



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

POSGRADO DE INGENIERÍA AGRÍCOLA
Y USO INTEGRAL DEL AGUA

CO-DIGESTIÓN ANAERÓBICA DE *Chlorella vulgaris* LIBRE DE ACEITE Y
GLICEROL COMO ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE METANO Y
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

TESIS

como requisito parcial para
obtener el grado de:

DOCTOR EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Presenta:

JOSÉ CARLOS MENESES REYES

Bajo la supervisión de: DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

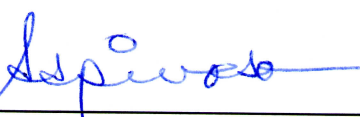
Chapingo, Estado de México, enero de 2017



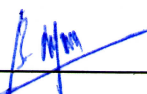
CO-DIGESTIÓN ANAERÓBICA DE *Chlorella vulgaris* LIBRE DE ACEITE Y GLICEROL COMO ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE METANO Y ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Tesis realizada por José Carlos Meneses Reyes bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN INGENIERÍA AGRÍCOLA
Y USO INTEGRAL DEL AGUA**

DIRECTOR: 
DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

ASESOR: 
DRA. GUADALUPE HERNÁNDEZ EUGENIO

ASESOR: 
DR. NAGAMANI BALAGURUSAMY

LECTOR EXTERNO: 
DR. FABIÁN ROBLES MARTÍNEZ

DEDICATORIA

A mi mamá que me ha acompañado toda mi vida, dándome su amor, consejos y apoyo para ser una mejor persona.

A mis hermanos Miguel Ángel, Rocío y Emmanuel que han estado en mi mente diariamente para poder superarme por cada paso que doy.

A mis Abuelos y a mi Tía Elvira que desde arriba me cuidan.

A mi novia Azalia Lozano Grande que ha estado conmigo en las buenas y en las malas que me ha dado su amor, aliento y apoyo en cada momento que me desánimo.

A mis amigos Vanessa, Denice, Joaquín y Larissa que me cuento con ellos para todo y tengo su amistad de por vida.

A mis compañeros de laboratorio que han estado durante todo el trayecto de mi doctorado ayudándome a cumplir este objetivo.

A mi gran y queridísimo Dr. Teodoro Espinosa Solares, que me dedicó su tiempo, enseñanzas, paciencia y buen humor para poder crecer y dar todo mi esfuerzo.

Y a cada una de las personas que directa o indirectamente hicieron posible esta tesis.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento para realizar mis estudios de doctorado, así como el apoyo de la concesión #CB-2011-167896-Z.

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Posgrado de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua por apoyo brindado durante estos cuatro años en mi formación académica.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT), por el apoyo económico para finalizar la tesis.

Al Dr. Teodoro Espinosa Solares por su tiempo, dedicación, guía y apoyo durante todo el trayecto de mi formación profesional para realización de la investigación y artículos científicos.

A la Dra. Guadalupe Hernández Eugenio por su valioso aporte, comprensión y confianza para la culminación de la tesis.

Al Dr. Nagamani Balagurusamy por la revisión y aporte fundamental en la mejora de esta investigación.

Al Dr. Fabián Robles Martínez por su valioso tiempo como lector externo, observaciones y aportaciones realizadas al presente trabajo.

A la M.C. María del Carmen González Rangel por su apoyo en la puesta en marcha de los digestores y ayuda en laboratorio.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de esta tesis obtuvo el título de Ingeniero Agroindustrial en el 2002 en la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, y el grado de Maestro en Ciencias en Botánica en el 2007 en el Colegio de Postgraduados campus Montecillos.

Trabajó en el INIFAP-CEVAMEX del 2002 en la línea de investigación de leguminosas con la M.C. Patricia Herrera en el proyecto enlatado de haba; durante el mismo año, colaboró con el Dr. Teodoro Espinosa Solares en el proyecto Análisis de mercado y la obtención de extracto de manzanilla para los productores de Cuijingo, Estado de México. A partir del 2007, trabajó en el Ingenio Azucarero La Abeja en Casasano, en el estado de Morelos, en el área de análisis y tratamiento de aguas para calderas. En el 2009, a la par, estuvo laborando en la empresa Sabritas S.A. de C.V., Cuautla Morelos en el área de control de calidad de cacahuete.

A partir del 2011, inició su investigación para obtener el grado de doctor en ciencias, periodo en el cual se ha dedicado al montaje de técnicas de laboratorio para el tratamiento de aguas. Ha asesorado a 4 alumnos de licenciatura y 2 de maestría con diversos temas de investigación. En el 2016, participó con su tema de tesis doctoral en el 6th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation en Albi, Francia.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	x
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes	3
1.2.1 Digestión anaeróbica	3
1.2.2 Rutas metabólicas	3
1.2.3 Sistemas de digestión anaeróbica	6
1.2.4 Microcosmos	8
1.2.5 Biorreactores continuos	8
1.2.6 Modelos matemáticos	9
1.2.7 Producción de biodiesel a partir de microalga	11
1.2.8 Tipos de microalga útiles para la producción de biodiesel	12
1.2.9 Residuos de la producción de biodiesel	14
1.2.10 Uso de residuos del biodiesel en la digestión anaeróbica	15
1.2.11 Co-digestión beneficios de la digestión anaeróbica	16
1.2.12 Producción de ácidos carboxílicos	17
1.3 Planteamiento del problema	20
1.4 Objetivos	21
1.4.1 Objetivo general	21
1.4.2 Objetivos particulares	21
1.5 Estrategia experimental	22
1.6 Literatura citada	24
CAPITULO 2. POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DE MICROALGA LIBRE DE ACEITE Y GLICEROL EN CO-DIGESTIÓN CON POLLINAZA	33
2.1 Resumen	33

2.2 Abstract	34
2.3 Introducción	35
2.4 Materiales y métodos	37
2.4.1 Procedimiento experimental	37
2.4.2 Métodos analíticos	39
2.4.3 Modelado y análisis estadístico	40
2.5 Resultados y discusión	41
2.5.1 Potencial bioquímico de metano	41
2.6 Conclusión	50
2.7 Literatura citada	51
CAPITULO 3. BIOCONVERSIÓN DE BIOMASA <i>Chlorella vulgaris</i>	
LIBRE DE ACEITE Y GLICEROL A METANO MEDIANTE	
CO-DIGESTIÓN ANAERÓBICA CONTINUA CON POLLINAZA	54
3.1 Resumen	54
3.2 Abstract	55
3.3 Introducción	56
3.4 Materiales y métodos	59
3.4.1 Puesta en marcha de los digestores y estabilización de microbioma	59
3.4.2 Procedimiento experimental	61
3.4.3 Métodos analíticos	61
3.4.4 Análisis estadístico	62
3.5 Resultados y discusión	62
3.5.1 Rendimiento de los digestores	62
3.5.2 Actividad metanogénica específica	65
3.6 Conclusión	70
3.7 Literatura citada	70
CAPITULO 4. PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS A PARTIR	
DE BIOMASA DE <i>Chlorella vulgaris</i> LIBRE DE ACEITE Y GLICEROL	
EN CO DIGESTIÓN CON POLLINAZA USANDO UNA	
SOBREALIMENTACIÓN	74
4.1 Resumen	74

4.2 Abstract	76
4.3 Introducción	77
4.4 Materiales y métodos	78
4.4.1 Historia de los digestores	78
4.4.2. Procedimiento experimental	79
4.4.3 Métodos analíticos	79
4.4.4 Tasa de producción volumétrica	80
4.5 Resultados y discusión	80
4.6 Conclusión	86
4.7 Literatura citada	87
CAPITULO 5. CONCLUSIONES	90
5.1 Recomendaciones	91

INDICE DE CUADROS

Tabla 2.1 Características físicas y químicas de los sustratos	37
Tabla 2.2 Proporción C:N, pH, ST, SV y composición química de los tratamientos	38
Tabla 2.3 Parámetros del modelo modificado de Gompertz determinados a partir de los datos experimentales	48
Tabla 2.4 Composición química del digestato después de los 90 días	49
Tabla 3.1 Cambios observados antes y después de los tratamientos	68
Tabla 3.2 Actividad metanogénica específica reportada para co-digestión anaeróbica continúa usando aves de corral, pollinaza, microalga y/o glicerol como sustrato	69
Tabla 4.1 Condiciones de extracción, concentración y tasa de producción volumétrica reportadas para ácidos carboxílicos.	86

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Interacciones microbianas en el proceso de degradación anaeróbica	6
Figura 1.2 Estrategia experimental	23
Figura 2.1 Rendimiento de metano acumulado y perfil de AGV durante el ensayo	42
Figura 2.2 Análisis de componentes principales basado en el perfil de AGV	43
Figura 2.3 Patrones de acetato, propionato y butirato a lo largo de la evaluación de PBM	44
Figura 2.4 Análisis de componentes principales basado en la composición química inicial y PBM	50
Figura 3.1 Puesta en marcha y estabilización de biorreactores continuos utilizando P como materia prima y la adaptación correspondiente a los tratamientos M-P y M-G-P	60
Figura 3.2 Cambios observados en las características fisicoquímicas de los biorreactores continuos antes y después de la adaptación a los tratamientos M-P y M-G-P, tomando P como control	63
Figura 3.3 Cambios observados en los AGV de los biorreactores continuos antes y después de la adaptación a los tratamientos M-P y M-G-P, tomando P como control	65
Figura 3.4 Cambios observados en la AME de los biorreactores continuos antes y después de la adaptación a los tratamientos M-P y M-G-P, tomando P como control	67
Figura 4.1 Cambios observados en las características físico-químicas y la AME de los biorreactores continuos antes y después de la sobrealimentación con las materias primas M-P y M-G-P, tomando P como control	82
Figura 4.2 Concentración y tasa de carga orgánica de los ácidos carboxílicos de los biorreactores continuos antes y después de la sobrealimentación con las materias primas M-P y M-G-P, tomando P como control	84

ANAEROBIC CO-DIGESTION OF OIL-EXTRACTED *Chlorella vulgaris* AND GLYCEROL AS AN ALTERNATIVE FOR METHANE AND CARBOXYLIC ACID PRODUCTION

CO-DIGESTIÓN ANAERÓBICA DE *Chlorella vulgaris* LIBRE DE ACEITE Y GLICEROL COMO ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE METANO Y ÁCIDOS CARBOXÍLICOS.

