tasa de producción. En estos tratamientos se dieron las condiciones para que la acidogénesis continuara, como lo demuestran la elevada concentración final de AGVs (20,163 mg/L y 9127 mg/L, respectivamente). Sin embargo, se puede observar que la acumulación de AGVs fue claramente mayor en el caso del alginato comercial + estiércol, ambos con valores de DQO muy elevadas (superiores a los 20,000 mg/L). Esto lleva a considerar que, posiblemente, hubo un error analítico en el caso de los AGVs del alginato comercial + estiércol. Otra explicación posible es que el sodio que forma parte del alginato se libera en parte, permitiendo el incremento de bicarbonato en el medio, lo que tiene propiedades de amortiguador, contribuyendo a lograr un pH menos ácido en etapas tempranas de la prueba

El PBM en los tratamientos de alginato comercial + lodo y alginato comercial + estiércol + lodo no presenta diferencias significativas (274 y 259 mL CH₄/g SV respectivamente) al igual que en los tratamientos respectivos

con alginato puro, que muestran la misma tendencia (301 y 297 mL CH₄/g SV respectivamente), esto indica que la presencia de estiércol no impacta en el rendimiento metano al utilizar alginato y lodo anaerobio. Esto puede asociarse a que los microorganismos hidrolíticos presentes en el estiércol no tienen la capacidad de degradar el alginato, lo cual era de esperarse, ya que el alginato es un componente específico de algas pardas y los bovinos no consumen dichos sustratos, por lo cual en sus estómagos no hay una presión selectiva para microorganismos con enzimas degradadoras de alginato.

Donde sí se identifican diferencias entre ambos tipos de alginatos, con base en el ajuste del modelo de Gompertz, es en la tasa de producción de metano. En efecto, en el tratamiento de alginato comercial + lodo se obtuvo una tasa de producción de casi el doble (97 vs 54 mL CH₄/día), pero una fase lag más larga (1.2 días vs. 0.8 días), respecto al tratamiento alginato comercial + estiércol + lodo, lo que señala que el estiércol retrasa la producción de metano al mezclarlo con alginato comercial. Por el contrario, el tratamiento con alginato puro + lodo tiene una tasa de producción significativamente menor que el alginato puro + estiércol + lodo (221 vs 271 mL CH₄/día respectivamente), con fase lag similar (1.5 y 1.3 días, respectivamente). Al comparar estos valores entre los dos tipos de alginatos, el compuesto puro obtiene mejores resultados que el comercial. Se aprecia en la **figura 5.5** y **tabla 5.4**, que los rendimientos de metano son significativamente diferentes y menores cuando se utiliza alginato comercial en comparación con el uso del alginato puro, lo que lleva a concluir que, efectivamente, el alginato comercial tiene alguna diferencia que genera cambios en el PBM. El alginato comercial posiblemente tiene diferente peso molecular que el alginato puro, presentando cadenas más largas, siendo más difícil de degradar y de convertir a metano.

Por otra parte, el rendimiento de metano obtenido en los tratamientos de celulosa que no presentan inhibición (celulosa + lodo y celulosa + lodo + estiércol) coinciden con lo reportado en la literatura (Wang *et al.*, 2014). La mayor producción de metano se obtuvo en el tratamiento de celulosa + estiércol + lodo (425 mL CH₄/g SV), que fue significativamente mayor que la producción en el tratamiento de celulosa + lodo (338 mL CH₄/g SV). La fase lag es similar en ambos tratamientos (3.7 y 3.1 días), pero la tasa de producción máxima de metano se triplica en el tratamiento con estiércol (21 vs. 62 mL CH₄/día). Esto se debe a que el estiércol bovino tiene la capacidad de degradar la celulosa y solubilizar sustratos para la DA, con mayor rapidez que la del lodo anaerobio utilizado en este experimento por los microorganismos hidrolíticos que se encuentran en los estómagos de las vacas.

Se encontró diferencia significativa entre el rendimiento de metano de celulosa + estiércol + lodo con todos los tratamientos con alginato. Sin

embargo, el rendimiento de metano a partir de celulosa + lodo no fue significativamente diferente a los tratamientos que emplea alginato puro + lodo. Así mismo, la tasa de producción del alginato puro y comercial es significativamente mayor que el de los tratamientos de celulosa y tienen fases lag cortas, lo que demuestra que los microorganismos dentro de la DA son eficientes al convertir alginato a metano. Esto coincide con lo reportado por Song y colaboradores, quienes probaron la producción de AGVs por medio de alginato y obtuvieron un alto contenido de los mismos, concluyendo que es un buen sustrato para la DA (Song *et al.*, 2015). Por otro lado, la búsqueda bibliográfica arrojó solamente un reporte de producción de metano a partir de ácido algínico, donde se obtuvo un bajo rendimiento de metano de 73 mL CH₄/g SV, muy por debajo de lo que se obtuvo en este trabajo (Milledge *et al.*, 2019b).

En la **tabla 5.5** se presenta la eficiencia de conversión del sustrato a metano de cada tratamiento respecto al rendimiento teórico obtenido con la ecuación de Buswell Calculado conforme a la composición química de molécula orgánica (C_aH_bO_cN_d) (Labatut *et al.*, 2011). La celulosa presenta una eficiencia de conversión de 82%, subiendo a 103% al agregarle estiércol, lo que muestra la aportación de la capacidad de hidrólisis del estiércol. En el caso del alginato comercial y puro con estiércol, la conversión es muy baja (9 y 4% respectivamente) debido a la ya mencionada inhibición por acumulación de AGVs. El alginato comercial + lodo y alginato comercial + lodo+ estiércol presentan un porcentaje de conversión muy similar (86 y 82% respectivamente), demostrando que el estiércol no promueve, a diferencia del caso de la celulosa, la producción de metano a partir del alginato. El alginato puro+ lodo presenta un mayor porcentaje de conversión sin ser sometido a la hidrólisis del estiércol (95%) y el agregarle estiércol permanece básicamente sin cambio (94%), por lo que se reafirma que el estiércol no presenta actividad hidrolítica sobre el alginato y que el alginato es un sustrato adecuado para la DA.

Tabla 5.5. Rendimiento experimental de tratamientos con celulosa y alginato de sodio, rendimientos teóricos calculados con la ecuación de Buswell con la fórmula química de los sustratos y porcentaje de conversión obtenido experimentalmente respecto al rendimiento teórico. El tratamiento de celulosa + estiércol no se agrega porque no presentó producción de metano por la fuerte inhibición.

Tratamiento	Rendimiento experimental (mL CH ₄ /g SV)	Rendimiento teórico (mL CH ₄ /g SV)	Porcentaje conversión
Celulosa + lodo	338	414	82
Celulosa + estiércol + lodo	425	414	103
Alginato comercial + lodo	274	317	86
Alginato comercial + estiércol	28	317	9
Alginato comercial + estiércol + lodo	259	317	82
Alginato puro + lodo	301	317	95
Alginato puro + estiércol	14	317	4
Alginato puro + estiércol + lodo	297	317	94

5.2.2. Pretratamiento microbiano

5.2.2.1. Desarrollo de un consorcio microbiano degradador de sargazo

Se obtuvo un consorcio microbiano adaptado al sargazo mezclando sargazo con materia en descomposición. Cuando se observó colonización de microorganismos en el sargazo, se mantuvo el crecimiento del consorcio agregando sargazo fresco en la parte superior del recipiente. Se observó que el consorcio comenzó a crecer con mayor rapidez al continuar agregando sargazo, hasta conseguir que el consorcio microbiano colonizara por completo el sargazo fresco en 10 días (**fig. 5.7A**). Por otro lado, a simple vista se aprecia que la biomasa pretratada presenta una estructura menos firme que el sargazo que no ha sido sometido al pretratamiento biológico. Al realizar la molienda del sargazo fresco y del sargazo pretratado, también fue posible observar el cambio en el aspecto de la biomasa, dada la consistencia de pasta obtenida (**fig 5.7B**).

Se realizó una comparación del sargazo fresco y el sargazo pretratado por FT-IR-ATR. Se comenzó comparando las dos partes del sargazo mencionadas anteriormente y se obtuvo mayor diferencia entre la parte café del sargazo pretratado y el sargazo fresco (**fig. 5.8A**), mientras que la parte amarilla del sargazo fresco presenta un espectro muy semejante a la del sargazo pretratado (**fig. 5.9B**). Esto es de interés, porque denota que hay componentes en la parte café que el consorcio microbiano puede degradar con mayor facilidad o selectividad que en la parte amarilla.

Así mismo, se esperaba obtener diferentes espectros del sargazo fresco molido y el sargazo pretratado molido. Se observa (**fig. 5.9**) que sus espectros de absorción presentan diferencias, lo que indica que el análisis

IR-ATR podría ser una herramienta para identificar cambios en el sargazo, cuando es sometido a pretratamientos.

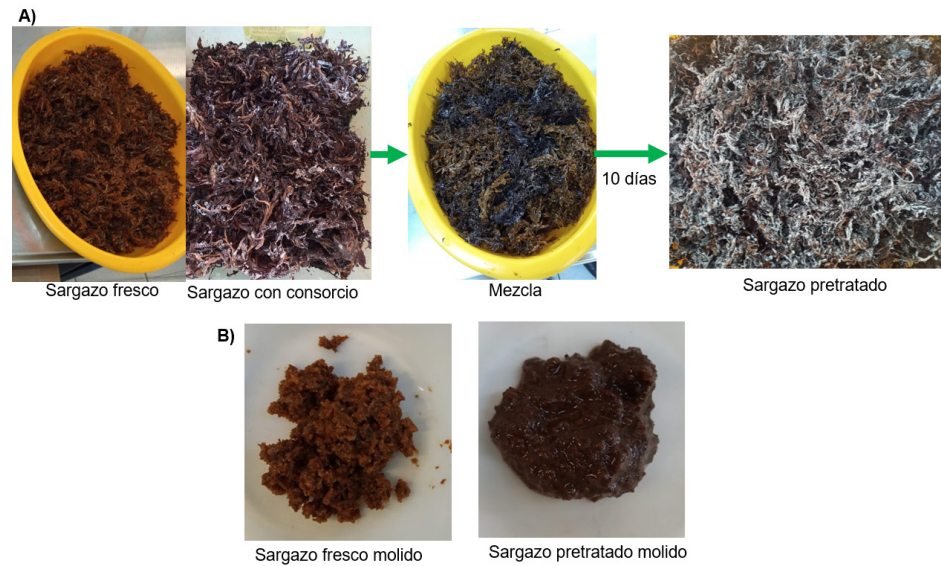


Figura 5.7. Pretratamiento biológico del sargazo. **A)** Procedimiento de pretratamiento biológico del sargazo. **B)** Aspecto del sargazo fresco y sargazo pretratado molido.

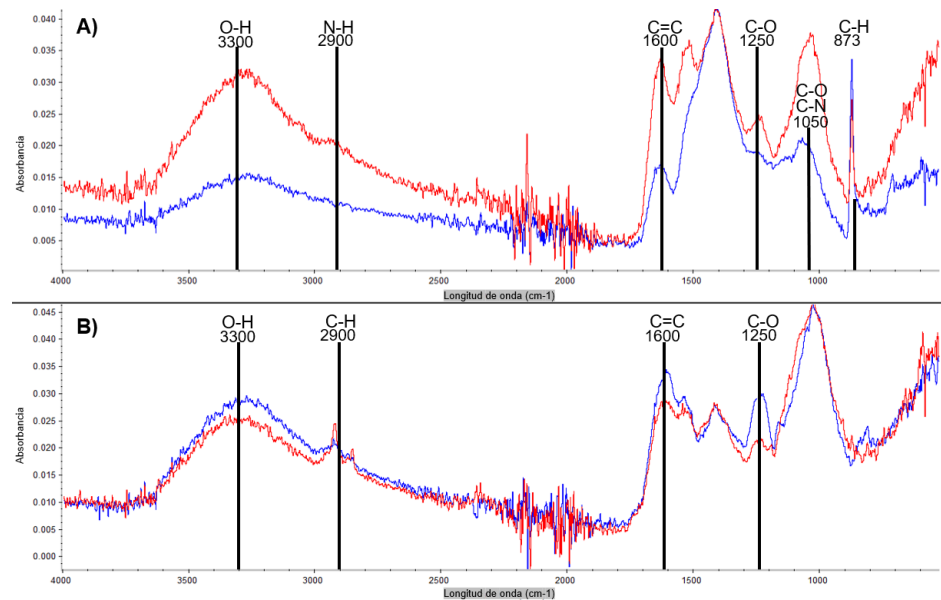


Figura 5.8. Comparación de las dos secciones de sargazo pretratado y sin pretratar analizadas por IR-ATR. **A)** Sección café del sargazo, espectro de absorción de sargazo pretratado (azul) y sargazo sin pretratar (rojo). **B)** Sección amarilla del sargazo, espectro de absorción de sargazo pretratado (rojo) y sargazo sin pretratar (azul).

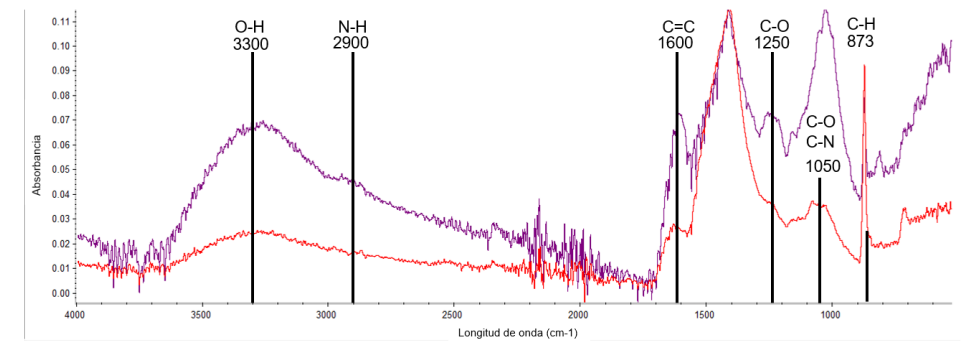


Figura 5.9. Comparación de espectro de absorción del sargazo pretratado molido (rojo) y sin pretratar molido (morado), analizadas por IR-ATR.