José Carlos Meneses-Reyes¹, Teodoro Espinosa-Solares²

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad técnica usando microalga *Chlorella vulgaris* extraída de aceite (M) y glicerol (G) en co-digestión con pollinaza (P). Las diferentes proporciones de materia prima M (0 - 30%), G (0 - 3%) y P (67 - 100%) fueron investigadas para determinar la mejor condición en co-digestión bajo condiciones mesofílicas. Según el modelo de Gompertz modificado, se obtuvo el mejor potencial bioquímico de metano (PBM) (131.1 mL CH₄ g^{SValimentados}⁻¹) con la triple co-digestión (M-G-P) en una proporción de 30:3:67. Dando seguimiento al estudio, tres mezclas fueron probadas para aumentar la productividad en digestión anaeróbica, usando estado estacionario en reactores de tanque agitado continuo (CSTR, siglas en inglés). Los tratamientos combinados de M-G-P fueron los siguientes: 0:0:100, 30:0:70 y 30:3:67, estos fueron definidos en base a los resultados de las pruebas de PBM. La mejor actividad de metano específica (AME) estadísticamente fue 30:3:67 con 270 mL CH₄ g^{SVañadidos}⁻¹, esto confirmó el resultado de PBM obtenido con CSTR. Los CSTR fueron perturbados con una sobrealimentación, el substrato pasó de 3 % sólidos totales (ST) con 30 días tiempo de retención hidráulica (TRH) al 14 % ST con 20 días TRH durante 11 días, esto generó ácidos carboxílicos de cadena media. El tratamiento 30:3:67 obtuvo altas concentraciones de acetato (7.54 g L⁻¹) y propionato (3.3 g L⁻¹), producidos a un pH 7.3 y una tasa de producción de 0.68 g L⁻¹ d⁻¹ y 0.3 g L⁻¹ d⁻¹ respectivamente. Este resultado mostró que la producción de metano y ácidos carboxílicos pueden ser obtenidos a partir de residuos de microalga.

Palabras clave: PBM, modelo Gompertz, CSTR, perturbación, sobrealimentación

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the technical feasibility of using both oil-extracted microalgae *Chlorella vulgaris* (M) and glycerol (G) in co-digestion with chicken litter (CL). Different feedstock ratios of M (0 - 30 %), G (0 - 3 %) and CL (67 - 100 %) were investigated to determine the best co-digestion condition under mesophilic conditions. According to the modified Gompertz model, the best biochemical methane potential (BMP) (131.1 mL CH₄ g^{Vsfed}⁻¹) was obtained with triple co-digestion (M-G-CL) at a ratio of 30:3:67. In a follow-up study, three mixes were tested to increase the anaerobic digestion productivity using steady state, continuously stirred tank reactors (CSTR). The combined M-G-CL treatments were as follows: 0:0:100, 30:0:70 and 30:3:67, which were defined based on the BMP test results. The best specific methane activity (SMA) statistically was 30:3:67 with 270 mL CH₄ g^{Vsadded}⁻¹, confirming the BMP result obtained with CSTR. The CSTRs were disturbed with an overfeed. The substrate went from 3 % total solids (TS) at 30 days of hydraulic retention time (HRT) to 14 % TS at 20 days HRT for 11 days, generating medium-chain carboxylic acids. The 30:3:67 treatment obtained the highest concentrations of acetate (7.54 g L⁻¹) and propionate (3.3 g L⁻¹), produced at pH 7.3 and a production rate of 0.68 g L⁻¹ d⁻¹ and 0.3 g L⁻¹ d⁻¹ respectively. This result showed that production of methane and carboxylic acids can be obtained from microalgae residues.

Keywords: BMP, Gompertz model, CSTR, disturbance, overfeeding

¹Author of thesis, ²Director of thesis

CAPITULO 1.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Introducción

El objetivo principal de este trabajo fue explorar la influencia de diferentes proporciones de microalga *Chlorella vulgaris* y glicerol en co-digestión con pollinaza sobre la actividad metanogénica específica y la producción de ácidos carboxílicos bajo condiciones mesofílicas. Para tal fin se realizó la evaluación del potencial bioquímico de metano (PBM) utilizando diferentes proporciones de biomasa libre de aceite de microalga con glicerol y pollinaza. Los mejores tratamientos se llevaron a la producción de biorreactores para corroborar si los mejores rendimientos de PBM podrían dar los mejores valores de la actividad metanogénica específica (AME). Adicionalmente se evaluó la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) como alternativa para la producción de ácidos carboxílicos. En ese sentido el documento está dividido en 4 capítulos. En el primero se presentan conceptos generales relacionados con los procesos microbianos estudiados. En el segundo se muestran los resultados de la evaluación del PBM de la triple co-digestión; en el cual se destaca que la máxima producción de metano se logra empleando una proporción de microalga (M) – glicerol (G) – pollinaza (P) 30:3:67 seguido de M – P 30:70 superando 15.8 % y 14.5 % con respecto a la pollinaza. En el capítulo tercero se aborda el estudio, en condiciones de alimentación continua, de la AME de los dos mejores tratamientos obtenidos por PBM. Los resultados de la evaluación de AME fueron similares a los obtenidos en PBM; los valores máximos también fueron para M-G-P 30:3:67 seguido de M-P 30:70 superando 58.6 % y 35.6 % con respecto al testigo. En el capítulo cuarto se muestran los resultados sobre la producción inducida de ácidos carboxílicos a través de una sobrealimentación para los mejores tratamientos.

Los capítulos 2 al 4 se presentan a manera de artículos científicos. En ese sentido en cada uno de ellos presenta el estado del arte y la contribución que hace al

campo del conocimiento, materiales y métodos, discusión de resultados y conclusiones.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Digestión anaeróbica

La digestión anaeróbica (DA) está compuesta por una serie de procesos donde los microorganismos metabolizan y estabilizan material biodegradable. Este proceso contribuye en la estabilización, reducción potencial de contaminación y de gases de invernadero. Durante la degradación de estos residuos orgánicos se produce biogás. El biogás está compuesto por una mezcla de compuestos gaseosos, principalmente metano, dióxido de carbono, monóxido de carbono, oxígeno, nitrógeno, amoníaco, hidrógeno, compuestos de sulfuro (Ali Shah et al., 2014; Almeida et al., 2011; Campanaro et al., 2016; Schirmer et al., 2014; Zhen et al., 2016). Estos productos generados durante la DA se realizan por interacciones microbianas simbióticas o interacciones comensalistas. Estas interacciones implican muchas especies bacterianas diferentes, tales como bacterias hidrolíticas, formadoras de ácido, acetogénicas y metanogénicas (Ali Shah et al., 2014; Almeida et al., 2011; Campanaro et al., 2016; Ellis et al., 2012; Gonzalez-Fernandez et al., 2015).

1.2.2 Rutas metabólicas

La DA se divide en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Estas etapas son ejecutadas por varias comunidades microbianas extremadamente especializadas y complejas (Campanaro et al., 2016; Zhang et al., 2016).

En la primera etapa, las partículas orgánicas (como celulosa o hemicelulosa) o coloides orgánicos (como proteínas) o grasas, se descomponen mediante enzimas extracelulares del grupo de hidrolasas (amilasas, proteasas y lipasas), producidas por bacterias hidrolíticas, obteniendo monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos (Ali Shah et al., 2014; Almeida et al., 2011; Batstone et al., 2002).

La velocidad de proceso de hidrólisis depende de parámetros como: el tamaño de partícula, pH, producción de enzimas, difusión y adsorción de enzimas. El

grupo de bacterias anaeróbicas que realizan la hidrólisis principalmente son: *Streptococcus* y *Enterobacterium* (Ali Shah et al., 2014).

En la segunda etapa, la acidogénesis se realiza por bacterias acidificantes. Estas bacterias convierten las moléculas hidrolizadas en ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, lactato, acético, propiónico, butírico y pentanoico), ácidos grasos de cadena larga, alcoholes (metanol, etanol), aldehídos, dióxido de carbono e hidrógeno. En esta misma etapa se generan los olores desagradables producidos por el amoníaco y el sulfuro de hidrógeno. La acidogénesis se puede dividir en dos tipos: hidrogenación y deshidrogenación. La vía básica de transformación pasa a través de acetatos, CO_2 e H_2 (Ali Shah et al., 2014; Almeida et al., 2011; Batstone et al., 2002).

Las bacterias facultativas anaerobias de la fase ácida crean condiciones favorables para el desarrollo de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus* o *Flavobacterium*, utilizando oxígeno introducido accidentalmente en el proceso (Ali Shah et al., 2014).

En la tercera etapa, en el proceso de la acetogénesis se produce ácido acético a través de la oxidación de ácidos grasos de cadena corta o alcoholes, o a través de la reducción del CO_2 , usando hidrógeno como donador de electrones para la reacción (Almeida et al., 2011). Las bacterias que están presentes en este proceso son las del género *Syntrophomonas* y *Syntrophobacter*. Las bacterias como *Methanobacterium suboxydans* explican la descomposición del ácido pentanoico al ácido propiónico, mientras que *Methanobacterium propionicum* explica la descomposición del ácido propiónico al ácido acético. Como resultado de la acetogénesis, se libera hidrógeno, que exhibe efectos tóxicos sobre los microorganismos que llevan a cabo este proceso. Por lo tanto, una simbiosis es necesaria para las bacterias acetogénicas con bacterias de metano autotróficas que utilizan hidrógeno, en lo sucesivo denominado síntrofia (Ali Shah et al., 2014; Batstone et al., 2002).

En la cuarta y última etapa se realiza la metanogénesis que consiste en la producción de metano mediante poblaciones microbianas denominadas arqueas. Las arqueas producen el metano a partir de ácido acético, H_2 , CO_2 y formato y metanol, metilamina o sulfuro de dimetilo (Ali Shah et al., 2014; Almeida et al., 2011; Batstone et al., 2002).

Las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas producen metano a partir de H_2 y CO_2 . Las arqueas metanogénicas acetotróficas (Methanosarcinales) producen metano a partir de acetato (Ali Shah et al., 2014).

En los metanogénicos existen diferentes formas morfológicas como son: cocos (Methanococcus), barras (Methanobacterium), pequeñas barras (Methanobrevibacter), espirilos (Methanospirillum), sarcina (Methanosarcina), y filiformes (Methanothrix). El tamaño de estos microorganismos oscila entre 0.3 y 7.4 μm (Ali Shah et al., 2014).

En resumen, debido a la complejidad de los procedimientos y reacciones específicas en la DA, intervienen o interactúan por lo menos 11 grupos microbianos (Figura 1), así como diversas rutas metabólicas como son: glucólisis o vía Entner-Doudoroff en piruvato, Stickland de alanina y glicina (Batstone et al., 2002), fermentación anaeróbica (láctica, alcohólica, acética, butírica, propiónica, ácido-mixta) y fermentación aeróbica (aerobios facultativos) ambas a partir de piruvato (Biebl et al., 1999; Kótai et al., 2013; Viana et al., 2012), hidrogenotrófica, homoacetogénica, acetoclástica, metilotrófica, metil reducción, aceto-sintrófica, metanogénica (Stams et al., 2003; Welander & Metcalf, 2005), sulfato reducción (Bradley et al., 2011).

degradación de sustrato y evitar la caída de pH por la hidrólisis. Este proceso se realiza por separado evitando el riesgo de tener una perturbación, contrario a los digestores de una etapa (Liu et al., 2007; Ward et al., 2008). Esta ventaja es una desventaja, ya que rompe la relación sintrófica entre bacterias y metanógenos, causando inhibición en un digestor acidificado (Andriani et al., 2014; Mao et al., 2015). Los biorreactores de dos etapas son los más eficientes por la capacidad de degradar mayor carga orgánica y tener un proceso biológico más estable y mayor tasa de producción de metano. En el caso de los digestores con múltiples etapas, son más costosos de construir y operar (Ward et al., 2008).

La alimentación de un digestor se establece en la puesta en marcha. El digestor puede ser alimentado con uno o más sustratos en forma discontinua (batch), semicontinua o continua. Los digestores alimentados de forma discontinua o batch, son llenados hasta a su volumen de trabajo, cerrados y sellados. El tiempo de vida útil es hasta degradarse la materia orgánica (Mao et al., 2015; Ward et al., 2008). La alimentación sólo se realiza una vez, la distribución de nutrientes y metabolitos es desigual para una eficiente degradación. La fluctuación de gas y rendimiento disminuyen con respecto al tiempo. Los digestores discontinuos son usados con fines de investigación para estimar el potencial bioquímico de metano, pero son cada vez más comunes en el uso comercial (Labatut et al., 2011; Zhang et al., 2016).

En un digestor semicontinuo y continuo, la alimentación es diaria y la materia degradada se elimina del sistema, normalmente son agitados para mezclar el sustrato y distribuir uniformemente los nutrientes con el fin de generar mayor producción de biogás (Appels et al., 2008). Comercialmente los digestores continuos con agitación son los más usados en plantas de desechos orgánicos (Appels et al., 2008; Mao et al., 2015; Ward et al., 2008).

1.2.4 Microcosmos

La instalación y puesta en marcha de un digestor generador de metano conlleva un impacto económico; el no anticipar el rendimiento, el tipo de sustrato, operatividad del equipo puede lograr que el desempeño sea bajo o quede fuera de funcionamiento. Por tal motivo, se han desarrollado métodos experimentales escala laboratorio a largo y a corto plazo con el fin de conocer la factibilidad y viabilidad de los sustratos usados y el equipo. Los experimentos de digestores anaeróbicos a largo plazo (1-2 años), se realizan en digestores de flujo semicontinuo o continuo principalmente. Los ensayos a corto plazo (1-3 meses), se realizan generalmente en botellas o recipientes para determinar el rendimiento de metano, la biodegradabilidad de los sustratos y el potencial bioquímico de metano (PBM) (Gunaseelan, 1997; Labatut et al., 2011; Ramaraj et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Los microcosmos son digestores (botella o recipiente) en pequeña escala, utilizados para los ensayos de PBM. Los recipientes utilizados deben tener un volumen idóneo para la homogeneidad del sustrato. El volumen del microcosmo puede ser de 100 mL aproximadamente para contener sustratos homogéneos. Microcosmos con volúmenes de 500 mL a 2 L son adecuados para contener sustratos heterogéneos. Para mayor reproducibilidad se recomienda un recipiente con un volumen total aproximado de 500 a 1 L para medir el biogás volumétrico y manométrico. Los recipientes deben ser cerrados con septos de goma y herméticos. El septo es conectado con tubería a un medidor de biogás asegurando evitar pérdidas de biogás. La detección de fugas durante la prueba conduce automáticamente al rechazo de los resultados de la prueba, ya que no se pueden tomar medidas correctivas (Holliger et al., 2016).

1.2.5 Biorreactores continuos

En los sistemas semicontinuos y continuos están los biorreactores anaeróbicos de alta velocidad (high-rate) son una mejora importante con respecto a los de velocidad normal. El lodo es calentado por intercambiadores de calor externo

principalmente y mezclado completamente por recirculación o bombeo para tener contacto con los microorganismos, el lodo crudo se espesa y la alimentación es uniforme y continua o en intervalos regulares (Gunaseelan, 1997). Todos estos elementos combinados crean un entorno uniforme, donde el volumen del tanque puede ser reducido para mejorar la estabilidad y eficiencia del proceso (Appels et al., 2008).

El digestor de alta velocidad más usado para aguas residuales y desechos animales en estado líquido con alto contenido de sólidos suspendidos es el biorreactor continuo (Mao et al., 2015). Este tipo de biorreactor se alimenta diariamente con influente de 3-8 % de sólidos totales (ST) y se desecha la misma cantidad de efluente (Gunaseelan, 1997). El principal problema de este tipo de biorreactor, es que la biomasa activa es eliminada constantemente del sistema dando lugar a largos tiempos de retención (Angelidaki et al., 2011; Lyberatos & Skiadas, 1999; Mao et al., 2015).

Los tiempos de retención hidráulicos (TRH) de los biorreactores continuos son alrededor de 15 a 30 días en condiciones mesofílicas y de 10 a 20 días en condiciones termofílicas. Los tiempos de retención largos benefician la hidrólisis de la materia orgánica en partículas de estructura compleja como lignocelulosa en el estiércol (Angelidaki et al., 2011). Los biorreactores continuos de dos etapas son más usados que los de una etapa debido al bajo costo de capital que requiere, un sistema de diseño y operación simple (Mao et al., 2015).

1.2.6 Modelos matemáticos

Los modelos matemáticos permiten la representación de los aspectos principales de un sistema biológico. Mejora la comprensión del sistema, la formulación y validación. Predicen el comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones, reduciendo, en consecuencia, los requerimientos de información experimental, costos, riesgos y tiempo. La correcta evaluación y aplicación de modelos matemáticos en bioprocesos debe seguir varias etapas, si el objetivo final del

enfoque es generar herramientas útiles para mejorar la comprensión del proceso o predecir el comportamiento del sistema (Donoso-Bravo et al., 2011).

Los modelos matemáticos más usados para procesos bioquímicos en DA son los cinéticos básicos y el modelo de digestión anaeróbica No. 1 (ADM1). Para el caso de los modelos cinéticos se basan en el crecimiento microbiano y las tasas de consumo de sustrato que dependen de una concentración de sustrato limitante del crecimiento. Con el supuesto que los nutrientes son suficientes en el sustrato y se pueden incluir expresiones de inhibición (Xie et al., 2016).