En todos los espectros de absorción vemos un cambio en la longitud de onda de 3300 cm^{-1} , siendo más notorio el efecto del pretratamiento en el sargazo molido y en la sección café del sargazo. Este cambio se asocia al estiramiento de enlaces de grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) presentes en la celulosa, hemicelulosa y lignina, lo que sugiere que se están modificando dichos polisacáridos. Por otro lado, en la sección amarilla el efecto es menos notorio, indicando que, posiblemente, hay algo que impide la modificación de los grupos hidroxilo. La formación de un pico a 2900 cm^{-1} se atribuye a la liberación de celulosa cuando la lignina se solubiliza, lo que sucede en la sección amarilla del sargazo (**fig. 5.8B**). En los otros dos espectros (**figs. 5.8A** y **5.9**) se aprecia una ligera reducción del pico en a 2900 cm^{-1} , atribuido a la modificación de compuestos alifáticos, como la clorofila (Tapia-Tussel *et al.*, 2019).

En los tres casos se observa una reducción en el pico localizado a 1600 cm^{-1} , siendo más evidente en el sargazo molido y en la sección café del sargazo (**figs. 5.8A** y **5.9**). Esto representa el estiramiento de enlaces $\text{C}=\text{C}$ de los compuestos aromáticos como la lignina. Así mismo, en el espectro del sargazo molido y la sección café del sargazo se aprecia un cambio en los picos a 873 cm^{-1} y 1050 cm^{-1} , cuando la biomasa es sometida a pretratamiento. El primero sugiere el estiramiento en los enlaces $\text{C}-\text{H}$ de polisacáridos, como la celulosa y la hemicelulosa y el segundo propone que los enlaces $\text{C}-\text{O}$ de los xilanos de la hemicelulosa y los enlaces $\text{C}-\text{N}$ de las aminas alifáticas de las proteínas se estiran. Por último, vemos la reducción del pico a 1250 cm^{-1} en todos los espectros, cuando la biomasa de sargazo fue sometida a pretratamiento, asociado a la modificación de enlaces $\text{C}-\text{O}$ que pueden representar cambios en el alginato y fenoles (Thompson *et al.*, 2020a).

Se han desarrollado metodologías para hacer la técnica de FTIR-ATR semicuantitativa. Esto funciona con los espectros generados, cuando se

observa una diferencia entre los tratamientos y se identifica el enlace que se ha modificado por la longitud de onda donde se encuentra el cambio. Con ello, es posible utilizar integradores que calculan el área bajo la curva de los picos antes y después del pretratamiento, lo cual da un dato numérico del cambio que sufrió el pico (Mackie *et al.*, 2016). Esto puede ser utilizado para determinar qué pretratamiento tuvo mayor efecto en la biomasa y se podría explorar en un futuro para cuantificar los cambios en el sargazo al seguirlo sometiendo a pretratamientos.

5.2.3. Prueba de PBM del sargazo, sargazo pretratado microbianamente, sargazo almacenado

Para probar la efectividad de hidrólisis del pretratamiento microbiano para liberar los sustratos para la DA, se realizó una prueba de PBM del sargazo y del sargazo pretratado. Se utilizó como inóculo el mismo lodo metanogénico de la prueba de PBM anterior y, en algunos tratamientos, se agregó estiércol como cosustrato hidrolítico (fig. 5.10A). También, se realizó una prueba de PBM del sargazo después de 6 meses de estar almacenado a 6°C. En esta ocasión, se comparó el efecto del lodo y el estiércol por separado y en conjunto (fig. 5.10B).

Nuevamente, para cada tratamiento se determinó la máxima producción de metano, cuando la curva llegó a fase estacionaria (PBM mL CH₄/g SV) y el tiempo que tardó en llegar a dicha producción (días) por criterio de Holliger. También se modelaron las curvas con la ecuación de Gompertz modificada, obteniendo parámetros de tasa de producción, fase lag y la R² al ajustar cada curva. Las curvas que al ser modeladas con la ecuación de Gompertz modificada presentan fases lag negativas, se ajustaron con una ecuación tipo Michaelis-Menten, para buscar un mejor ajuste y una determinación más precisa de la tasa de producción. Así mismo, se obtuvieron parámetros de pH, alcalinidad, demanda química de oxígeno (DQO) y ácidos grasos volátiles (AGVs) al final de la prueba de PBM (Tabla 5.6).

En los tratamientos donde el modelo de Gompertz presenta una fase lag negativa, la ecuación tipo Michaelis-Menten logra un mejor ajuste en las etapas tempranas de las pruebas. Esto se refleja en la estimación de la tasa máxima de producción, que, aunque en muchos de los casos arroja un valor similar al del modelo de Gompertz (tabla 5.6), en el caso del sargazo pretratado+ estiércol+ lodo no fue así. En ese tratamiento, el modelo de Gompertz calcula una tasa de producción de 9±2.8 mL CH₄/día. Sin embargo, la curva de este tratamiento indica a simple vista que la tasa de producción es mayor (fig. 5.10 A). Empleando la ecuación tipo Michaelis-Menten se obtiene una tasa de producción para ese tratamiento de 18±0.7 mL CH₄/día, que refleja lo que se muestra la curva. Con esto se muestra que, el modelo de Gompertz no debe ser empleado cuando se obtenga una

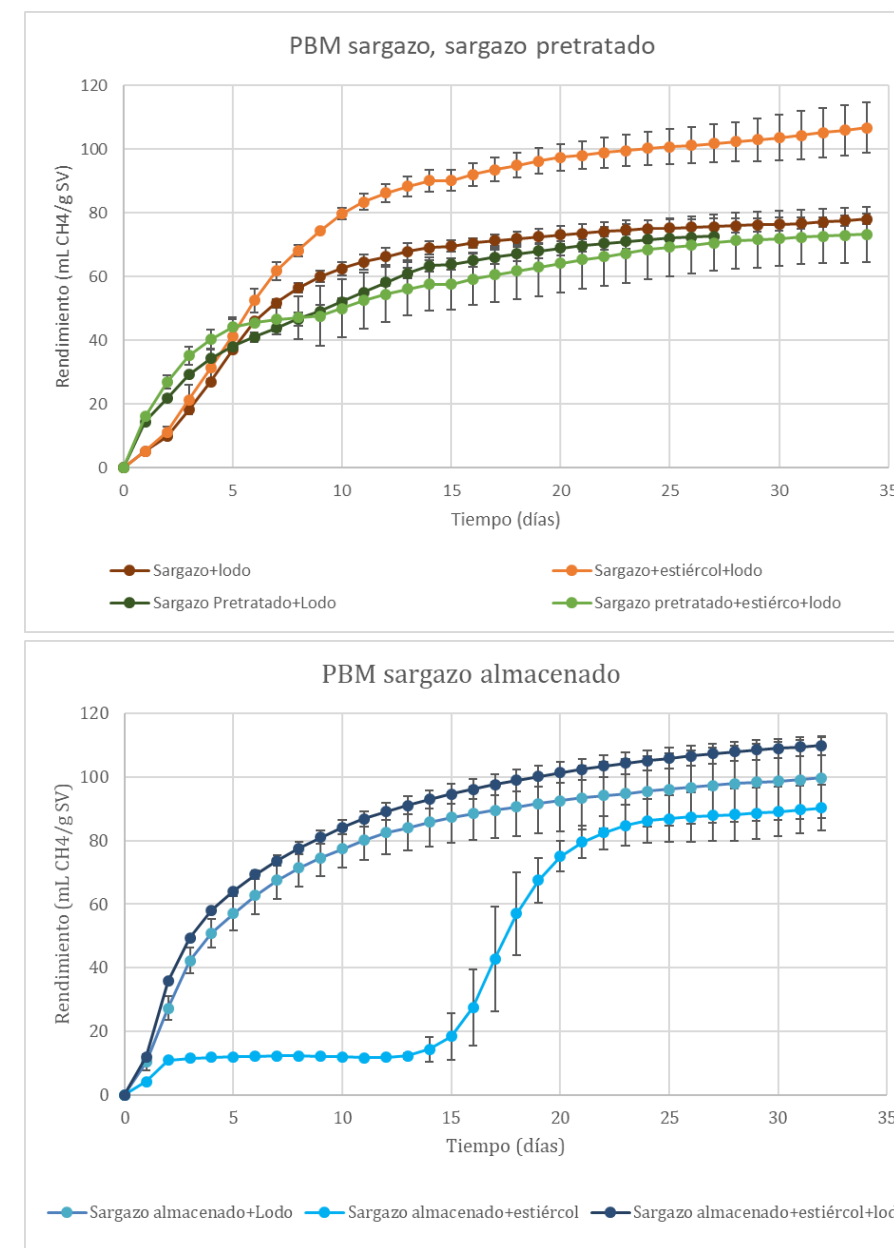


Figura 5.10. Curvas de rendimiento de metano en la prueba de PBM de sargazo, sargazo pretratado microbianamente y sargazo almacenado. **A)** Sargazo y sargazo pretratado: Café: sargazo + lodo, naranja: sargazo + lodo + estiércol, verde oscuro: sargazo pretratado + lodo, verde claro: sargazo pretratado + estiércol + lodo. **B)** Sargazo almacenado: azul: sargazo almacenado + lodo, azul oscuro: sargazo almacenado + lodo + estiércol, azul claro: sargazo almacenado + estiércol. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado o triplicado con una relación de sustrato:inóculo (S:I, base seca) de 2.86:1 y cosustrato-sustrato de 1:5 (base seca).

fase *lag* negativa y, en tales casos, es más adecuado utilizar la ecuación tipo Michaelis-Menten.

El sargazo almacenado con lodo y estiércol obtuvo la mayor producción de metano (PBM de 101 mL CH₄/g SV), seguido por el sargazo fresco con lodo y estiércol (97 mL CH₄/g SV). El sargazo almacenado con estiércol y el sargazo almacenado con lodo tienen un PBM de 86 y 92 mL CH₄/g SV, respectivamente, y no tienen diferencias significativas con los ya mencionados. Los tratamientos de sargazo fresco con lodo, sargazo pretratado con lodo y sargazo pretratado con estiércol y lodo presentaron un PBM similar de metano (71, 70 y 68 mL CH₄/g SV, respectivamente), siendo estadísticamente menor que el grupo de resultados ya mencionados (**tabla 5.6; fig. 5.11A**).

En las curvas de producción del sargazo fresco, a diferencia del sargazo pretratado, se aprecia una fase *lag* antes de comenzar la producción de metano. La producción inmediata de metano en las pruebas con sargazo pretratado indica que el consorcio logró hacer más fácilmente disponible el sustrato para los microorganismos metanogénicos, al hidrolizar en el pretratamiento algunos componentes del sargazo. Sin embargo, se observa un incremento en el PBM al agregar estiércol al sargazo fresco (97 mL CH₄/g SV), sobre el valor obtenido en las mismas condiciones, pero con sargazo pretratado

(68 mL CH₄/g SV). Esto permite inferir, que la producción de metano se vio limitada en este último caso, debido a que productos de hidrólisis generados por el consorcio microbiano fueron consumidos durante el pretratamiento por microorganismos presentes en el sargazo, ya que éste no se esterilizó. La **tabla 5.6** muestra que la cantidad de AGVs al final de la prueba de PBM es menor en el sargazo pretratado y alcanza un pH mayor, lo que indica el agotamiento de esos sustratos precursores de la metanogénesis.

Por su parte, el sargazo almacenado tampoco presenta fase *lag*, con excepción a la prueba con únicamente estiércol, lo que puede deberse también a que los microorganismos presentes en el sargazo lo hidrolizan en cierto grado durante su almacenamiento, liberando sustrato, lo que permite producción de metano más temprana. Sin embargo, a diferencia del sargazo pretratado, en este caso no parece haber habido consumo de los sustratos producidos durante el almacenamiento, pues el PBM no se redujo, de hecho, presentó el mayor valor de las pruebas postradas en la **tabla 5.6** (101 mL CH₄/g SV). Esto puede deberse a que los microorganismos que podrían consumir los hidrolizados estaban inhibidos por la baja temperatura de almacenamiento (6°C).

Tabla 5.6. Análisis de PBM de sargazo fresco, sargazo pretratado microbianamente y sargazo almacenado: PBM, tiempo en llegar al máximo de producción y parámetros obtenidos por modelo de Gompertz o tipo Michaelis-Menten: tasa de producción, fase *lag* y R² y parámetros obtenidos al finalizar la prueba de PBM: pH, alcalinidad, relación alfa, DQO soluble y AGVs. ND= no detectado. *En los casos que el modelo arroja fase *lag* negativa se determina que el modelo de Gompertz no es el adecuado. **En negritas se ponen los datos cuando las curvas se ajustaron con la ecuación tipo Michaelis-Menten.**

Tratamiento	PBM (mL CH ₄ /g SV)	Tiempo en llegar al máximo (días)	Tasa de producción máx. (mL CH ₄ /día)	Fase lag (días)	R ²	pH final	Alcalinidad mg CaCO ₃ /L	Relación alfa	DQO soluble (mg O ₂ /L)	AGVs (mg/L)
Sargazo+lodo	71±2	17	20±1.7	0.2±0.3	0.99	7.6	7400	0.38	327	106
Sargazo + estiércol + lodo	97±4	20	22±0.8	0.1±0.2	0.99	7.4	10380	0.46	77	67
Sargazo pretratado + lodo*	70±2	21	13±0.3	-2.5±0.1	0.99	7.8	5840	0.43	1011	40
Sargazo pretratado + lodo	70±2	21	15±0.3	NA	0.99	7.8	5840	0.43	1011	40
Sargazo pretratado + estiércol + lodo*	68±9	24	9±2.8	-6.5±3	0.96	7.8	7240	0.45	943	ND
Sargazo pretratado + estiércol + lodo	68±9	24	18±0.7	NA	0.97	7.8	7240	0.45	943	ND
Sargazo almacenado + lodo*	92±9	19	20±2.4	-2±0.7	0.98	7.2	6666	0.4	1311	102
Sargazo almacenado + lodo	92±9	19	19±1.8	NA	0.99	7.2	6666	0.4	1311	102
Sargazo almacenado + estiércol	86±7	24	37±3	14±1	0.98	7.4	5426	0.46	1692	385
Sargazo almacenado + estiércol + lodo*	101±3	20	20±1	-3±0.3	0.98	7.3	7985	0.45	767	44
Sargazo almacenado + estiércol + lodo	101±3	20	21±0.4	NA	0.99	7.3	7985	0.45	767	44