Un modelo cinético usado en la DA es el modelo de Gompertz. Este modelo es una función sigmoideal y describe el crecimiento microbiano, el cual no incluye el consumo de sustrato como modelo basado en la ecuación de Monod, además aplica para materia viva que crece con sucesivos retardos, crecimientos y fases asíntotas, así como para evaluar el PBM. El ajuste de la curva de crecimiento microbiano es descrito por tres parámetros: la tasa máxima de crecimiento específico, μ_m es definida como la tangente en el punto de inflexión; la fase lag (λ) es definida como la intercepción del eje X de esta tangente; y la asíntota [$A = \ln(N_\infty/N_0)$] es el máximo valor alcanzado (Meneses-Reyes et al., 2017; Xie et al., 2011; Zhao et al., 2016; Zwietering et al., 1990).

Cabe señalar, que algunos sustratos contienen alto contenido de AGV inicial y el uso de modelos de primer orden y como el modelo de Gompertz puede ser inadecuado para determinar la cinética de reacción. Lo cual se recomienda un modelo de primer orden agrupado dual puede proporcionar un mejor ajuste para los datos (Xie et al., 2016).

El modelo ADM1 fue desarrollado por el grupo de trabajo de modelado de IWA AD, posiblemente sea el modelo más aplicado en el área de investigación para el uso de la DA. El modelo explica los sustratos complejos a través de sus componentes principales (Batstone et al., 2002; Rivera-Salvador et al., 2014). El

ADM1 incluye 19 procesos bioquímicos, de los cuales 4 ecuaciones captan la degradación de la materia de la partícula, 8 ecuaciones describen la degradación de la materia soluble y 7 ecuaciones representan las concentraciones de biomasa; 6 equilibrios ácido / base en asociación con el cálculo del pH; 3 procesos de transferencia gas-líquido (CH_4 , CO_2 , H_2), inhibiciones, y una serie de variables, de las cuales 12 variables representan partículas, 24 variables representan solubilidad y 3 variables representan gases (Appels et al., 2008; Batstone et al., 2002; Parker, 2005; Rivera-Salvador et al., 2014; Xie et al., 2016).

Además de los modelos matemáticos, existe métodos estequiométricos como la ecuación de Buswell's, el cual se basa en la reacción de degradación para predecir el rendimiento de metano teórico o el PBM (Bilgili et al., 2009; Konstandt, 1977; Labatut et al., 2011; Sobotka et al., 1983; Ward et al., 2014). Independientemente del método teórico utilizado, su precisión depende de la composición del sustrato y la fracción biodegradable (Labatut et al., 2011).

1.2.7 Producción de biodiesel a partir de microalga

En la búsqueda de nuevos sustitutos energéticos, los combustibles renovables, rentables, sostenibles y amigables con el medio ambiente han recibido una atención especial (Oncel, 2013). El biodiesel es un combustible alternativo este es una mezcla de monoalquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga que se produce comercialmente de algunas fuentes comunes como la soja, girasol, cártamo, canola, palma y microalga (Demirbas & Fatih Demirbas, 2011; Kolesárová et al., 2011; Oncel, 2013; Razaviarani & Buchanan, 2015; Rétfalvi et al., 2016; Zhen et al., 2016).

Las microalgas pueden ser un ejemplo como fuente de energía renovable para la producción de biodiesel. Estas poseen un potencial sin un efecto adverso en el suministro de alimentos y otros productos agrícolas, además de contener una gran cantidad de lípidos (He et al., 2016; Neves et al., 2016; Oncel, 2013; Rétfalvi et al., 2016).

La producción de microalga se realiza en fotobiorreactores o en estanques abiertos, ésta se cosecha separando el agua de la biomasa por un método de separación ya sea por un proceso de floculación, sedimentación por gravedad, flotación, filtración o centrifugación. La biomasa obtenida es deshidratada y posteriormente se le extrae el aceite de forma ultrasónica o con disolventes químicos (acetona, hexano, cloroformo, metanol, cloroformo-metanol) (Neumann et al., 2015; Neves et al., 2016; Oncel, 2013; Suali & Sarbatly, 2012).

El aceite extraído está compuesto principalmente por triglicéridos, este se transesterifica de forma bioquímica usando un disolvente (metanol) y un catalizador (SrO). En el proceso de transesterificación se obtiene biodiesel y glicerol (Chisti, 2007). Ambos compuestos son colocados en un tanque de asentamiento, separando el glicerol crudo como co-producto y por otro flujo el biodiesel. El biodiesel es neutralizado con un álcali y lavado con agua, obteniendo como resultado la separación del biodiesel y metanol. Posteriormente en un secador, el biodiesel es secado para obtener un compuesto puro (Neves et al., 2016; Oncel, 2013; Siles López et al., 2009; Suali & Sarbatly, 2012).

La biomasa de microalga libre de aceite se procesa para la producción de etanol por fermentación o por proceso termoquímico mediante gasificación (Syngas), por pirólisis (bio char, producto gaseoso), licuefacción (bio-aceite), hidrogenación (biocombustible) o DA (metano) (Chen et al., 2013; Harun et al., 2011; Oncel, 2013; Suali & Sarbatly, 2012).

1.2.8 Tipos de microalga útiles para la producción de biodiesel

Las microalgas son un conjunto distinto de pequeños procariotas microscópicos acuáticos fotosintéticos y eucariotas, caracterizados por su habilidad para transformar la energía solar en biomasa (Tijani et al., 2015). El alto contenido de carbono y su eficiente fijación biológica de CO₂, hacen que sean una materia prima viable para la generación de biocombustibles y disminución del CO₂ atmosférico (Chisti, 2007; Demirbas & Fatih Demirbas, 2011; Oncel, 2013; Tijani

et al., 2015). Estos organismos cuenta con 200,000 especies existentes y 50,000 especies han sido definidas taxonómicamente (Tijani et al., 2015). Las microalgas se clasifican en tres clases: autótrofas, heterotróficas y mixotróficas. Las microalgas autótrofas contienen clorofila y aprovechan la luz y el metabolismo fotosintético (Chisti, 2007; Harun et al., 2011). En cambio, las microalgas heterotróficas son independientes de la fotosíntesis y consumen carbohidratos orgánicos como el glicerol y la glucosa como fuente primaria de energía metabólica. Las microalgas mixotróficas presentan características versátiles; son capaces de fijar el CO₂ a través de la fotosíntesis, siendo así como consumen los nutrientes orgánicos (Tijani et al., 2015). En las microalgas heterotróficas cultivadas se ha observado que son propensas a acumular lípidos en comparación a las fototróficas cultivadas de la misma especie. Un ejemplo son las células de *Chlorella sp.*; estas especies heterotróficas logran alcanzar hasta el 55.2 % de lípidos y las fototróficas sólo el 14.6 % (Tijani et al., 2015). Las principales especies comerciales que acumulan alta cantidad de lípidos para la producción de biodiesel son las especies: *Chlorella*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Nannochloropsis*, *Botryococcus* y *Spirulina* (Chisti, 2007; Demirbas & Fatih Demirbas, 2011; Oncel, 2013).

En la producción de biodiesel, la microalga *Chlorella* tiene gran potencial como materia prima debido a que contiene gran cantidad de lípidos (Suali & Sarbatly, 2012), se adapta a condiciones de cultivo heterotrófica y fototrófica (Tijani et al., 2015), en agua dulce o salada (Phukan et al., 2011). La microalga del género *Chlorella* la especie *vulgaris* tiene la mayor atención ya que cuenta con tasa de crecimiento rápido, alta productividad de biomasa (15-30 g m² d⁻¹) (Yang et al., 2015; Yuan et al., 2012), alto contenido de proteína (51-58 % base seca), lípidos (14-22 % base seca) (Sialve et al., 2009; Suai & Sarbatly, 2012) y tiene utilidad como alimento, suplemento alimenticio, cosmético entre otros usos (Oncel, 2013).

1.2.9 Residuos de la producción de biodiesel

Los principales residuos en la producción de biodiesel son la biomasa de microalga libre de aceite y el glicerol. La biomasa libre de aceite se obtiene de la extracción de aceite el cual aún contiene trazas de nutrientes como el almidón, proteína, baja celulosa y ausencia de lignina. En tanto que el glicerol es un co-producto de la transesterificación (Oncel, 2013). En diversas investigaciones han usado ambos sustratos como productos alternativos para la producción de etanol, hidrógeno o metano debido al aporte de carbono y nitrógeno que contienen ambos (Costa & de Moraes, 2011; Golueke et al., 1957; Morken et al., 2013; Oncel, 2013; Ramaraj et al., 2015).

El uso de microalga entera en la DA para la producción de metano puede generar más energía (25 MJ kg^{-1}), en lugar de biodiesel (6.6 MJ kg^{-1}) o etanol (1.79 MJ kg^{-1}). Además, se recupera hasta el 65 % de energía química almacenada de la biomasa (Hidaka et al., 2014; Ramaraj et al., 2015). Otro caso en el uso de la biomasa para la generación de electricidad, calor y poder mecánico mediante métodos termoquímicos que incluyen la combustión directa (Costa & de Moraes, 2011). La biomasa procesada puede ser útil como fertilizante dando un valor agregado extra al proceso general. También la porción de dióxido de carbono producido por la combustión o generación de biogás puede reciclarse para el cultivo de microalgas (Oncel, 2013).