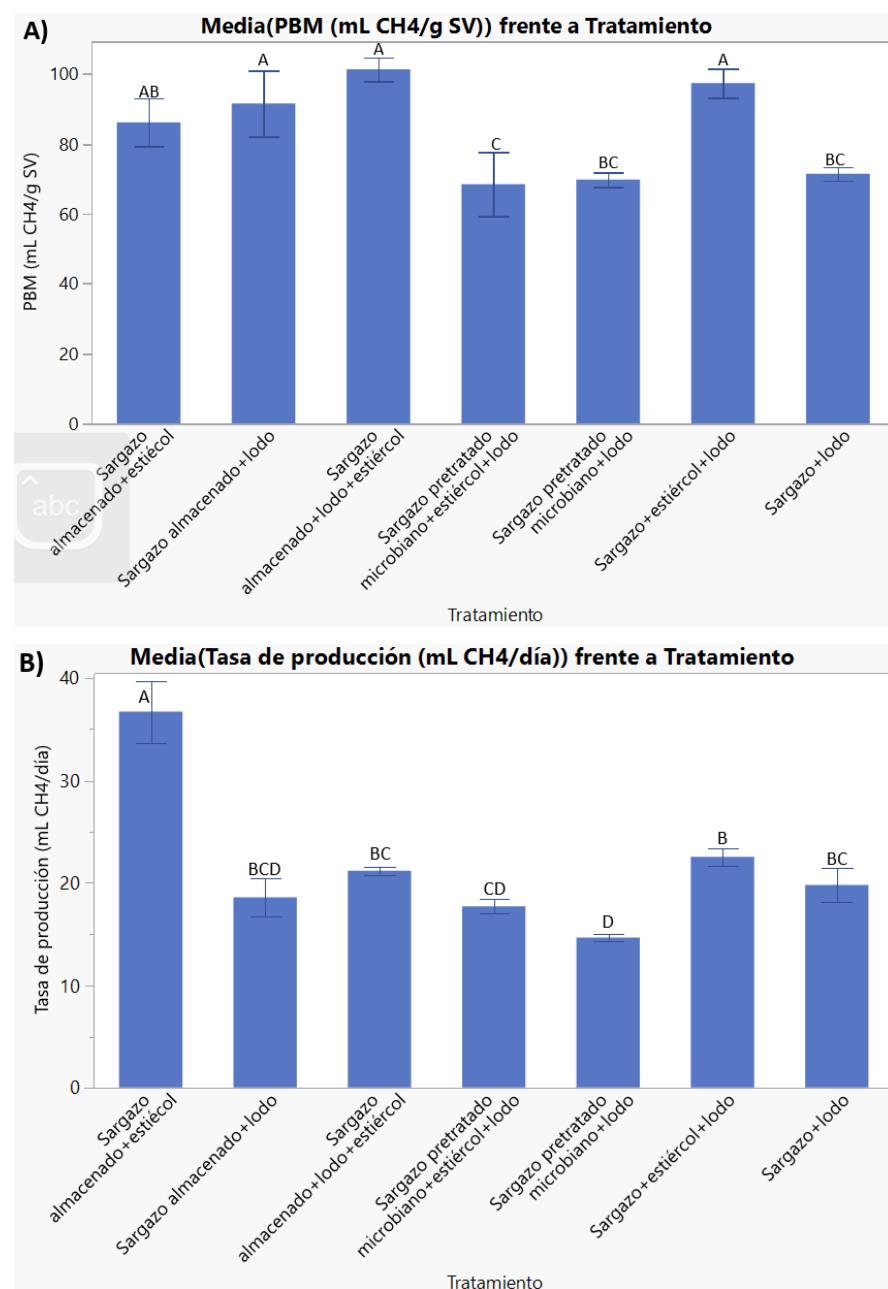


Figura 5.11. Diferencias del PBM y tasa de producción en las pruebas de los tratamientos de sargazo fresco, sargazo pretratado microbianamente y sargazo almacenado, donde los tratamientos que presentan diferentes letras tienen diferencias significativas. **A)** Prueba Tukey del PBM en los tratamientos de la prueba. **B)** Prueba Tukey de la tasa de producción máxima en los tratamientos de la prueba.

La prueba de sargazo almacenado y estiércol presentó, después de una producción de metano limitada, una fase *lag* muy prolongada (14 días). Una vez terminada esta etapa de adaptación del consorcio microbiano en las botellas, la producción de metano se incrementó, presentando el valor mayor de tasa de producción (37 mL CH₄/día) de las pruebas presentadas en la **tabla 5.6**. Al término de la prueba, el PBM fue cercano al obtenido con el mismo tipo de sargazo, pero con lodo (86 vs 92 CH₄/g SV).

La **figura 5.11** presenta los valores de PBM (A) y de tasa máxima de producción de metano (B) obtenidos en las pruebas con sargazo fresco, pretratado y almacenado, con el análisis estadístico para identificar diferencias significativas entre ellos.

El análisis de la figura permite señalar que, al combinar sargazo fresco con estiércol y lodo, se aumenta el rendimiento de metano por 37% con respecto al tratamiento que solo contiene lodo (**fig. 5.11A**), aunque la tasa máxima de producción no presenta diferencias significativas.

Los tratamientos de sargazo con lodo y estiércol tienen mayor alcalinidad y relación alfa que los tratamientos solamente con lodo, esto indica que, a parte del beneficio hidrolítico, agregar estiércol incrementa la estabilidad de dichos tratamientos (**tabla 5.6**). Para el sargazo pretratado y lodo, la adición de estiércol no representó una ventaja en términos del PBM, al compararlo con la prueba correspondiente con sólo lodo. Como ya fue mencionado, el pretratamiento del sargazo no esterilizado llevó a un decremento en la PBM, comparado con el obtenido con los mismos inóculos, pero con sargazo fresco.

En cuanto al sargazo almacenado, la combinación con lodo y estiércol aumentó el rendimiento de metano en un 10 y 16% respecto a los tratamientos de sargazo almacenado solamente con lodo o con estiércol, respectivamente, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**fig. 5.11A**). El efecto disminuido del estiércol en el sargazo almacenado puede deberse a que los microorganismos dentro del sargazo hidrolizan, a pesar de la baja temperatura, los polisacáridos que también degradan los microorganismos en el estiércol, por lo que este último no tiene tanto impacto negativo en la producción de metano.

Frente a los bajos valores de PBM del sargazo, comparados con otro tipo de biomasa, se pueden emplear otras estrategias para buscar mejorar la producción de metano. Se ha determinado que la relación S:I tiene un fuerte efecto en la producción de metano de biomasa recalcitrante. Se ha probado el efecto de dicha relación en sargazo, obteniendo que la mayor producción de metano fue en relación S:I de 1.4:1, por arriba de la relación 2.7:1 y 4.1:1. En este trabajo el PBM se realizó con una relación S:I de 2.86:1, que, aunque

tiene un mayor rendimiento teórico que con relaciones más pequeñas, se han publicado datos que probarían que no es lo más favorable. Por ello, es de interés probar la relación cercana a la de 1.4:1 en nuevas pruebas de PBM (López-Aguilar *et al.*, 2021). Al respecto, debe mencionarse que, el reducir esta relación implica mayor cantidad de inóculo o cosustrato, lo que puede llegar a convertir el sargazo en un sustrato complementario y no el principal.

5.2.4. Aislamiento de microorganismos del consorcio microbiano

Se trabajó para aislar los microorganismos del consorcio microbiano adaptado al sargazo, con el objetivo de utilizarlos por separado y determinar cuál/cuales tienen efecto en la hidrólisis del sargazo. Al conocer los microorganismos que componen el consorcio es posible identificar mejoras en los pretratamientos. Aislar los microorganismos se hizo con el fin de determinar solamente a contribución de los microorganismos hidrolíticos aislados, y evitar que los monosacáridos liberados sean consumidos por otros integrantes del consorcio natural que acompañaban al sargazo y que no aportan al objetivo de hidrolizar el sargazo para aumentar la producción de metano.

Se prepararon 3 tipos medios de cultivo: uno general para hongos (papa dextrosa) (fig. 5.12A), otro con sargazo (fig. 5.12B) y otro compuesto por celulosa, alginato y minerales esenciales. Se inocularon las cajas con asadas del sargazo pretratado, específicamente de las secciones en las cuales se veía crecimiento de micelios blancos. Se reinocularon los hongos en placas hasta obtenerlos aislados.

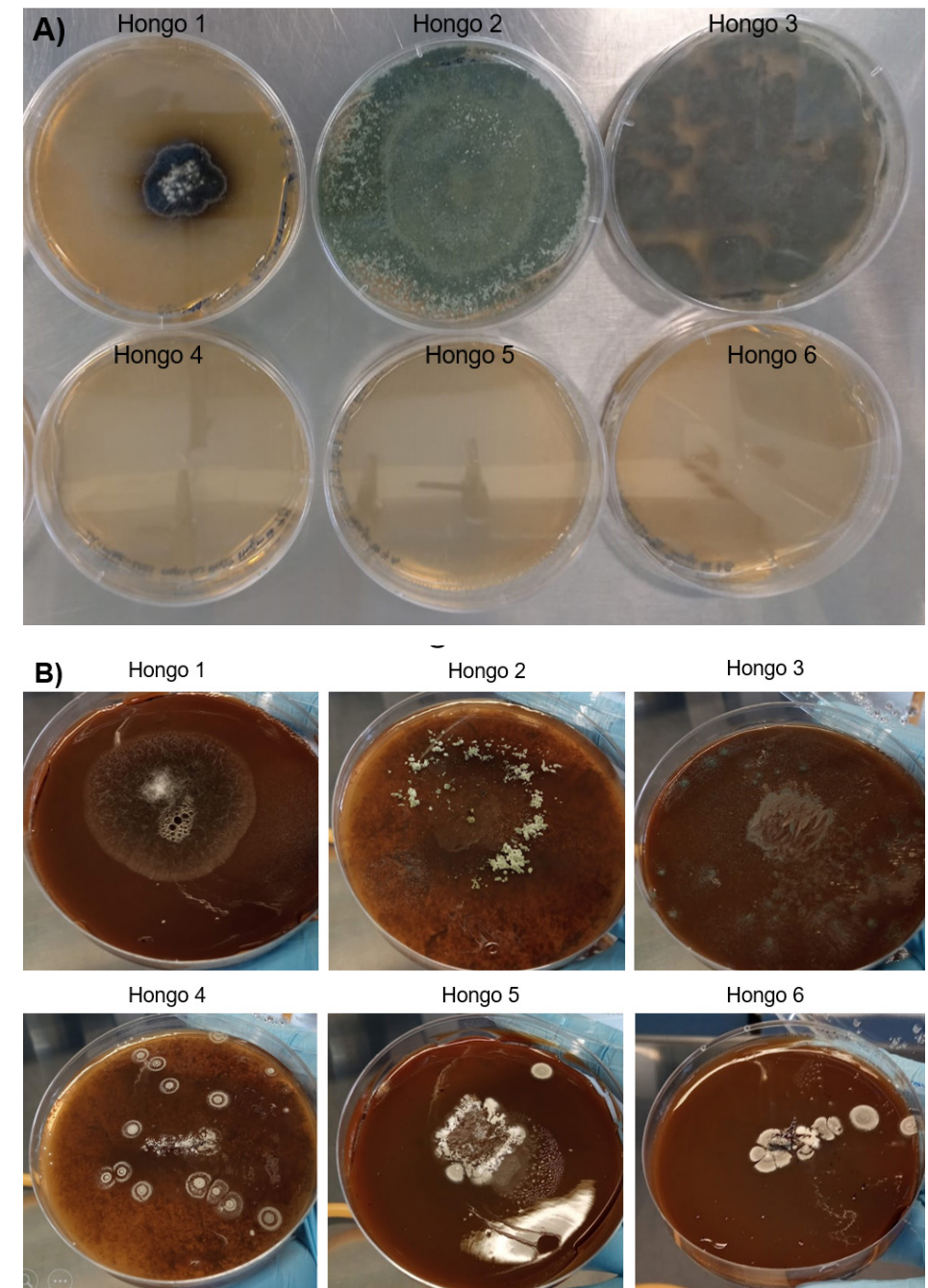


Figura 5.12. Cultivos de hongos aislados del sargazo **A)** Crecimiento de hongos en medio papa dextrosa. Inoculados del sargazo que contiene crecimiento de micelios blancos. **B)** Crecimiento de microorganismos en medio de sargazo como única fuente de carbono.

Macrocópicamente, se detectó el crecimiento de un solo hongo por placa. Éstos se observaron al microscopio, con el objetivo de identificar estructuras que permitieran corroborar que sólo había un tipo de hongo en cada cultivo (**fig. 5.13**). De esta forma, se determinó que los cultivos efectivamente contenían hongos aislados.

Los hongos 1, 2 y 3 crecieron en los tres medios de cultivo, mientras que los hongos 4, 5 y 6 crecieron en el medio de sargazo y en el de celulosa y alginato, pero no en el medio de papa dextrosa. Esto sugiere que los hongos 4, 5 y 6 son selectivos al sargazo y requieren de fuentes de carbono complejas (como la celulosa y el alginato) para su crecimiento, por lo que son los de mayor interés para degradar los carbohidratos complejos del sargazo y así favorecer una mayor producción de metano.

De los microorganismos aislados se buscará, ya fuera del alcance de este trabajo, obtener extractos enzimáticos, para probar su capacidad particular de hidrólisis del sargazo y su efecto en el rendimiento de metano. Con ello se buscaría evitar el costo de enzimas y el tardado proceso de purificación de éstas. Los extractos enzimáticos permitirían evaluar el efecto de cada microorganismo con un aumento menor en costo para el proceso de DA (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2017). Los microorganismos que tengan mejor resultado para incrementar el rendimiento de metano serán entonces secuenciados y estudiados a mayor profundidad.

5.3. PRETRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS

Al abordar este aspecto del plan experimental, se buscaba determinar el efecto que tienen las enzimas en la degradación del sargazo y, por ende, en la producción de metano. Para ello, se consiguieron enzimas que degradaran polisacáridos estructurales representativos del sargazo (celulosa y alginato). Con base en esto, se seleccionó la enzima celulasa CellicCTec2 (Sigma-Aldrich) y la enzima alginato liasa (Weifang Yuexiang Chemical Co).

5.3.1. Alginato liasa en alginato de sodio

Los proveedores de la enzima alginato liasa mencionan condiciones óptimas de la enzima con rangos de temperatura y concentración amplios (pH neutro, temperatura 35-45°C y concentración 0.2-1% respecto al alginato de sodio en solución). Para precisar mejor los valores más adecuados, se realizaron cinéticas enzimáticas determinando liberación de azúcares reductores por medio de la prueba de DNS, utilizando la enzima en alginato de sodio. Se probaron las condiciones de 35, 40 y 45°C y las cargas de 0.2, 0.6 y 1%.

Los resultados de las cinéticas no tienen tendencias claras en la mayor parte de la prueba, lo que puede deberse a problemas en el muestreo por la viscosidad del alginato de sodio disuelto. Tomando en cuenta solamente

la absorbancia final de cada cinética (a las 250 horas), se hizo un análisis estadístico para determinar la mejor condición. Se obtiene que, a 40 o 45°C la enzima tiene mejor efecto que a 35°C, por lo que se optó utilizar la temperatura de 45°C, para buscar realizar este pretratamiento en conjunto de la enzima CellicCtec2 que veremos a continuación (**fig. 5.14**).

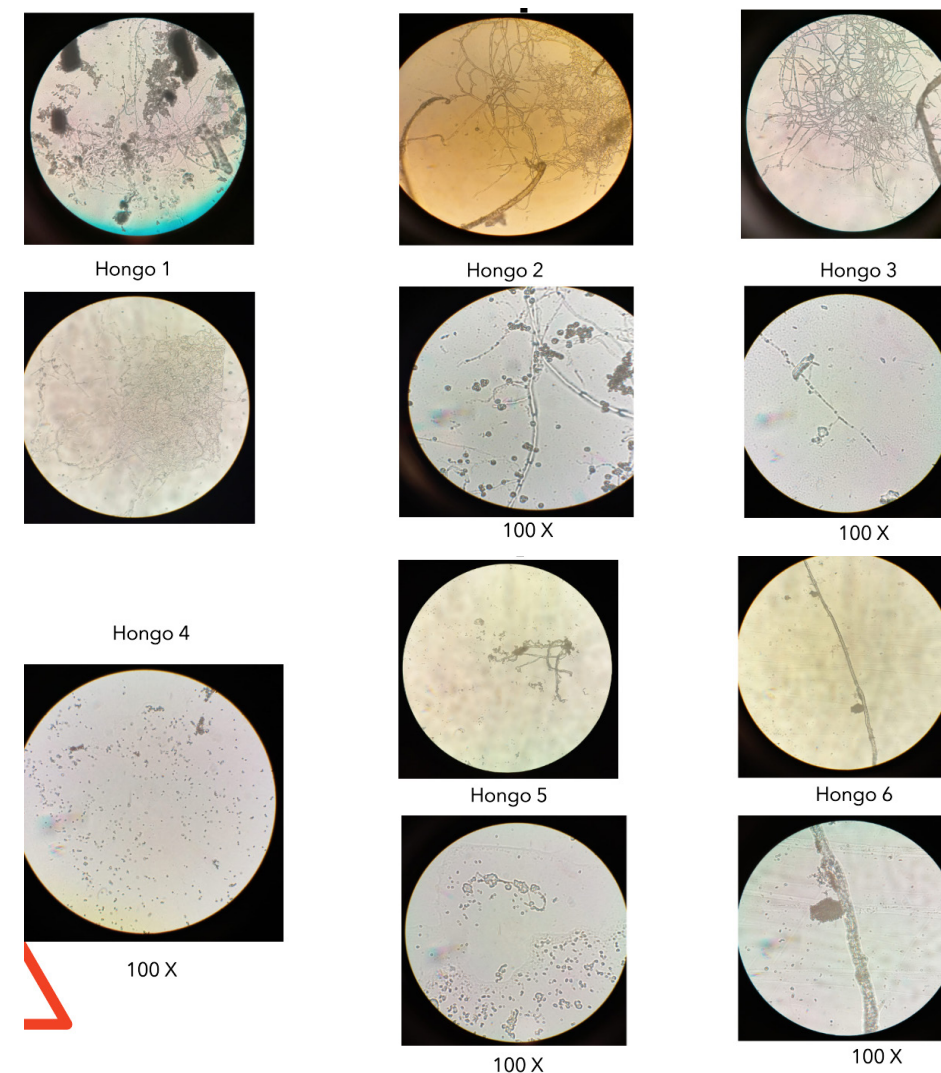


Figura 5.13. Observaciones al microscopio de hongos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 a resolución 40X y 100X.

Con respecto a identificar la concentración de la enzima óptima para la degradación de alginato, se obtuvieron los espectros en el infrarrojo ATR del alginato pretratado a 45°C a las diferentes concentraciones y el alginato, sin someter a pretratamiento. El espectro que muestra más diferencias respecto

al control es el pretratamiento con carga de 0.6% de enzima, aunque no se ve una diferencia muy notoria entre espectros (**fig. 5.15**), lo que es consistente con el análisis estadístico de la figura 5.15. Se optó por utilizar una carga de 0.4% en el sargazo, tomando en cuenta que aproximadamente un 12 a 20% de la biomasa es alginato y que dicha concentración sería suficiente para hidrolizar el alginato del sargazo (Davis *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2022).

Existen dos tipos de enzimas alginato liasas, las endolíticas y las exolíticas, donde la primera solamente rompe el alginato a ácido algínico y la segunda produce ácido algínico y también es capaz de convertirlo a monosacáridos (Kim, Lee y Lee, 2011). Los proveedores no especifican el tipo de alginato liasa que comercializan, por lo que no se sabe con certeza de qué enzima se trata. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos, donde se identifica solamente un ligero cambio en el espectro de absorción, se infiere que se trata de una enzima endotípica que produce solamente ácido algínico, sustrato aún complejo para incorporar al proceso de DA.

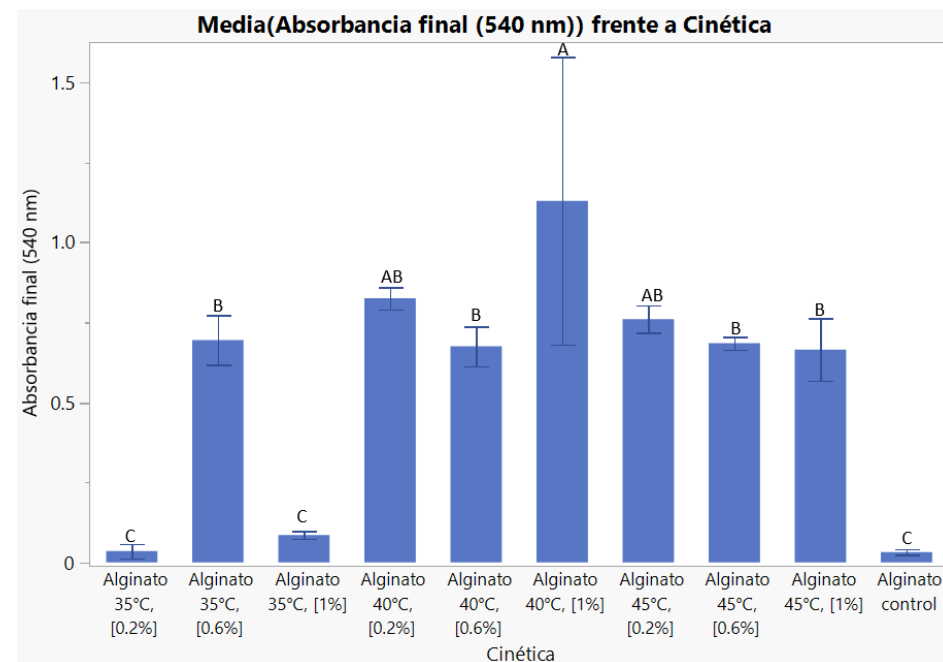


Figura 5.14. Prueba Tukey de la absorbancia final de cada cinética de alginato con alginato liasa.

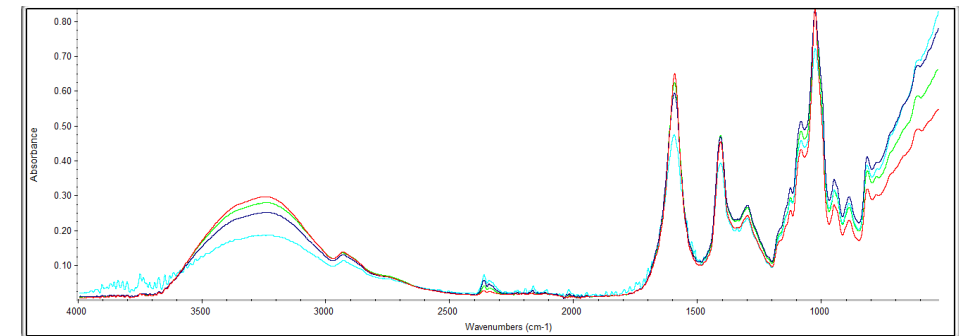


Figura 5.15. Espectro de absorción de alginato pretratado con distintas concentraciones de enzima y sin pretratar con alginato liasa analizadas por IR-ATR. Rojo: sin pretratar, verde: 0.2%, azul claro: 0.6%, azul oscuro: 1%.

5.3.2. CellicCTec2 en celulosa

Se probó el efecto de la enzima CellicCTec2 (Sigma-Aldrich) en celulosa grado reactivo, para corroborar su correcto funcionamiento. Sus condiciones óptimas son a un pH de 5, temperatura de 50°C y a una concentración de 150 FPU/g sustrato (Montiel *et al.*, 2016). Se probaron las mismas condiciones variando la temperatura a 45°C, buscando acoplar los pretratamientos de las dos enzimas a la misma temperatura (**fig. 5.16**). Se observa el correcto funcionamiento de la enzima CellicCTec2 y la misma tendencia a 45 y a 50°C. Aunque al trabajar la enzima a 50°C la absorbancia a las 24 horas es mayor, la diferencia respecto a la temperatura de 45°C no se considera importante.

Se obtuvo el espectro infrarrojo de la celulosa sin pretratamiento y con pretratamiento a 45 y a 50°C, se observan tres cambios entre la celulosa pretratada y sin pretratar en las longitudes de onda 3300, 2350, 1600 y 873 cm^{-1} , que están asociados a cambios en los enlaces O-H, C-H y C-C presentes en polisacáridos como la celulosa (Thompson *et al.*, 2020b). Entre los pretratamientos se observan espectros muy similares (**fig. 5.17**).

Tanto la cinética enzimática como los espectros infrarrojos demuestran que la enzima CellicCTec2 tiene buen funcionamiento a 45°C, por lo que se decidió emplear dicha temperatura para poder utilizar ambas enzimas en los pretratamientos de sargazo.

Cinéticas celulosa-Cellic CTec2

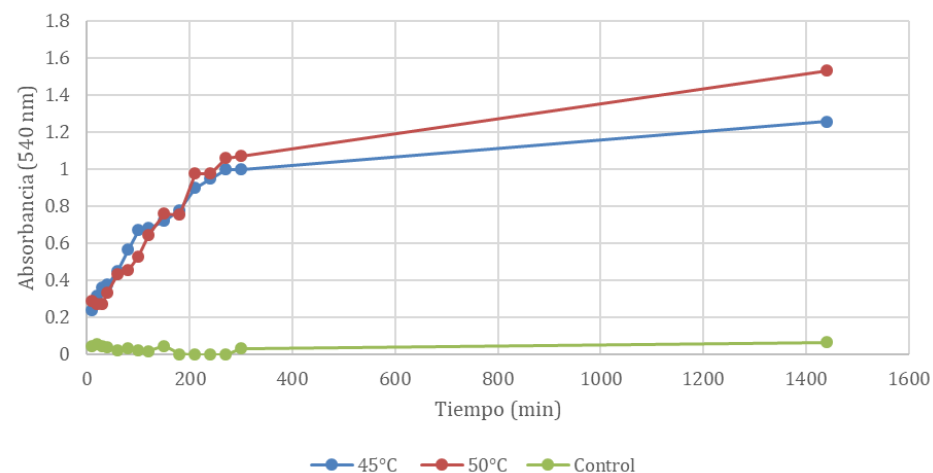


Figura 5.16. Cinética enzimática de CellicCTec2 en celulosa. Azul: 45°C, rojo: 50°C, verde: control de celulosa sin enzima.

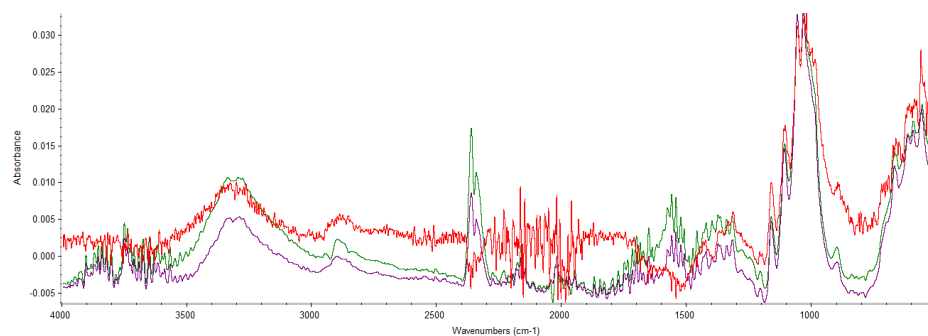


Figura 5.17. Comparación del espectro de celulosa pretratado y sin pretratar con CellicCTec2 analizadas por IR-ATR. Rojo: celulosa; Morado: celulosa pretratada a 45°C; Verde: celulosa pretratada a 50°C.

5.3.3. Efecto de las enzimas en sargazo

Se realizaron los pretratamientos de sargazo con las dos enzimas ya mencionadas en sus condiciones óptimas (Alginato liasa: 45°C, pH 7 y concentración de 0.6%; CellicCTec2: 45°C, pH 5 y concentración de 150 FPU/g sustrato) (fig. 5.18).

En la figura 5.18 se puede ver que la enzima CellicCTec2 produce el doble de azúcares reductores con respecto al control, presentando diferencias significativas. Por otro lado, la enzima alginato liasa produce una cantidad limitada de azúcares reductores y no tiene diferencias significativas respecto al control. También, que el control produzca azúcares reductores, sugiere que al someter el sargazo a temperatura de 45°C existe degradación de éste (fig. 5.19).