El glicerol se usa para la producción de productos farmacéuticos, cosméticos, alimenticios. Por cada kilogramo de biodiesel producido, se genera aproximadamente 100 g de glicerol crudo como co-producto de la reacción de la transesterificación. Extrapolando la producción de glicerol se obtendrá una producción de 4,600,000 toneladas en el 2020 (Oncel, 2013). La producción de biodiesel no sólo se obtiene a partir de microalga sino también de la extracción de aceite vegetal y animal, y en la elaboración de jabones. Sin considerar, el costo adicional para su purificación ya que cuenta con compuestos tóxicos o

recalcitrantes (ácidos grasos de cadena larga). Por lo anterior, el glicerol será un excedente y contaminante en el futuro (Viana et al., 2012).

1.2.10 Uso de residuos del biodiesel en la digestión anaeróbica

La falta de interés en el uso de biomasa de microalga como una fuente alternativa para la producción de biogás, se debe principalmente a las dificultades que presenta como sustrato. Este sustrato puede reducir o inhibir la producción de biogás debido a la pared celular que es resistente a la degradación bajo condiciones anaeróbicas debido a la presencia de compuestos de celulosa o hemicelulosa y la baja relación carbono: nitrógeno (C:N) que afecta los procesos de fermentación (Dębowski et al., 2013).

La relación C:N óptima para una buena producción de biogás en digestores anaeróbicos oscila entre 20:1 y 30:1 (Montingelli et al., 2015). La microalga debido a su bajo contenido de carbono y alto contenido de proteína, el valor de la relación C:N es de 4.16 a 7.82 (Ward et al., 2014), este tiene un impacto directo en la disminución de la eficiencia en la producción de metano. Una relación C:N menor a 15, puede conducir a una mayor producción de amoníaco libre y una acumulación de ácidos grasos volátiles; estas condiciones provocan efectos tóxicos en los microorganismos metanógenos responsables en los procesos de fermentación de metano (Dębowski et al., 2013; Ward et al., 2014). Para aumentar la relación C:N se adiciona un sustrato rico en carbono orgánico (Dębowski et al., 2013; Morken et al., 2013; Ramos-Suárez & Carreras, 2014).

Los primeros autores que investigaron sobre la DA con biomasa de microalgas fueron Golueke et al. (1957), usando *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus*, siendo estas las especies más cultivadas para el tratamiento de aguas residuales. Yen and Brune (2007), trabajaron con microalga *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* en condiciones mesofílicas, obtenido un rendimiento de metano de 90-143 mL CH₄ gsv⁻¹, ellos mencionan que el rendimiento fue bajo debido a una relación C:N de 6.7, este rendimiento aumentó realizando una co-digestión, lo que provocó un

aumento en la relación C:N de 18. Debido a la baja relación C:N que tiene la microalga es escasa la información donde se trabaja sola en DA, por tanto la mayoría de las investigaciones usan la co-digestión. Es el mismo caso sucede con el glicerol, siendo mínima la literatura usando únicamente este compuesto en la DA, ya que su relación C:N es de 53.62 (Meneses-Reyes et al., 2017), excediendo la relación C:N óptima. Una investigación realizada por Amon et al. (2006), trabajaron glicerol puro analizando la producción de metano en un sistema batch en condiciones mesofílicas, estos autores obtuvieron un rendimiento de metano de 750 mL CH₄ g_{SV}⁻¹.

1.2.11 Co-digestión beneficios de la digestión anaeróbica

La codigestión es la combinación de dos o más residuos con diferentes características usados para la alimentación de un digestor; el cual tiene como objetivo aumentar la relación C:N y el rendimiento de biogás, mejorar el proceso de DA, ser rentable, ecológica y se pueden tratar muchos subproductos orgánicos no factibles por si solos (Labatut et al., 2011; Yen & Brune, 2007).

La relación C:N varía con respecto al sustrato, la combinación puede aumentar o disminuir su relación afectando el rendimiento de metano. Mezclar sustratos ricos en carbono logran aumentar dicha relación, por el contrario si son sustratos ricos en nitrógeno disminuye la relación C:N. Esto depende de las necesidades para lograr alcanzar la relación óptima 20-30:1, si existe sinergia entre sustratos el rendimiento de metano incrementará (Esposito et al., 2012). Esto se da en la investigación realizada por Yen and Brune (2007), ellos trabajaron con residuos de papel en co-digestión con microalga (*Scenedesmus* spp. y *Chlorella* spp.) en proporción 50:50, dichos autores obtuvieron un incremento del 50 % con una relación C:N de 20-25:1, con un rendimiento de 292 mL CH₄ g_{SV}⁻¹. Otro caso fue el uso de co-digestión con residuo de microalga de un proceso de extracción de aceite con desechos de rico en lípidos (grasa y aceite), el cual incrementó el rendimiento de metano a 540 mL CH₄ g_{SV}⁻¹ comparado al rendimiento de 150 mL CH₄ g_{SV}⁻¹ cuando se usó microalga sola (Park & Li, 2012). Similarmente, sucedió

un aumento en el rendimiento de metano del 4 % al 7 %, usando biomasa de *Chlorella* libre de aceite en co-digestión con desechos de glicerol del proceso de biodiesel (Ehimen et al., 2009). Un ejemplo más fue en el que un grupo de investigadores usó glicerol en co-digestión con desechos de pollo, ellos trabajaron una proporción 84.4:15.6 con una relación C:N de 16.1 obteniendo un rendimiento de metano de 480 mL CH₄ g_{SV}⁻¹, el cual aumentó la producción de metano hasta un 40 % con la adición de glicerol con respecto al testigo. Lo que indicó que las bacterias fueran capaces de co-digerir el glicerol de manera eficiente debido a la sinergia con los desechos de pollo generando un aumento en la producción de biogás (Chow et al., 2015).

1.2.12 Producción de ácidos carboxílicos

El proceso de DA se ha utilizado principalmente para la producción de metano. Sin embargo, el metano es un producto de bajo valor siendo una tecnología poco atractiva cuando el apoyo gubernamental está ausente. Una ventaja ante ello es el uso de otros productos de fermentación con gran impacto comercial como son los ácidos grasos volátiles (Spirito et al., 2014). Se ha comprobado que los AGV son precursores adecuados para la producción de biopolímeros (PHA), acidulantes, conservadores y aromatizantes, y otros productos valiosos como biocombustibles, alcoholes, aldehídos o cetonas (Grootscholten et al., 2013b; Khan et al., 2016; Sarkar et al., 2016). Los AGV están formados por dos grupos que se clasifican por la longitud de cadena. Los ácidos grasos de cadena corta son carboxilatos de 2 a 6 carbonos, los ácidos grasos de cadena media son carboxilatos que contienen de 6 a 12 carbonos (Grootscholten et al., 2013b). Los ácidos grasos de cadena media se forman a partir de los ácidos de cadena corta por elongación de cadena (Agler et al., 2011). Los ácidos carboxílicos son ácidos orgánicos débiles con al menos un grupo carboxilo. En este texto, se denominarán carboxilatos para incluir tanto las especies no disociadas como disociadas (ejemplo: ácido acético como acetato, ácido propiónico como propionato, ácido butírico como butirato, etc.) (Spirito et al., 2014).

La producción de estos compuestos se realiza durante la etapa de la acidogénesis, las bacterias acidogénicas convierten los productos de la etapa de hidrólisis inicial en hidrógeno, CO₂, acetato y ácidos carboxílicos (Franke-Whittle et al., 2014; Khan et al., 2016; Wang et al., 2015). Para la acumulación de estos ácidos es necesario interrumpir o disminuir el proceso de las bacterias metanogénicas (Khan et al., 2016; Vasudevan et al., 2014). Los sustratos más usados para el alargamiento de cadena son el acetato (C2), lactato y etanol para producir carboxilatos con carbonos pares como el butirato (C4) y el caproato (C6) (Agler et al., 2011; Grootscholten et al., 2014; Spirito et al., 2014). La producción de carboxilatos con cadenas impares de carbono como valerato (C5) y heptanoato (C7) se realiza con los sustratos propionato (C3), lactato y etanol (Agler et al., 2011; Grootscholten et al., 2013a). Las cadenas impares se producen cuando los niveles celulares de propionil-CoA son altos, debido a su incorporación en lugar de acetil-CoA en la etapa inicial de la síntesis de ácidos grasos (Torella et al., 2013). Las rutas metabólicas para realizar el alargamiento de cadena de carbono son mediante tres vías: 1. Homoacetogenesis el cual combina dos moléculas de dióxido de carbono en acetato; 2. formación de succinato para alargar el glicerol con un carbono a partir del dióxido de carbono (Spirito et al., 2014); y 3. reversa β -oxidación para el alargamiento de carboxilatos de cadena corta con la adición de dos carbonos de acetil-CoA derivado a partir del etanol en carboxilatos de cadena media, dando lugar a productos más densos en energía e insolubles (por ejemplo, más fáciles de separar de la solución) (Agler et al., 2011; Spirito et al., 2014).

Un indicador de la alta acumulación de los ácidos carboxílicos, es la disminución de pH, dando lugar al desequilibrio del proceso generando condiciones tóxicas en el digestor, aún en sistemas con alta capacidad buffer y leves cambios en el pH (Franke-Whittle et al., 2014). Las variables que generan la alta producción de los ácidos carboxílicos son: modo de operación (Vasudevan et al., 2014), temperatura, pH, TRH y velocidad de carga orgánica (Khan et al., 2016). Y los parámetros varían ampliamente debido a los diferentes tipos de digestor y

condiciones del sustrato (Khan et al., 2016). La mejora de la velocidad para la producción de ácidos carboxílicos es importante para hacer el proceso económicamente viable (Grootscholten et al., 2013b; Sarkar et al., 2016).

Un ejemplo, para la producción de n-caproato, es mediante el proceso de fermentación y la alimentación de etanol diluido no destilado, puede catalizar una reacción de alargamiento de cadena a través de la ruta de β -oxidación inversa. Este proceso es parte de la plataforma de carboxilato e incluye bacterias en el microbioma del digestor, tales como *Clostridium kluyveri*, que son conocidas por producir cadenas de carbono de ácido carboxílico alargadas. El ácido n-caprónico, debido a que es más hidrófobo en comparación con el etanol, hace que sea fácil su extracción (Vasudevan et al., 2014).

1.3 Planteamiento del problema

La revisión de literatura está enfocada en los diferentes usos de los residuos de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* libre de aceite y glicerol, ambos generados como subproductos en la producción de biodiesel, para la producción de energía a través de DA.

El principal problema que tiene el uso de microalga sin pretratamiento como sustrato en DA es la presencia de la pared celular. Esto se debe a la presencia de celulosa y hemicelulosa, lo cual confiere resistencia a la degradación bajo condiciones anaeróbicas. En ese sentido es deseable utilizar biomasa de microalga libre de aceite, ya que la pared celular ha sido rota durante la extracción de aceite.

Algunos autores han trabajado con ambos sustratos en co-digestión con el fin de elevar la relación C:N. El objetivo es alcanzar la relación 20-30:1, siendo las condiciones óptimas para que la producción de metano sea más eficiente. Dado que la microalga es un sustrato rico en proteína con una relación menor a 8, por lo que puede conducir a una mayor producción de amoníaco siendo un efecto tóxico en los microorganismos patógenos, provocar inhibición y disminución de la eficiencia en la producción de metano. Para ello es necesario aumentar dicha relación con una fuente de carbono como el glicerol, lo que podría generar una sinergia entre ambos sustratos, teniendo como resultado un incremento en la producción de biogás por ende de metano. En la literatura abierta se ha reportado el uso de biomasa de microalga entera y glicerol en co-digestión de manera individual. En virtud de que existe una ausencia de trabajos en triple co-digestión M-G-P, la originalidad de esta investigación radica en explorar la posibilidad de uso de estos sustratos como alternativa para mejorar la producción de metano y ácidos carboxílicos. Para ello se hace uso de una serie de técnicas con microcosmos y biodigestores continuos acopladas con la aplicación de modelos para la definición de las mejores condiciones de proceso.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Explorar la influencia de diferentes proporciones de microalga *Chlorella vulgaris* y glicerol en co-digestión con pollinaza sobre la actividad metanogénica específica y la producción de ácidos carboxílicos bajo condiciones mesofílicas.

1.4.2 Objetivos particulares

Evaluar la factibilidad técnica de utilizar glicerol y microalgas libre de aceite en co-digestión con pollinaza para mejorar el potencial de metano bioquímica.

Evaluar el efecto de la bioconversión de metano de mono-digestión de pollinaza en un sistema biorreactor continuo estabilizado a un proceso de co-digestión con *Chlorella vulgaris* y glicerol bajo condiciones mesofílicas.

Aumentar la producción ácidos carboxílicos de cadena corta y media, inducidos por sobrealimentación en un sistema de biorreactor continuo mesofílico con residuos de biomasa de microalga y glicerol en co-digestión con pollinaza.

1.5 Estrategia experimental

La planeación para lograr los objetivos antes mencionados se realizó mediante una estrategia experimental basada en los resultados obtenidos en el rendimiento de metano y producción de AGV (Figura 1.2). Primero se realizó la propuesta de aumentar la producción de metano en pollinaza, adicionando dos residuos de la producción de biodiesel (microalga *Chlorella vulgaris* y glicerol) en diferentes proporciones usando microcosmos, los resultados obtenidos fueron ajustados al modelo de Gompertz para conocer cuál es el mayor potencial bioquímico de metano producido para cada mezcla. Los tratamientos con mayor producción de metano fueron seleccionados para ser escalados en digestores.

La puesta en marcha se realizó en dos biorreactores continuos con inóculo adaptado a estiércol bovino, estos fueron alimentados diariamente hasta la estabilización del proceso (producción de metano y perfil de AGV) con pollinaza para adaptar los microorganismos presentes en el inóculo. Posteriormente se partieron los dos digestores en seis digestores en total, tomando como inóculo el lodo producido por los dos digestores iniciales, todos continuaron siendo alimentados con pollinaza hasta la estabilización.

El cambio de alimentación se realizó en cuatro de los seis digestores cambiando a di-codigestión (M-P) y tri-codigestión (M-G-P) con los tratamientos que obtuvieron el mayor potencial bioquímico de metano en los microcosmos, manteniendo dos digestores alimentados con pollinaza como tratamiento control. Diariamente fueron alimentados con su respectivo sustrato hasta su estabilización.

La perturbación se realizó por sobrecarga de sustrato, la concentración aumentó y el tiempo de retención hidráulica disminuyó con el propósito de producir y medir la concentración de ácidos carboxílicos. Al alcanzar un punto crítico de inhibición de metano por propionato se detuvo la sobrecarga y se regresó a la alimentación normal hasta estabilizar el proceso.

Los materiales y métodos realizados para cada sección se detallan dentro de cada artículo.

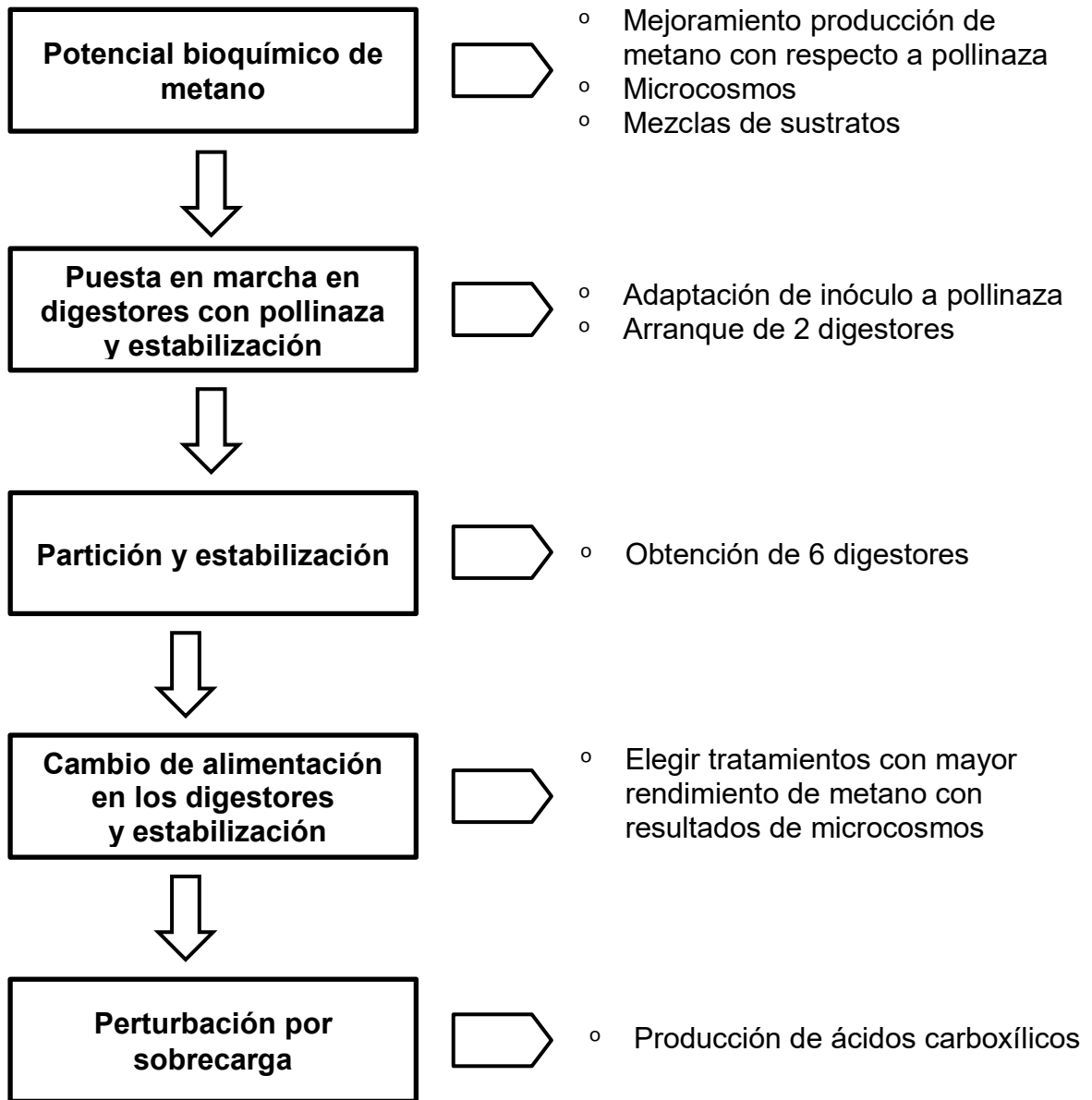


Figura 1.2 Estrategia experimental

1.6 Literatura citada

- Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T. 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends in Biotechnology*, **29**(2), 70-78.
- Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., Ahmad Asad, S. 2014. Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. *The Scientific World Journal*, **2014**, 21.
- Almeida, A., Nafarrate, R., Alvarado, A., Cervantes, O., Luevanos, O.R., Balagurusamy, N. 2011. Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila [revista en internet]*, **3**(6).
- Amon, B., Amon, T., Kryvoruchko, V., Bodiroza, V., Pötsch, E., Zollitsch, W. 2006. Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: Effects of dairy systems and of glycerine supplementation. *International Congress Series*, **1293**, 217-220.
- Andriani, D., Wresta, A., Atmaja, T.D., Saepudin, A. 2014. A Review on Optimization Production and Upgrading Biogas Through CO₂ Removal Using Various Techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **172**(4), 1909-1928.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. 2011. Chapter sixteen - Biomethanation and Its Potential. in: *Methods in Enzymology*, (Eds.) C.R. Amy, W.R. Stephen, Vol. Volume 494, Academic Press, pp. 327-351.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., Dewil, R. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, **34**(6), 755-781.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, R.I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. 2002. *Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1)* IWA Publishing, London

- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.P., Deckwer, W.D. 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52**(3), 289-297.
- Bilgili, M.S., Demir, A., Varank, G. 2009. Evaluation and modeling of biochemical methane potential (BMP) of landfilled solid waste: A pilot scale study. *Bioresource Technology*, **100**(21), 4976-4980.
- Bradley, A.S., Leavitt, W.D., Johnston, D.T. 2011. Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. *Geobiology*, **9**(5), 446-457.
- Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P.G., De Francisci, D., Valle, G., Angelidaki, I. 2016. Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. *Biotechnology for Biofuels*, **9**(1), 26.
- Costa, J.A.V., de Moraes, M.G. 2011. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, **102**(1), 2-9.
- Chan, Y.J., Chong, M.F., Law, C.L., Hassell, D.G. 2009. A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal*, **155**(1–2), 1-18.
- Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Bai, F.-W., Chang, J.-S. 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, **78**, 1-10.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**(3), 294-306.
- Chow, W.L., Chan, Y.J., Chong, M.F., Poh, P.E. 2015. Co-digestion studies of saleable glycerin with palm oil mill effluent and poultry manure. *Journal of Engineering Science and Technology*, **10**(8), 17-26.
- Dębowski, M., Zieliński, M., Grala, A., Dudek, M. 2013. Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies—Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **27**, 596-604.
- Demirbas, A., Fatih Demirbas, M. 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, **52**(1), 163-170.

- Donoso-Bravo, A., Mailier, J., Martin, C., Rodríguez, J., Aceves-Lara, C.A., Wouwer, A.V. 2011. Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A review. *Water Research*, **45**(17), 5347-5364.
- Ehimen, E.A., Connaughton, S., Sun, Z., Carrington, G.C. 2009. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. *GCB Bioenergy*, **1**(6), 371-381.
- Ellis, J.T., Tramp, C., Sims, R.C., Miller, C.D. 2012. Characterization of a Methanogenic Community within an Algal Fed Anaerobic Digester. *ISRN Microbiology*, **2012**, 12.
- Esposito, G., Frunzo, L., Liotta, F., Panico, A., Pirozzi, F. 2012. Bio-Methane Potential Tests To Measure The Biogas Production From The Digestion and Co-Digestion of Complex Organic Substrates. *The Open Environmental Engineering Journal.*, **5**(1), 1-8.
- Franke-Whittle, I.H., Walter, A., Ebner, C., Insam, H. 2014. Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Management*, **34**(11), 2080-2089.
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H.B. 1957. Anaerobic Digestion of Algae. *Applied Microbiology*, **5**(1), 47-55.
- Gonzalez-Fernandez, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B. 2015. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresource Technology*, **198**, 896-906.
- Grootscholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. 2013a. High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. *Bioresource Technology*, **136**, 715-718.
- Grootscholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. 2013b. Improving medium chain fatty acid productivity using chain elongation by reducing the hydraulic retention time in an upflow anaerobic filter. *Bioresource Technology*, **136**, 735-738.
- Grootscholten, T.I.M., Strik, D.P.B.T.B., Steinbusch, K.J.J., Buisman, C.J.N., Hamelers, H.V.M. 2014. Two-stage medium chain fatty acid (MCFA)

- production from municipal solid waste and ethanol. *Applied Energy*, **116**, 223-229.
- Gunaseelan, V.N. 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass and Bioenergy*, **13**(1), 83-114.
- Harun, R., Davidson, M., Doyle, M., Gopiraj, R., Danquah, M., Forde, G. 2011. Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass and Bioenergy*, **35**(1), 741-747.
- He, S., Fan, X., Katukuri, N.R., Yuan, X., Wang, F., Guo, R.-B. 2016. Enhanced methane production from microalgal biomass by anaerobic bio-pretreatment. *Bioresource Technology*, **204**, 145-151.
- Hidaka, T., Inoue, K., Suzuki, Y., Tsumori, J. 2014. Growth and anaerobic digestion characteristics of microalgae cultivated using various types of sewage. *Bioresource Technology*, **170**, 83-89.
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carbella, M., de Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.-C., Fruteau de Laclos, H., S.M. Ghasimi, D., Hack, G., Hartel, M., Heerenklage, J., Sarvari Horvath, I., Jenicek, P., Koch, K., Krautwald, J., Lizasoain, J., Liu, J., Mosberger, L., Nistor, M., Oechsner, H., Oliveira, J.V., Paterson, M., Pauss, A., Pommier, S., Porqueddu, I., Raposo, F., Ribeiro, T., Rüscher, F., Strömberg, S., Torrijos, M., van Eekert, M., van Lier, J., Wedwitschka, H., Wierinck, I. 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, **74**, 2515-2522.
- Khan, M.A., Ngo, H.H., Guo, W.S., Liu, Y., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Deng, L.J., Wang, J., Wu, Y. 2016. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **219**, 738-748.
- Kolesárová, N., Hutňan, M., Bodík, I., Špalková, V. 2011. Utilization of Biodiesel By-Products for Biogas Production. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2011**.

- Konstandt, H.G. 1977. Engineering, operation and economics of methane gas production. in: *Microbial Energy Conversion*, Pergamon, pp. 379-398.
- Kótai, L.s., Szépvölgyi, J.n., Szilágyi, M.r., Zhibin, L., Baiquan, C., Sharma, V., Sharma, P.K. 2013. Biobutanol from Renewable Agricultural and Lignocellulose Resources and Its Perspectives as Alternative of Liquid Fuels. in: *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques*, InTech. Rijeka, pp. Ch. 0.
- 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.
- Liu, G., Zhang, R., Li, X., Dong, R. 2007. Research Progress in Anaerobic Digestion of High Moisture Organic Solid Waste Research Progress in Anaerobic Digestion of High Moisture Organic Solid Waste. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*, **IX**(No. 13.).
- Lyberatos, G., Skiadas, I.V. 1999. Modeling of Anaerobic Digestion - A Review. *Global N E S T Journal*, **1**(2), 63-76.
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G. 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **45**, 540-555.
- Meneses-Reyes, J.C., Hernández-Eugenio, G., Huber, D.H., Balagurusamy, N., Espinosa-Solares, T. 2017. Biochemical methane potential of oil-extracted microalgae and glycerol in co-digestion with chicken litter. *Bioresource Technology*, **224**, 373-379.
- Montingelli, M.E., Tedesco, S., Olabi, A.G. 2015. Biogas production from algal biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **43**, 961-972.
- Morken, J., Sapci, Z., Strømme, J.E.T. 2013. Modeling of biodiesel production in algae cultivation with anaerobic digestion (ACAD). *Energy Policy*, **60**, 98-105.
- Neumann, P., Torres, A., Feroso, F.G., Borja, R., Jeison, D. 2015. Anaerobic co-digestion of lipid-spent microalgae with waste activated sludge and

- glycerol in batch mode. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **100**, 85-88.
- Neves, V.T.d.C., Sales, E.A., Perelo, L.W. 2016. Influence of lipid extraction methods as pre-treatment of microalgal biomass for biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **59**, 160-165.
- Oncel, S.S. 2013. Microalgae for a macroenergy world. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **26**, 241-264.
- Park, S., Li, Y. 2012. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. *Bioresource Technology*, **111**, 42-48.
- Parker, W.J. 2005. Application of the ADM1 model to advanced anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **96**(16), 1832-1842.
- Phukan, M.M., Chutia, R.S., Konwar, B.K., Kataki, R. 2011. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Applied Energy*, **88**(10), 3307-3312.
- Ramaraj, R., Dussadee, N., Whangchai, N., Unpaprom, Y. 2015. Microalgae biomass as an alternative substrate in biogas production. *International Journal of Sustainable and Green Energy*, **4**(1-1), 13-19.
- Ramos-Suárez, J.L., Carreras, N. 2014. Use of microalgae residues for biogas production. *Chemical Engineering Journal*, **242**, 86-95.
- Razaviarani, V., Buchanan, I.D. 2015. Anaerobic co-digestion of biodiesel waste glycerin with municipal wastewater sludge: Microbial community structure dynamics and reactor performance. *Bioresource Technology*, **182**, 8-17.
- Rétfalvi, T., Szabó, P., Hájos, A.-T., Albert, L., Kovács, A., Milics, G., Neményi, M., Lakatos, E., Ördög, V. 2016. Effect of co-substrate feeding on methane yield of anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, **28**(5), 2741-2752.
- Rivera-Salvador, V., López-Cruz, I.L., Espinosa-Solares, T., Aranda-Barradas, J.S., Huber, D.H., Sharma, D., Toledo, J.U. 2014. Application of Anaerobic Digestion Model No. 1 to describe the syntrophic acetate oxidation of poultry litter in thermophilic anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **167**, 495-502.