Cinética: Enzimas en sargazo

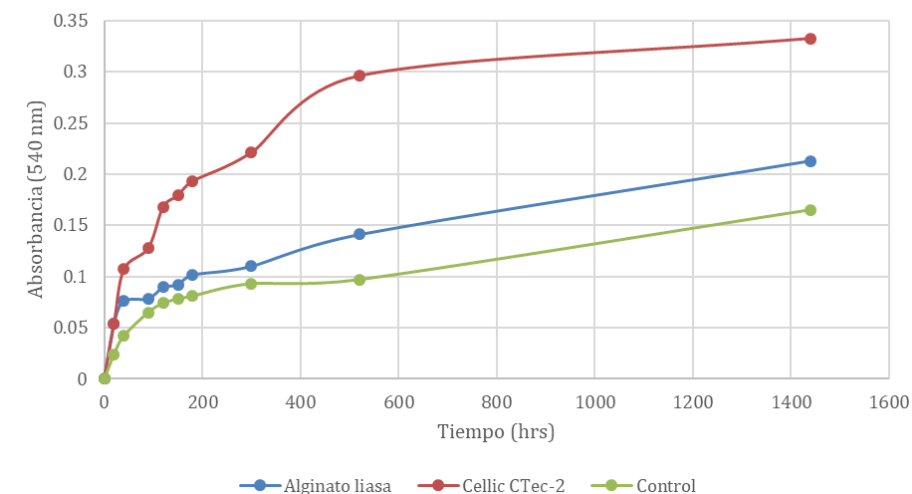


Figura 5.18. Cinéticas enzimáticas en sargazo: azul: alginato liasa, rojo: CellicCTec2, verde: control de sargazo sin enzimas.

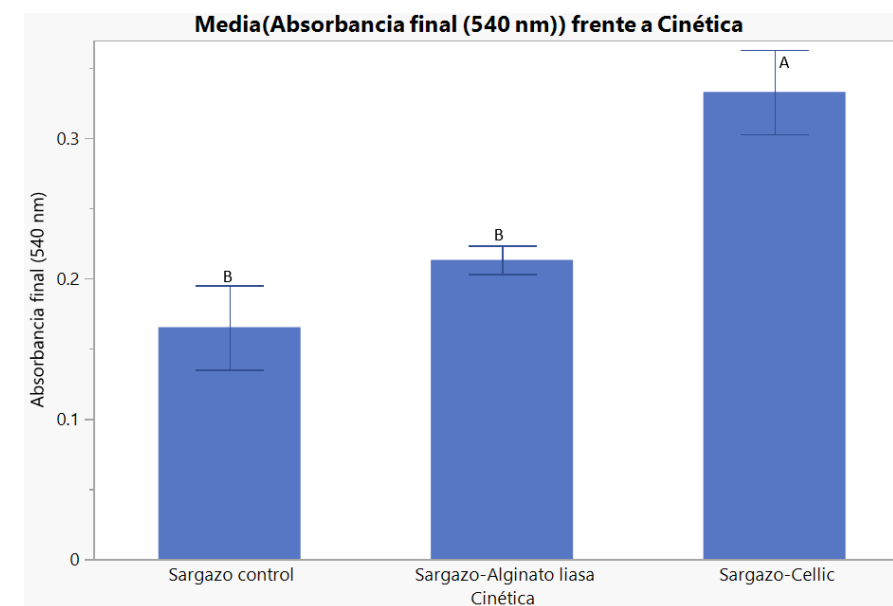


Figura 5.19. Prueba Tukey de la absorbancia final en el sargazo que no se sometió a enzimas (control) y el sargazo sometido a las enzimas CellicCTec2 o alginato liasa.

5.3.4. PBM de sargazo acoplado a pretratamientos enzimáticos

Se pretrató el sargazo con las enzimas por separado y juntas por 24 horas en condiciones óptimas para cada enzima, a modo de pretratamiento. En el pretratamiento con ambas enzimas, se realizó primero el pretratamiento

con la enzima alginato liasa a pH 7 y después se bajó el pH a 5 para el pretratamiento con CellicCtec2. Posteriormente, se agregó la biomasa pretratada y el sobrenadante a las botellas, para realizar las pruebas de PBM, utilizando lodo anaerobio como inóculo (**fig. 5.20**).

En todos los tratamientos de este experimento se obtuvieron fases *lag* negativas al ajustar la ecuación de Gompertz modificada, por lo que se utilizó la ecuación tipo Michaelis-Menten y se obtuvo un mejor ajuste de las curvas, lo que refuerza que cambiar de modelo cuando hay fases *lag* negativas en el modelo de Gompertz mejora la determinación de la tasa de producción.

Se observa que el rendimiento de metano y la tasa de producción entre el tratamiento control y el que fue acoplado con el pretratamiento de alginato liasa no tienen diferencias significativas. También se observa que el tratamiento de sargazo con lodo y CellicCTec2 no presenta diferencias significativas con el tratamiento pretratado con ambas enzimas. Con esto se concluye, que la enzima alginato liasa no tiene efecto en el PBM (**fig. 5.20 y 5.21**).

Como se muestra en la **tabla 5.7**, la baja concentración de AGVs final en todos los tratamientos sugiere que la conversión a metano es eficiente. En todos los tratamientos se observó pH neutro y una relación alfa por arriba de 0.4, por lo que no hubo indicios de inhibición.

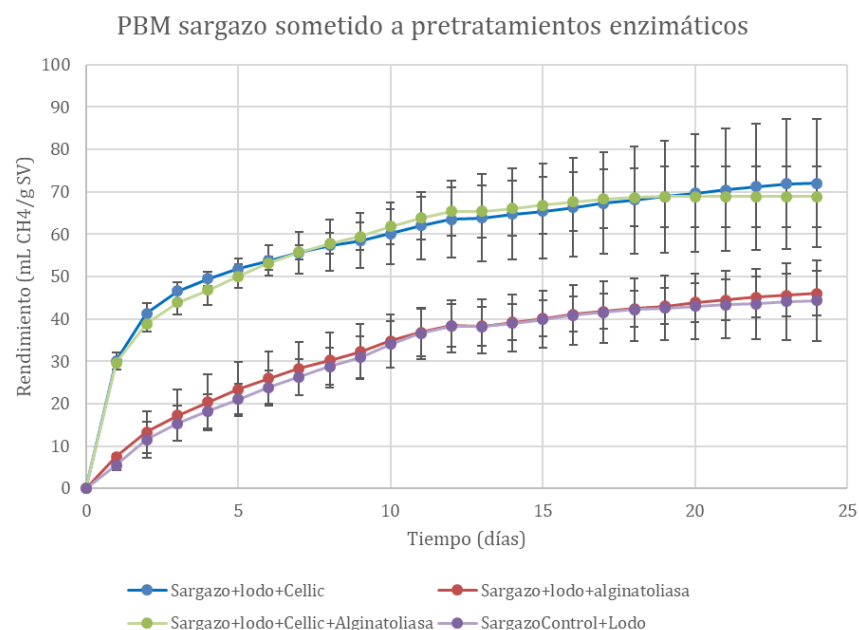


Figura 5.20. Curvas de rendimiento de metano en la prueba de PBM de sargazo pretratado con enzimas. Azul: sargazo+ lodo+ CellicCTec2, rojo: sargazo+ lodo+ alginato liasa, verde: sargazo+ lodo+ CellicCTec2+ alginato liasa, morado: sargazo+ lodo.

Tabla 5.7. Análisis de PBM de sargazo pretratado con enzimas: en la tabla se muestran el PBM, tiempo en llegar al máximo calculados con el criterio de Holliger, los parámetros obtenidos al ajustar la ecuación tipo Michaelis-Menten (tasa de producción y R^2) y parámetros obtenidos al finalizar la prueba de PBM: pH, alcalinidad, relación alfa, DQO soluble y AGVs.

Tratamiento	PBM (mL CH ₄ /g SV)	Tiempo en llegar al máximo (días)	Tasa de producción máx. (mL CH ₄ /día)	R ²	pH final	Alcalinidad mg CaCO ₃ /L	Relación alfa	DQO soluble (mg O ₂ /L)	AGVs (mg/L)
Sargazo + lodo + Cellic	71±14	22	32±7	0.99	7.2	6173	0.51	336	51
Sargazo + lodo + Alginato liasa	45±5	22	7±3	0.98	7.2	5960	0.49	812	21
Sargazo + lodo + Cellic+ Alginato liasa	68±7	16	27±4	0.99	7.4	6413	0.55	233	18
Sargazo + lodo	42±7	18	6±0	0.99	7.2	6040	0.45	300	13

El efecto de agregar enzima CellicCTec2 al sargazo estéril permitió un incremento del 69% en el rendimiento de metano, indicando que el hidrolizar la celulosa del sargazo tiene un claro beneficio en la DA de estas especies.

La tasa de producción y el rendimiento de metano al agregar la enzima alginato liasa al sargazo y al sargazo con enzima CellicCTec2 no presenta alteración, lo que sugiere que la enzima alginato liasa no tiene efecto en la hidrólisis del sargazo y, por ello, no representa un beneficio a la producción de metano.

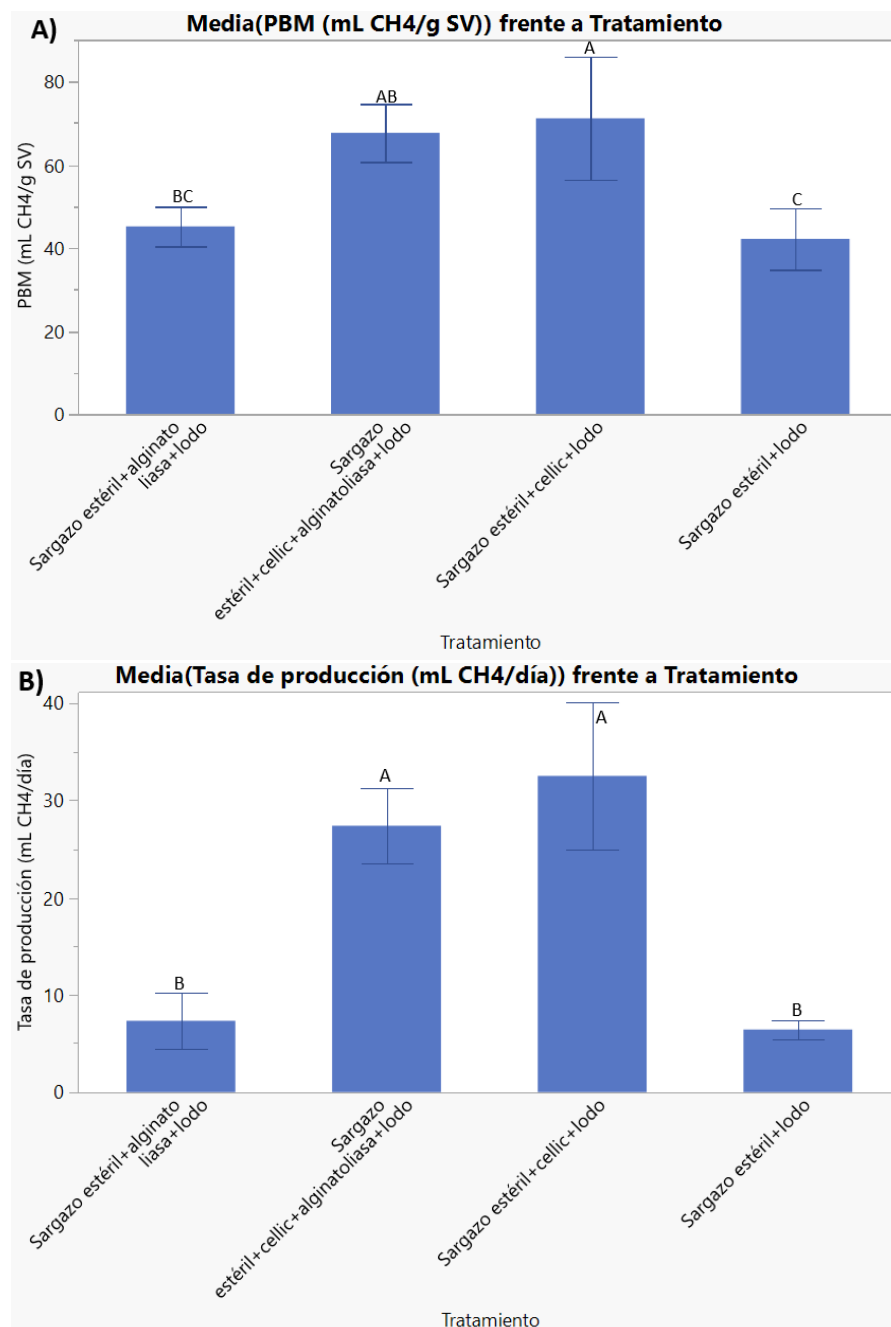


Figura 5.21. Diferencias del PBM y tasa de producción en las pruebas de sargazo control, sargazo pretratado con CellicCTec2 y/o alginato liasa, donde los tratamientos que presentan diferentes letras tienen diferencias significativas. **A)** Prueba Tukey del PBM en los tratamientos de la prueba. **B)** Prueba Tukey de la tasa máxima de producción en los tratamientos de la prueba.

5.4. COMPARACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS EN LA SÍNTESIS DE METANO A PARTIR DE SARGAZO

5.4.1. Contribución de las condiciones experimentales aplicadas

En este trabajo se utilizó DA para producir metano a partir de sargazo sin pretratar y expuesto a distintos pretratamientos: pretratado biológicamente con microorganismos y enzimas, almacenado en frío y esterilizado con calor. El sargazo fue mezclado con lodo anaerobio y en algunas pruebas, con estiércol como cosustrato hidrolítico. A continuación, se discute la aportación de las condiciones específicas aplicadas sobre el rendimiento de metano (PBM), tomando la prueba de sargazo + lodo como referencia.

En la **tabla 5.8** puede observarse que la enzima CellicCTec2 genera el mayor porcentaje de aumento del rendimiento de metano, pero no es el rendimiento de metano más alto. Esto se debe a que el secado y la esterilización de la biomasa provoca un decremento del 42% en el rendimiento de metano, que puede deberse a que la comunidad microbiana contenida en el sargazo favorece la producción de metano y al removerla el rendimiento disminuye. Otra posible explicación es que al esterilizar el sargazo se forman polifenoles que inhiben la DA. Esto indica que el esterilizar el sargazo no es deseable para producir biogás. Aunque la hidrólisis de la celulosa con el coctel CellicCTec2 tiene un efecto favorable en el rendimiento de metano con el sargazo estéril.

También se puede observar que el almacenar el sargazo (en este caso en frío) genera un incremento del 30% en el rendimiento de metano respecto al sargazo fresco. Esto se debe a que los microorganismos presentes en el sargazo lo degradaron a pesar de la baja temperatura, pero los hidrolizados no son consumidos posiblemente porque los microorganismos para ello si fueron inhibidos por la temperatura. Si bien un almacenamiento en frío no puede ser considerado en escala real, es un resultado digno de ser reportado.

El efecto del estiércol en el sargazo fresco lleva al incremento del 37% en el rendimiento de metano, lo cual es muy favorable. Utilizar estiércol como cosustrato hidrolítico puede incrementar el gasto en el proceso, ya que este se debe transportar de los sitios donde exista ganado vacuno. Se ha determinado que utilizar el estiércol en una primera digestión y posteriormente utilizar el digestato resultante como inóculo puede aportar microorganismos hidrolíticos originalmente presentes en el estiércol (Álvarez *et al.*, tesis de maestría en redacción). Esta opción es sin duda factible de aplicar en escala real.

Tabla 5.8. Rendimiento de metano de *S. natans* y *S. fluitans* en distintas condiciones y efectividad de los pretratamientos. En los casos control se agregó lodo metanogénico y los rendimientos nuevos representan el cambio en el rendimiento cuando se le agrega la condición experimental descrita.

Control	Rendimiento	Condición	Rendimiento nuevo	% cambio
Sargazo fresco	71±2	Estiércol bovino	97±4	37%
Sargazo fresco	71±2	Pretratamiento microbiano	70±2	-2%
Sargazo fresco	71±2	Almacenamiento	92±9	30%
Sargazo fresco	71±2	Secado y esterilizado	42±7	-42%
Sargazo almacenado	42±7	Estiércol bovino	101±3	10%
Sargazo estéril	42±7	Enzima CellicCTec2	71±14	69%
Sargazo estéril	42±7	Alginato liasa	45±5	7%

5.4.2. Estiércol como codigestión

El estiércol bovino, aparte de ser un cosustrato hidrolítico, puede ser utilizado en codigestión, para ayudar a balancear la relación C/N, dado su contenido de nitrógeno, reducir posibles efectos inhibitorios en el sargazo y proveer de biomasa más biodegradable al proceso de DA (Akila *et al.*, 2019). En la **figura 5.22** se presentan los resultados sin restarle la producción de metano del testigo (es decir, producción bruta o total), teniendo así el rendimiento de metano de los dos sustratos en codigestión. El sargazo se añadió en una masa 5 veces mayor que la del estiércol (5:1).

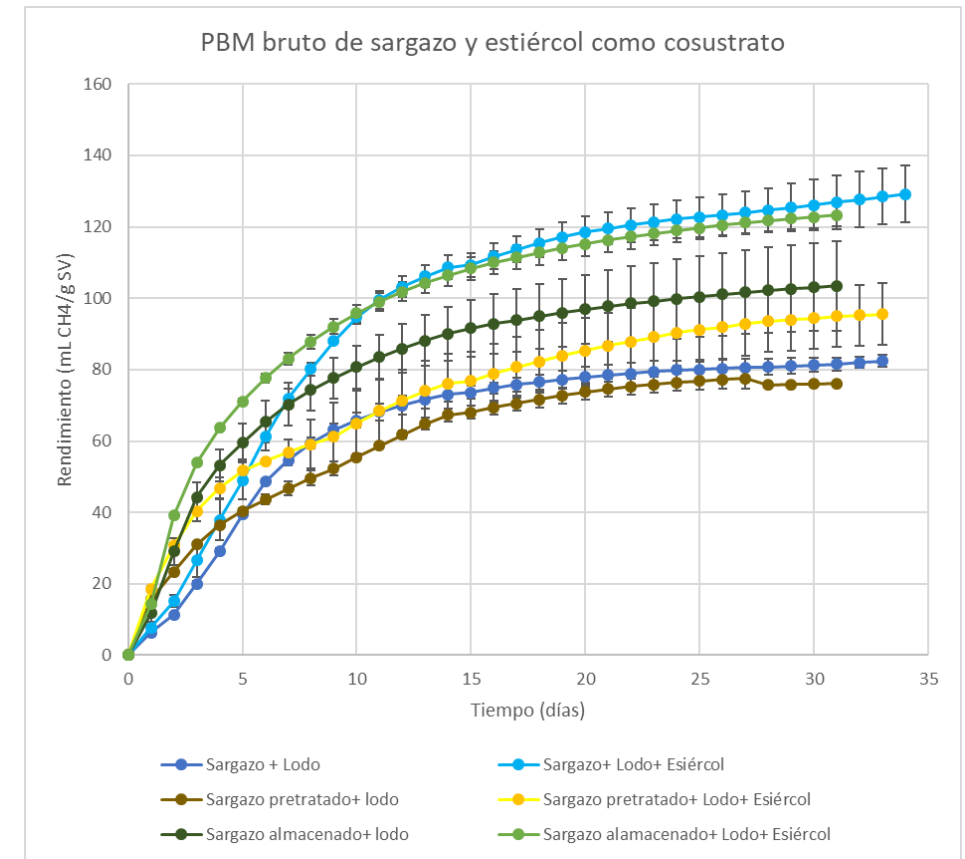


Figura 5.22. Curvas de rendimiento bruto de metano en la prueba de PBM de sargazo con estiércol en co-digestión (5:1). Azul oscuro: sargazo+ lodo, azul claro: sargazo+ lodo+ estiércol, café: sargazo pretratado+ lodo, amarillo: sargazo pretratado+ lodo+ estiércol, verde oscuro: sargazo almacenado+ lodo, verde claro: sargazo almacenado+ lodo+ estiércol.

Tabla 5.9. Análisis de PBM (bruto) de sargazo con y sin codigestión con estiércol: PBM bruto y tiempo en llegar al máximo y parámetros obtenidos por el criterio de Holliger, parámetros obtenidos al ajustar la ecuación de Gompertz modificada o tipo Michaelis-Menten (tasa de producción máxima, fase *lag* y R^2) y parámetros obtenidos al finalizar la prueba de PBM: pH, alcalinidad, relación alfa, DQO soluble y AGVs. En **negritas se ponen los datos cuando las curvas que se ajustaron con la ecuación tipo Michaelis-Menten.**

Contenido	PBM bruto (mL CH ₄ /g SV)	Tiempo	Tasa de producción máx. (mL CH ₄ /día)	Fase <i>lag</i>	R ²	pH final	Alcalinidad mg CaCO ₃ /L	Relación alfa	DQO soluble (mg O ₂ /L)	AGVs (mg/L)
Sargazo+lodo	76±2	17	21±2	0.1±0.3	0.99	7.6	7400	0.38	327	106
Sargazo+ lodo+ estiércol	119±4	20	26±0.4	0.06±0.2	0.99	7.4	10380	0.46	777	67
Sargazo pretratado+ lodo	75±2	21	14±1	NA	0.99	7.8	5840	0.43	1011	40
Sargazo pretratado+ lodo+ estiércol	90±9	24	16±2	NA	0.99	7.8	5840	0.45	943	0
Sargazo almacenado+ lodo	96±9	19	19±1	NA	0.99	7.2	6666	0.4	1311	102
Sargazo almacenado+ lodo+ estiércol	115±3	20	20±3	NA	0.99	7.3	7985	0.45	767	44

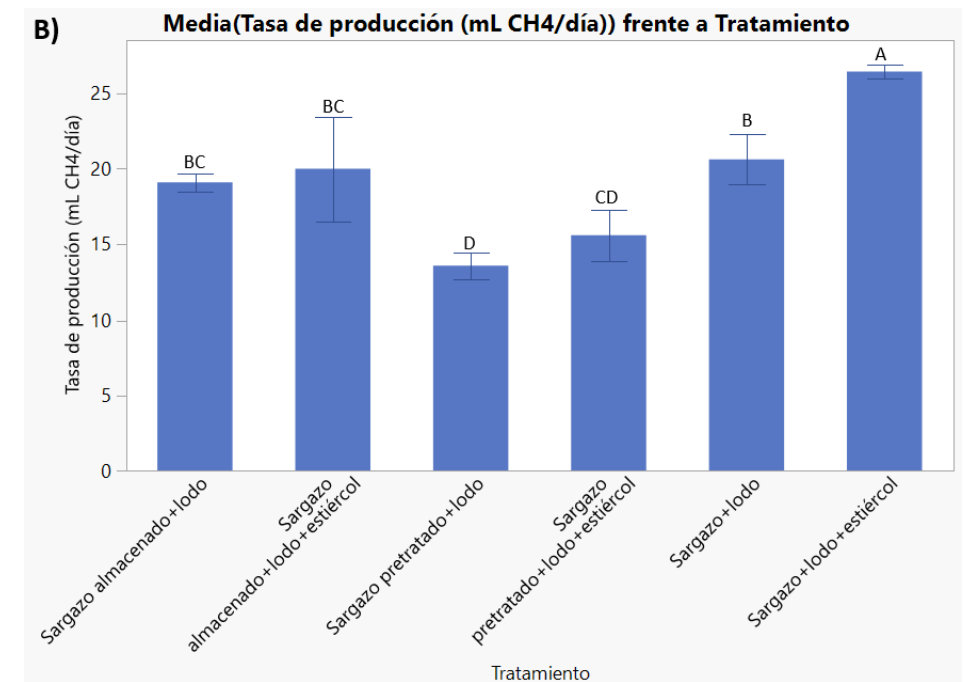
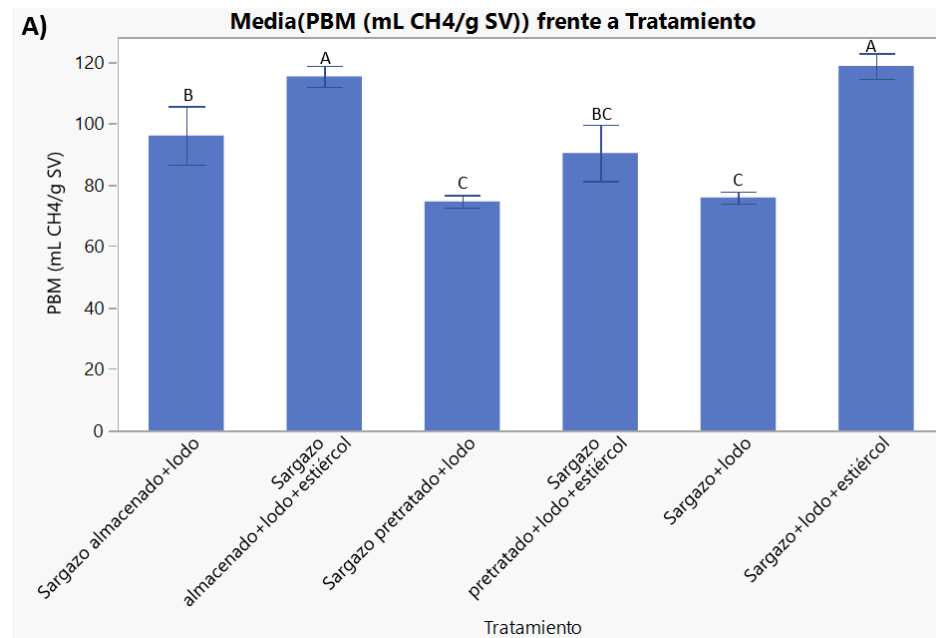


Figura 5.23. Diferencias significativas del rendimiento de metano y tasa de producción en las pruebas de PBM de sargazos con o sin codigestión con estiércol bovino, donde los tratamientos que presentan diferentes letras tienen diferencias significativas. **A)** Prueba Tukey del PBM en los tratamientos de la prueba. **B)** Prueba Tukey de la tasa de producción en los tratamientos de la prueba.

Cuando se le agrega estiércol bovino al sargazo fresco con lodo hay diferencias significativas tanto en el rendimiento de metano, como en la tasa de producción. Al agregarle estiércol al sargazo almacenado hay diferencias significativas en el PBM, pero no en la tasa de producción. Esto es diferente con el sargazo pretratado microbianamente, donde agregarle estiércol al tratamiento con lodo no genera diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros (**fig. 5.23**).

Se obtiene un incremento del 57% en el rendimiento de metano, cuando el sargazo fresco es sometido a codigestión con estiércol bovino (**tabla 5.10**) y se puede observar que, en todos los tratamientos, cuando se agrega estiércol la alcalinidad y la relación alfa se incrementan (**tabla 5.9**). Esto indica que la codigestión con estiércol ayuda a mejorar la estabilidad del proceso de DA.

Tabla 5.10. Rendimientos de metano en la DA del sargazo fresco, pretratado microbianamente y almacenado a 6°C con lodo y el efecto de la codigestión con estiércol bovino (5 sargazo:1 estiércol) en el PBM. Análisis del incremento en el rendimiento de metano al realizar la codigestión (% incremento).

Control	PBM bruto (mL CH ₄ /g SV)	PBM bruto con estiércol bovino (co-digestión) 5:1 (mL CH ₄ /g SV)	% incremento
Sargazo fresco + lodo	76±2	119±4	57
Sargazo pretratado + lodo	75±2	90±9	20
Sargazo almacenado + lodo	96±9	115±3	20

En los trabajos de Morrison y Gray (2017) y de Thompson (2021) y colaboradores se determinó que, para favorecer en mayor medida el rendimiento de metano al codigerir el sargazo con otros residuos orgánicos, se debe utilizar mayor proporción del cosustrato que de sargazo (1:2 y 1:3 respectivamente) y el rendimiento más bajo que obtuvieron fue al utilizar el sargazo en mayor proporción (3:1 y 3:1 respectivamente) (**tabla 2.5**). Esto indica que la codigestión de sargazo con estiércol bovino, con una proporción mayor de estiércol que de sargazo, incrementaría el rendimiento de metano. Sin embargo, la biomasa que se busca aprovechar es la del sargazo y al disminuir su proporción no se cumpliría el propósito principal.

CONCLUSIONES

El sargazo (*S. natans* y *S. fluitans*) es recalcitrante, su DA por sí sola no lleva a una producción de biogás deseable a nivel industrial, pero constituye una forma de utilizar una fracción de biomasa de sargazo, removiéndolo de las costas y obteniendo biogás y un digestato que puede ser utilizado como fertilizante.

Para mejorar el rendimiento de metano a partir de sargazo, sin aumentar el costo del proceso, es deseable realizar una codigestión. En este trabajo, al emplear estiércol bovino como codigestor, se aportan microorganismos hidrolíticos y se estabiliza el proceso de DA, permitiendo mejorar la productividad de metano a partir de sargazo. Con esto se generó un incremento del 57% en el rendimiento de metano obteniendo 76 mL CH₄/g SV del sargazo fresco contra 119 mL CH₄/g SV del sargazo fresco en codigestión 5:1 con estiércol.

Emplear consorcios microbianos incrementa la hidrólisis del sargazo, favoreciendo la productividad de metano, comprobado por la producción de metano inmediata obtenida en la DA del sargazo pretratado con el consorcio microbiano en comparación con el sargazo sin pretratamiento, que presenta una fase *lag* en la curva de producción de metano; sin embargo, no se incrementa el rendimiento de metano (70 y 71 mL CH₄/g SV sargazo pretratado microbianamente contra sargazo fresco).

Al identificar que la hidrólisis de los polisacáridos, como la celulosa y el alginato, es una limitante para la producción de metano a partir de sargazo, se decidió realizar pretratamientos biológicos enzimáticos para degradarlos y estudiar el efecto en el rendimiento de metano a partir de sargazo. Aunque, esto no es factible a nivel industrial por el costo que representan las enzimas y porque es necesario esterilizar la biomasa. Esta etapa no es factible, ya que requiere energía y además baja el rendimiento de metano por 42%, siendo de 71 mL CH₄/g SV en el sargazo fresco y 42 mL CH₄/g SV en el sargazo estéril.

Degradar celulosa dentro del sargazo utilizando la enzima CellicCTec2 incrementa el rendimiento de metano en un 69% respecto al sargazo sin pretratamiento con enzima (71 contra 42 mL CH₄/g SV). Esto confirma que es necesario favorecer la hidrólisis de este polisacárido para incrementar el rendimiento de metano a partir de sargazo.

La degradación del alginato dentro del sargazo es deseable, pero es un reto ya que requiere una enzima o microorganismo que pueda degradar el alginato específico contenido en *S. natans* y *S. fluitans*. En este trabajo se utilizó una enzima alginato liasa comercial, la cual no tuvo efecto en la hidrólisis ni en el rendimiento de metano del sargazo, obteniendo 45 mL CH₄/g SV con el sargazo estéril pretratado con enzima alginato liasa y 42 mL CH₄/g SV en el sargazo estéril sin pretratamiento.

PERSPECTIVAS

- Sería conveniente caracterizar el efecto de los microorganismos aislados del consorcio degradador de sargazo para encontrar los que tengan mayor incremento en el rendimiento de metano a partir de sargazo y secuenciarlos.
- Al identificar los microorganismos degradadores de sargazo es posible conocer las enzimas responsables de la degradación y producir extractos enzimáticos de bajo costo para pretratar el sargazo, evitando así que los microorganismos consuman el sustrato liberado durante el pretratamiento.
- Aislar microorganismos que produzcan enzimas que degraden el alginato específico de estas especies del sargazo utilizando herramientas de proteómica y metagenómica.
- Utilizar la técnica de FTIR-ATR de manera semicuantitativa para identificar los cambios en la biomasa del sargazo al ser sometida a pretratamientos.
- Mezclar sargazo con otros desechos, como residuos orgánicos municipales, para llevar a un proceso con mayor rendimiento de metano y de bajo costo.

REFERENCIAS

- Abraham, A., Mathew, A. K., Park, H., Choi, O., Sindhu, R., Parameswaran, B., ... y Sang, B. I. (2020). Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 301, 122725.
- Abdelgadir, A., Chen, X., Liu, J., Xie, X., Zhang, J., Zhang, K., ... & Liu, N. (2014). Characteristics, process parameters, and inner components of anaerobic bioreactors. *BioMed research international*, 2014.
- Akila, V., Manikandan, A., Sukeetha, D. S., Balakrishnan, S., Ayyasamy, P. M., y Rajakumar, S. (2019). Biogas and biofertilizer production of marine macroalgae: An effective anaerobic digestion of *Ulva* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101035.
- Akobi, C., Hafez, H., & Nakhla, G. (2016). The impact of furfural concentrations and substrate-to-biomass ratios on biological hydrogen production from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic anaerobic digester sludge. *Bioresource Technology*, 221, 598–606.
- Alzate-Gaviria, L., Domínguez-Maldonado, J., Chablé-Villacís, R., Olguin-Maciel, E., Leal-Bautista, R. M., Canché-Escamilla, G., ... & Tapia-Tussell, R. (2021). Presence of Polyphenols Complex Aromatic “Lignin” in *Sargassum* spp. from Mexican Caribbean. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(1), 6.
- Amador-Castro, F., García-Cayuela, T., Alper, H. S., Rodríguez-Martínez, V., & Carrillo-Nieves, D. (2021). Valorization of pelagic sargassum biomass into sustainable applications: Current trends and challenges. *Journal of Environmental Management*, 283, 112013
- Anastasakis, K., Ross, A., & Jones, J. (2011). Pyrolysis behaviour of the main carbohydrates of brown macro-algae. *Fuel*, 90(2), 598–607.
- Arango-Osorio, S., Vasco-Echeverri, O., López-Jiménez, G., González-Sánchez, J., y Isaac-Millán, I. (2019). Methodology for the design and economic assessment of anaerobic digestion plants to produce energy and biofertilizer from livestock waste. *Science of the Total Environment*, 685, 1169-1180.
- Ariunbaatar, J., Panico, A., Esposito, G., Pirozzi, F., & Lens, P. N. (2014). Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. *Applied Energy*, 123, 143–156.
- Ayala-Mercado, I. D., Weber, B., & Durán-García, M. D. (2022). Use of hydrothermal pretreatment to enhance biogas production from pelagic *Sargassum*. *BioEnergy Research*, 1-10.
- Barbot, Y. N., Al-Ghaili, H., y Benz, R. (2016). A review on the valorization of macroalgal wastes for biomethane production. *Marine Drugs*, 14(6), 120.
- Blair, E. M., Dickson, K. L., & O'Malley, M. A. (2021). Microbial communities and their enzymes facilitate degradation of recalcitrant polymers in anaerobic digestion. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 100–108.
- Borines, M. G., de Leon, R. L., y Cuello, J. L. (2013). Bioethanol production

- from the macroalgae *Sargassum* spp. *Bioresource Technology*, 138, 22-29.7.
- Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H. B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M. B., Markager, S., ... & Jensen, P. D. (2011). Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: biomass yield, methane production and combustion. *Bioresource technology*, 102(3), 2595-2604.
 - Corrales, L. C., Romero, D. M. A., Macías, J. A. B., & Vargas, A. M. C. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55-82.
 - Chen, S., Zhang, X., Singh, D., Yu, H., y Yang, X. (2010). Biological pretreatment of lignocellulosics: potential, progress and challenges. *Biofuels*, 1(1), 177-199.
 - Chen, Z., Hu, M., Zhu, X., Guo, D., Liu, S., Hu, Z., Xiao, B., Wang, J., & Laghari, M. (2015). Characteristics and kinetic study on pyrolysis of five lignocellulosic biomass via thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*, 192, 441-450. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.062>.
 - Cheng, F., & Brewer, C. E. (2021). Conversion of protein-rich lignocellulosic wastes to bio-energy: Review and recommendations for hydrolysis+ fermentation and anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 146, 111167.
 - Chikani-Cabrera, K. D., Fernandes, P. M. B., Tapia-Tussell, R., Parra-Ortiz, D. L., Hernández-Zárate, G., Valdez-Ojeda, R., & Alzate-Gaviria, L. (2022). Improvement in methane production from pelagic sargassum using combined pretreatments. *Life*, 12(8), 1214.
 - Davis, T. A., Volesky, B., & Vieira, R. H. S. F. (2000). *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. *Water research*, 34(17), 4270-4278.
 - Davis, D., Simister, R., Campbell, S., Marston, M., Bose, S., McQueen-Mason, S. J., ... & Tonon, T. (2021). Biomass composition of the golden tide pelagic seaweeds *Sargassum fluitans* and *S. natans* (morphotypes I and VIII) to inform valorisation pathways. *Science of The Total Environment*, 762, 143134.
 - Del Río, P. G., Gomes-Dias, J. S., Rocha, C. M., Romání, A., Garrote, G., & Domingues, L. (2020). Recent trends on seaweed fractionation for liquid biofuels production. *Bioresource Technology*, 299, 122613.
 - Di Filippo-Herrera, D. A., Hernández-Carmona, G., Muñoz-Ochoa, M., Arvizu-Higuera, D. L., & Rodríguez-Montesinos, Y. E. (2018). Monthly variation in the chemical composition and biological activity of *Sargassum horridum*. *Botanica Marina*, 61(1), 91-102.
 - Dibner, S., Martin, L., Thibaut, T., Aurelle, D., Blanfuné, A., Whittaker, K., ... & Siuda, A. N. (2022). Consistent genetic divergence observed among pelagic *Sargassum* morphotypes in the western North Atlantic. *Marine Ecology*, 43(1), e12691.
 - Dobrinčić, A., Balbino, S., Zorić, Z., Pedisić, S., Bursać Kovačević, D., Elez Garofulić, I., & Dragović-Uzelac, V. (2020). Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides. *Marine drugs*, 18(3), 168.
 - García-Sánchez, M., Graham, C., Vera, E., Escalante-Mancera, E., Álvarez-Filip, L., & van Tussenbroek, B. I. (2020). Temporal changes in the composition and biomass of beached pelagic *Sargassum* species in the Mexican Caribbean. *Aquatic Botany*, 167, 103275.
 - Fasahati, P., Woo, H. C., & Liu, J. J. (2015). Industrial-scale bioethanol production from brown algae: Effects of pretreatment processes on plant economics. *Applied Energy*, 139, 175-187.
 - Fujiwara, M., Koyama, M., Akizuki, S., Ban, S., & Toda, T. (2022). Influence of lignocellulosic components on the anaerobic digestibility of aquatic weeds: Comparison with terrestrial crops. *Industrial Crops and Products*, 178, 114576.
 - Gower, J., y King, S. (2019). Seaweed, seaweed everywhere. *Science*, 365(6448), 27-27.
 - Gujer, W., & Zehnder, A. J. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water science and technology*, 15(8-9), 127-167.
 - Holliger, C., Astals, S., de Lacroix, H. F., Hafner, S. D., Koch, K., & Weinrich, S. (2021). Towards a standardization of biomethane potential tests: a commentary. *Water Science and Technology*, 83(1), 247-250.
 - Iporac, L. A. R., Hatt, D. C., Bally, N. K., Castro, A., Cardet, E., Mesidor, R., ... & Collado-Vides, L. (2022). Community-based monitoring reveals spatiotemporal variation of sargasso inundation levels and morphotype dominance across the Caribbean and South Florida. *Aquatic Botany*, 182, 103546.
 - Jeoh, T., Cardona, M. J., Karuna, N., Mudinoor, A. R., y Nill, J. (2017). Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis—a review. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(7), 1369-1385.
 - Johnson, D. R., Franks, J. S., Oxenford, H. A., & Cox, S. A. L. (2020). Pelagic *Sargassum* prediction and marine connectivity in the tropical Atlantic. *Gulf and Caribbean Research*, 31(1), GCFI20-GCFI30.
 - Kim, H., Lee, C. G., & Lee, E. (2011). Alginate lyase: structure, property, and application. *Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 16(5).
 - Kim, S. S., Ly, H. V., Kim, J., Choi, J. H., & Woo, H. C. (2013). Thermogravimetric characteristics and pyrolysis kinetics of *Alga Sagarssum* sp. biomass. *Bioresource Technology*, 139, 242-248.
 - Koch, K., Hefner, S. D., Weinrich, S., Astals, S., & Holliger, C. (2020). Power and limitations of biochemical methane potential (BMP) tests. *Frontiers in Energy Research*, 8(ARTICLE), 63.
 - Labatut, R. A., Angenent, L. T., & Scott, N. R. (2011). Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresource technology*, 102(3), 2255-2264.

- Lalak, J., Kasprzycka, A., Martyniak, D., & Tys, J. (2016). Effect of biological pretreatment of *Agropyron elongatum* 'BAMAR' on biogas production by anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 200, 194-200.
- Li, Y., Chen, Y., y Wu, J. (2019). Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. *Applied Energy*, 240, 120-137.
- Lin, C. Y. (1993). Effect of heavy metals on acidogenesis in anaerobic digestion. *Water Research*, 27(1), 147-152.
- Liu, J., Yang, S., Li, X., Yan, Q., Reaney, M. J., & Jiang, Z. (2019). Alginate oligosaccharides: production, biological activities, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(6), 1859-1881.
- Lopresto, C. G., Paletta, R., Filippelli, P., Galluccio, L., de la Rosa, C., Amaro, E., ... & de Frias, J. A. (2022). Sargassum invasion in the caribbean: an opportunity for coastal communities to produce bioenergy based on biorefinery—an overview. *Waste and Biomass Valorization*, 1-25.
- López-Aguilar, H., Kennedy-Puentes, G., Gómez, J., Huerta-Reynoso, E., Peralta-Pérez, M. D. R., Zavala-Díaz de la Serna, F., & Pérez-Hernández, A. (2021). Practical and Theoretical Modeling of Anaerobic Digestion of Sargassum spp. in the Mexican Caribbean. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(4).
- López-Miranda, J. L., Rodolfo Silva, Gustavo A. Molina, Rodrigo Esparza, A. R. Hernandez-Martinez, J. Hernández-Carteño, and Miriam Estévez. (2020). Evaluation of a Dynamic Bioremediation System for the Removal of Metal Ions and Toxic Dyes Using Sargassum Spp. *Journal of Marine Science and Engineering* 8, no. 11: 899.
- López-Sosa, L. B., Alvarado-Flores, J. J., Corral-Huacuz, J. C., Aguilera-Mandujano, A., Rodríguez-Martínez, R. E., Guevara-Martínez, S. J., ... & Morales-Máximo, M. (2020). A Prospective Study of the Exploitation of Pelagic Sargassum spp. as a Solid Biofuel Energy Source. *Applied Sciences*, 10(23), 8706.
- Machado, C. B., Maddix, G. M., Francis, P., Thomas, S. L., Burton, J. A., Langer, S., ... & Tonon, T. (2022). Pelagic Sargassum events in Jamaica: Provenance, morphotype abundance, and influence of sample processing on biochemical composition of the biomass. *Science of the Total Environment*, 817, 152761.
- Manals-Cutiño, E., Penedo-Medina, M., & Giralt-Ortega, G. (2011). Análisis termogravimétrico y térmico diferencial de diferentes biomásas vegetales. *Tecnología Química*, 31(2), 180-190.
- 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(4), 100.
- Mackie, D. M., Jahnke, J. P., Benyamin, M. S., & Sumner, J. J. (2016). Simple, fast, and accurate methodology for quantitative analysis using Fourier transform infrared spectroscopy, with bio-hybrid fuel cell

- examples. *MethodsX*, 3, 128-138.
- Maneein, S., Milledge, J. J., Harvey, P. J., & Nielsen, B. V. (2021). Methane production from Sargassum muticum: effects of seasonality and of freshwater washes. *Energy and Built Environment*, 2(3), 235-242.
- Martínez-González, G. (2020). Sargazo: la irrupción atípica de un ecosistema milenario. *Salud Pública de México*, 61, 698-700.
- Marx, U. C., Roles, J., & Hankamer, B. (2021). Sargassum blooms in the Atlantic Ocean—From a burden to an asset. *Algal Research*, 54, 102188.
- McKennedy, J., y Sherlock, O. (2015). Anaerobic digestion of marine macroalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 1781-1790.
- Membere, E., y Sallis, P. (2018). Effect of temperature on kinetics of biogas production from macroalgae. *Bioresource Technology*, 263, 410-417.
- Millati, R., Wikandari, R., Ariyanto, T., Putri, R. U., y Taherzadeh, M. J. (2020). Pretreatment technologies for anaerobic digestion of lignocelluloses and toxic feedstocks. *Bioresource Technology*, 304, 122998.
- Milledge, J. J., & Harvey, P. J. (2016). Golden tides: problem or golden opportunity? The valorisation of Sargassum from beach inundations. *Journal of Marine Science and Engineering*, 4(3), 60.
- Milledge, J. J., Nielsen, B. V., Sadek, M. S., y Harvey, P. J. (2018). Effect of freshwater washing pretreatment on Sargassum muticum as a feedstock for biogas production. *Energies*, 11(7), 1771.
- Milledge, J. J., Maneein, S., Arribas López, E., & Bartlett, D. (2020). Sargassum Inundations in Turks and Caicos: Methane Potential and Proximate, Ultimate, Lipid, Amino Acid, Metal and Metalloid Analyses. *Energies*, 13(6), 1523.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mohammed, A., Rivers, A., Stuckey, D. C., & Ward, K. (2020). Alginate extraction from Sargassum seaweed in the Caribbean region: Optimization using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 245, 116419.
- Montiel, C., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., & Bárzana, E. (2016). Enhanced bioethanol production from blue agave bagasse in a combined extrusion–saccharification process. *Bioenergy Research*, 9, 1005-1014.
- Montingelli, M. E., Tedesco, S., & Olabi, A. G. (2015). Biogas production from algal biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 961-972.
- Morrison, M., & Gray, D. (2017). Anaerobic digestion economic feasibility study: generating energy from waste, sewage and sargassum seaweed in the OECS. *Caribbean Council.co*
- Muñoz, A. A., de Biodiversidad, I., y Ambiente, A. C. (2019). EL SARGAZO

EN EL CARIBE MEXICANO: DE LA NEGACIÓN Y EL VOLUNTARISMO A LA REALIDAD.

- Najafi, B., Ardabili, S. F., Shamshirband, S., & Chau, K. W. (2019). Development of a modified kinetic method for modelling of biogas produced from biomass.
- Nowakowski, D. J., Woodbridge, C. R., & Jones, J. M. (2008). Phosphorus catalysis in the pyrolysis behaviour of biomass. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 83(2), 197–204.
- Obata, O., Akunna, J. C., & Walker, G. (2015). Hydrolytic effects of acid and enzymatic pre-treatment on the anaerobic biodegradability of *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata* species of brown seaweed. *Biomass and Bioenergy*, 80, 140-146.
- Ody, A., Thibaut, T., Berline, L., Changeux, T., André, J. M., Chevalier, C., ... & Ménard, F. (2019). From In Situ to satellite observations of pelagic *Sargassum* distribution and aggregation in the Tropical North Atlantic Ocean. *PLoS one*, 14(9), e0222584.
- Oliveira, J. V., Alves, M. M., & Costa, J. C. (2015). Optimization of biogas production from *Sargassum* sp. using a design of experiments to assess the co-digestion with glycerol and waste frying oil. *Bioresource technology*, 175, 480-485.
- Orhororo, E. K., Ebunilo, P. O., & Sadjere, G. E. (2017). Experimental determination of effect of total solid (TS) and volatile solid (VS) on biogas yield. *American Journal of Modern Energy*, 3(6), 131-135.
- Orlando, M. Q., & Borja, V. M. (2020). Pretreatment of animal manure biomass to improve biogas production: A review. *Energies*, 13(14), 3573.
- Oxenford, H. A., Cox, S. A., van Tussenbroek, B. I., & Desrochers, A. (2021). Challenges of turning the *Sargassum* crisis into gold: current constraints and implications for the Caribbean. *Phycology*, 1(1), 27-48.
- Pérez-Rodríguez, N., Garcia-Bernet, D., & Dominguez, J. M. (2017). Extrusion and enzymatic hydrolysis as pretreatments on corn cob for biogas production. *Renewable Energy*, 107, 597-603.
- Ravanal, M. C., Sharma, S., Gimpel, J., Reveco-Urzuza, F. E., Øverland, M., Horn, S. J., & Lienqueo, M. E. (2017). The role of alginate lyases in the enzymatic saccharification of brown macroalgae, *Macrocystis pyrifera* and *Saccharina latissima*. *Algal research*, 26, 287-293.
- Rasmussen, H., Sørensen, H. R., y Meyer, A. S. (2014). Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. *Carbohydrate Research*, 385, 45-57.
- Robledo, D., Vázquez-Delfín, E., Freile-Pelegrín, Y., Vázquez-Elizondo, R. M., Qui-Minet, Z. N., & Salazar-Garibay, A. (2021). Challenges and opportunities in relation to *Sargassum* events along the Caribbean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 8, 699664.
- Rocamora, I., Wagland, S. T., Villa, R., Simpson, E. W., Fernández, O., & Bajón-Fernández, Y. (2020). Dry anaerobic digestion of organic waste: A review of operational parameters and their impact on process performance. *Bioresource technology*, 299, 122681.
- Rodríguez-Martínez, R. E., van Tussenbroek, B., y Jordán-Dahlgren, E. (2016). Afluencia masiva de sargazo pelágico a la costa del Caribe mexicano (2014–2015). *Florecimientos Algales Nocivos en México. Ensenada: CICESE, 2016*, 352-365.
- Rossignolo, J. A., Duran, A. J. F. P., Bueno, C., Martinelli Filho, J. E., Junior, H. S., & Tonin, F. G. (2022). Algae application in civil construction: A review with focus on the potential uses of the pelagic *Sargassum* spp. biomass. *Journal of Environmental Management*, 303, 114258.
- Saldarriaga-Hernandez, S., Hernandez-Vargas, G., Iqbal, H. M., Barcelo, D., & Parra-Saldivar, R. (2020). Bioremediation potential of *Sargassum* sp. biomass to tackle pollution in coastal ecosystems: Circular economy approach. *Science of the Total Environment*, 715, 136978.
- Saratale, R. G., Kumar, G., Banu, R., Xia, A., Periyasamy, S., & Saratale, G. D. (2018). A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. *Bioresource technology*, 262, 319-332.
- SEMARNAT 2003 NOM-004-SEMARNAT-2002 Mexican Standard: Environmental Protection – Sludge and Biosolids – Maximal Permissible Limits for Contaminants in Utilization and Final Disposition. *Federal Official Journal* (in Spanish), pp. 18–61.
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. *Bioresource technology*, 199, 76-82.
- Siripatana, C., Jijai, S., O-Thong, S., & Ismail, N. (2015). Modeling of Biomethane Production from Agro-Industrial Wastewaters with Constant Biomass: Analysis of Gompertz Equation. In *Int. Conf. Environ. Res. Technol* (pp. 1-6). School of Industrial Technology Universiti Sains Malaysia.
- Song, M., Pham, H. D., Seon, J., & Woo, H. C. (2015). Overview of anaerobic digestion process for biofuels production from marine macroalgae: a developmental perspective on brown algae. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32, 567-575.
- Soto, M., Vazquez, M. A., de Vega, A., Vilarino, J. M., Fernandez, G., y de Vicente, M. E. S. (2015). Methane potential and anaerobic treatment feasibility of *Sargassum muticum*. *Bioresource Technology*, 189, 53-61.
- Sudhakar, K., Mamat, R., Samykano, M., Azmi, W. H., Ishak, W. F. W., & Yusaf, T. (2018). An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 165-179.
- Sun, D. W. (2009). Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. *Elsevier Gezondheidszorg*.
- Tapia-Tussell, R., Avila-Arias, J., Domínguez Maldonado, J., Valero, D., Olguin-Maciel, E., Pérez-Brito, D., y Alzate-Gaviria, L. (2018). Biological

- pretreatment of mexican caribbean macroalgae consortiums using Bm-2 strain (*Trametes hirsuta*) and its enzymatic broth to improve biomethane potential. *Energies*, 11(3), 494.
- Tejada-Tejada, Pamela & Rodríguez-Rodríguez, Yaset & Rodríguez de Francisco, Luis & Perdomo, Omar & Boluda, Carlos. (2021). Lead, chromium, nickel, copper and zinc levels in Sargassum species reached the coasts of Dominican Republic during 2019: A preliminary evaluation for the use of algal biomass as fertilizer and animal feeding. *Tecnología y Ciencias del Agua*.
 - Thompson, T. M., Young, B. R., y Baroutian, S. (2019). Advances in the pretreatment of brown macroalgae for biogas production. *Fuel Processing Technology*, 195, 106151.
 - Thompson, T. M., Young, B. R., & Baroutian, S. (2020a). Pelagic Sargassum for energy and fertiliser production in the Caribbean: A case study on Barbados. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118, 109564.
 - Thompson, T. M., Young, B. R., & Baroutian, S. (2020b). Efficiency of hydrothermal pretreatment on the anaerobic digestion of pelagic Sargassum for biogas and fertiliser recovery. *Fuel*, 279, 118527.
 - Thompson, T. M., Young, B. R., & Baroutian, S. (2021). Enhancing biogas production from caribbean pelagic Sargassum utilising hydrothermal pretreatment and anaerobic co-digestion with food waste. *Chemosphere*, 275, 130035.
 - Trinanes, J., Putman, N. F., Goni, G., Hu, C., & Wang, M. (2021). Monitoring pelagic Sargassum inundation potential for coastal communities. *Journal of Operational Oceanography*, 1-12.
 - Uribe-Martínez, A., Guzmán-Ramírez, A., Arreguín-Sánchez, F., y Cuevas, E. (2020). El sargazo en el Caribe mexicano, revisión de una historia impensable. *Gobernanza y Manejo de las Costas y Mares ante la Incertidumbre*; Rivera-Arriaga, E., Azuz-Adeath, I., Cervantes Rosas, OD, Espinoza-Tenorio, A., Silva Casarín, R., Ortega-Rubio, A., et al., Eds, 743-768.
 - Valença, R. B., dos Santos, L. A., Firmo, A. L. B., da Silva, L. C. S., de Lucena, T. V., Santos, A. F. D. M. S., & Jucá, J. F. T. (2021). Influence of sodium bicarbonate (NaHCO₃) on the methane generation potential of organic food waste. *Journal of Cleaner Production*, 317, 128390.
 - Wagner, A. O., Lackner, N., Mutschlechner, M., Prem, E. M., Markt, R., & Illmer, P. (2018). Biological pretreatment strategies for second-generation lignocellulosic resources to enhance biogas production. *Energies*, 11(7), 1797.
 - Walsh, K. T., & Waliczek, T. M. (2020). Examining the quality of a compost product derived from sargassum. *HortTechnology*, 30(3), 331-336.
 - Wang, B., Nges, I. A., Nistor, M., & Liu, J. (2014). Determination of methane yield of cellulose using different experimental setups. *Water science and*

- technology*, 70(4), 599-604.
- Wang, M., y Hu, C. (2016). Mapping and quantifying Sargassum distribution and coverage in the Central West Atlantic using MODIS observations. *Remote Sensing of Environment*, 183, 350-367.
 - Wang, M., Hu, C., Barnes, B. B., Mitchum, G., Lapointe, B., y Montoya, J. P. (2019). The great Atlantic Sargassum belt. *Science*, 365(6448), 83-87.
 - Ward, A. J., Lewis, D. M., & Green, F. B. (2014). Anaerobic digestion of algae biomass: a review. *Algal Research*, 5, 204-214.
 - Wu, Y. N., Mattsson, M., Ding, M. W., Wu, M. T., Mei, J., y Shen, Y. L. (2019). Effects of different pretreatments on improving biogas production of macroalgae *Fucus vesiculosus* and *Fucus serratus* in Baltic Sea. *Energy & Fuels*, 33(3), 2278-2284.
 - Xu, N., Liu, S., Xin, F., Jia, H., Xu, J., Jiang, M. y Dong, W. (2019). Biomethane production from lignocellulose: biomass recalcitrance and its impacts on anaerobic digestion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 191.
 - Yasim, N. S. E. M., & Buyong, F. (2023). Comparative of experimental and theoretical biochemical methane potential generated by municipal solid waste. *Environmental Advances*, 11, 100345.
 - Zavala-Arceo, A., Cruz-Argüello, J. C., Figueroa-Torres, M. Z., & Yeladaqui-Tello, A. (2019). Determinación de las propiedades térmicas de un mortero modificado con sargazo como material alternativo en construcción. *Revista de Ingeniería Civil*, 1-9.
 - Zhang, L., Duan, F., & Huang, Y. (2015). Thermogravimetric investigation on characteristic of biomass combustion under the effect of organic calcium compounds. *Bioresource Technology*, 175, 174-181.
 - Zhang, R., Zhang, X., Tang, Y., & Mao, J. (2020). Composition, isolation, purification and biological activities of Sargassum fusiforme polysaccharides: A review. *Carbohydrate polymers*, 228, 115381.
 - Zhao, J., Liu, Y., Wang, D., Chen, F., Li, X., Zeng, G., & Yang, Q. (2017). Potential impact of salinity on methane production from food waste anaerobic digestion. *Waste Management*, 67, 308-314.
 - Zhu, H., Yang, J., & Xiaowei, C. (2019). Application of modified Gompertz model to study on biogas production from middle temperature co-digestion of pig manure and dead pigs. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 118, p. 03022). EDP Sciences.

Incremento de la tasa de hidrólisis para mejorar la productividad de metano a partir de sargazo

JIMENA BARRIENTOS PARÁS