- Sarkar, O., Kumar, A.N., Dahiya, S., Krishna, K.V., Yeruva, D.K., Mohan, S.V. 2016. Regulation of acidogenic metabolism towards enhanced short chain fatty acid biosynthesis from waste: metagenomic profiling. *RSC Advances*, **6**(22), 18641-18653.
- Schirmer, W.N., Jucá, J.F.T., Schuler, A.R.P., Holanda, S., Jesus, L.L. 2014. Methane production in anaerobic digestion of organic waste from Recife (Brazil) landfill: evaluation in refuse of different ages. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **31**, 373-384.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, **27**(4), 409-416.
- Siles López, J.Á., Martín Santos, M.d.I.Á., Chica Pérez, A.F., Martín Martín, A. 2009. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology*, **100**(23), 5609-5615.
- Sobotka, M., Votruba, J., Havlík, I., Minkevich, I.G. 1983. The mass—Energy balance of anaerobic methane production. *Folia Microbiologica*, **28**(3), 195-204.
- Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M., Angenent, L.T. 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Current Opinion in Biotechnology*, **27**, 115-122.
- Stams, A.J.M., Elferink, S.J.W.H.O., Westermann, P. 2003. Metabolic Interactions Between Methanogenic Consortia and Anaerobic Respiring Bacteria. in: *Biomethanation I*, (Eds.) B.K. Ahring, I. Angelidaki, E.C. de Macario, H.N. Gavala, J. Hofman-Bang, A.J.L. Macario, S.J.W.H.O. Elferink, L. Raskin, A.J.M. Stams, P. Westermann, D. Zheng, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 31-56.
- Suali, E., Sarbatly, R. 2012. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**(6), 4316-4342.
- Tijani, H., Abdullah, N., Yuzir, A. 2015. Integration of microalgae biomass in biomethanation systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **52**, 1610-1622.

- Torella, J.P., Ford, T.J., Kim, S.N., Chen, A.M., Way, J.C., Silver, P.A. 2013. Tailored fatty acid synthesis via dynamic control of fatty acid elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(28), 11290-11295.
- Vasudevan, D., Richter, H., Angenent, L.T. 2014. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. *Bioresource Technology*, **151**, 378-382.
- Viana, M.B., Freitas, A.V., Leitão, R.C., Pinto, G.A.S., Santaella, S.T. 2012. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, **1**(1), 81-92.
- Wang, Q., Jiang, J., Zhang, Y., Li, K. 2015. Effect of initial total solids concentration on volatile fatty acid production from food waste during anaerobic acidification. *Environmental Technology*, **36**(15), 1884-1891.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, **99**(17), 7928-7940.
- Ward, A.J., Lewis, D.M., Green, F.B. 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, **5**, 204-214.
- Welander, P.V., Metcalf, W.W. 2005. Loss of the mtr operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(30), 10664-10669.
- Xie, S., Hai, F.I., Zhan, X., Guo, W., Ngo, H.H., Price, W.E., Nghiem, L.D. 2016. Anaerobic co-digestion: A critical review of mathematical modelling for performance optimization. *Bioresource Technology*, **222**, 498-512.
- Xie, S., Lawlor, P.G., Frost, J.P., Hu, Z., Zhan, X. 2011. Effect of pig manure to grass silage ratio on methane production in batch anaerobic co-digestion of concentrated pig manure and grass silage. *Bioresource Technology*, **102**(10), 5728-5733.

- Yang, Y.H., Klinthong, W., Tan, C.S. 2015. Optimization of continuous lipid extraction from *Chlorella vulgaris* by CO₂-expanded methanol for biodiesel production. *Bioresource Technology*, **198**, 550-556.
- Yen, H.-W., Brune, D.E. 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, **98**(1), 130-134.
- Yuan, X., Wang, M., Park, C., Sahu, A.K., Ergas, S.J. 2012. Microalgae growth using high-strength wastewater followed by anaerobic co-digestion. *Water Environment Research*, **84**(5), 396-404.
- Zhang, Q., Hu, J., Lee, D.-J. 2016. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. *Renewable Energy*, **98**, 108-119.
- Zhao, C., Yan, H., Liu, Y., Huang, Y., Zhang, R., Chen, C., Liu, G. 2016. Bio-energy conversion performance, biodegradability, and kinetic analysis of different fruit residues during discontinuous anaerobic digestion. *Waste Management*, **52**, 295-301.
- Zhen, G., Lu, X., Kobayashi, T., Kumar, G., Xu, K. 2016. Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. *Chemical Engineering Journal*, **299**, 332-341.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(6), 1875-1881.

CAPITULO 2.

POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DE MICROALGA LIBRE DE ACEITE Y GLICEROL EN CO-DIGESTIÓN CON POLLINAZA

BIOCHEMICAL METHANE POTENTIAL OF OIL-EXTRACTED MICROALGAE AND GLYCEROL IN CO-DIGESTION WITH CHICKEN LITTER¹

2.1 Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad técnica usando microalgas extraídas de aceite (M) y glicerol (G) en co-digestión con pollinaza (P), mejorando así el potencial bioquímico de metano (PBM). Se investigaron diferentes relaciones de materias primas de M (0 - 30 %), G (0 - 3 %) y P (67 - 100 %) para determinar la mejor condición de co-digestión en condiciones mesofílicas. De acuerdo con el modelo de Gompertz modificado, se obtuvo el mejor PBM (131.1 mL CH₄ g^{SV}Valim⁻¹) con la triple co-digestión (M:G:P) en una proporción de 30:3:67. Esto produjo una velocidad de producción de metano (λ) de 3.3 mL CH₄ g^{SV}Valim⁻¹ y una fase lag (k) de 17.4 d. Este tratamiento redujo la demanda química de oxígeno (DQO) en un 91.02 % y aumentó el rendimiento de metano en un 15.8 % con respecto al control P.

Palabras claves: Microalgas extraídas de aceite, glicerol, perfil de AGV, modelo de Gompertz, residuos de biodiesel, mesofílico.

¹ José Carlos Meneses-Reyes, Guadalupe Hernández-Eugenio, David H. Huber, Nagamani Balagurusamy, Teodoro Espinosa-Solares. Artículo publicado en Bioresource technology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.012> Aceptado el 3 de noviembre, 2016.

2.2 Abstract

The objective of this work was to evaluate the technical feasibility of using both oil-extracted microalgae (M) and glycerol (G) in co-digestion with chicken litter (CL), thereby improving biochemical methane potential (BMP). Different feedstock ratios of M (0–30%), G (0–3%) and CL (67–100%) were investigated to determine the best co-digestion condition under mesophilic conditions. According to the modified Gompertz model, the best BMP (131.1 mL CH₄ g_{VSfed}⁻¹) was obtained with the triple co-digestion (M:G:CL) in a proportion of 30:3:67. This yielded a methane production rate (λ) of 3.3 mL CH₄ g_{VSfed}⁻¹ and a lag time (k) of 17.4 d. This treatment reduced chemical oxygen demand (COD) by 91.02% and increased the methane yield 15.8% with respect to the CL control.

Keywords: Oil-extracted microalgae, glycerol, VFAs profile, Gompertz model, biodiesel residuals, mesophilic.

2.3 Introducción

La microalga *Chlorella vulgaris* ha recibido una atención significativa recientemente, debido a su rápida tasa de crecimiento y, en consecuencia, su alta productividad de la biomasa ($15 \text{ to } 30 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Yang et al., 2015; Yuan et al., 2012). Es una rica fuente de proteínas (51 – 58 % base seca) y lípidos (14 - 22 % base seca) (Sialve et al., 2009). La producción de biodiesel a partir de microalga tiene dos residuos principales, el glicerol y la biomasa de microalga libre de aceite, se ha propuesto que estos residuos pueden ser utilizados como materia prima para la producción de metano mediante digestión anaeróbica. Utilizando los métodos actuales para la producción de biocombustibles a partir de microalga, se estima que el 60-70% de la biomasa inicial podría ser recuperada (Ward et al., 2014). Además, el uso de estas materias primas puede mejorar la producción de metano, en particular, cuando contribuyen a equilibrar la relación C: N de sustratos pobres en nutrientes. Por lo tanto, Ward et al. (2014) propusieron que la digestión anaeróbica con microalga podría ser un proceso unitario clave que integra la eficiencia en la producción de biocombustibles derivados de microalgas. El glicerol se ha evaluado como sustrato para la digestión anaeróbica y se ha encontrado que mejora o reduce el rendimiento de metano dependiendo de la calidad del glicerol y de las mezclas de co-sustrato.

Por ejemplo, Fountoulakis and Manios (2009), trabajando con la fracción orgánica de residuos sólidos municipales, mezcla de aguas residuales de molino de aceite de oliva y aguas residuales de mataderos, reportaron que la adición de 1% de glicerol mejoró la producción de metano. Sin embargo, otro grupo de investigación (Siles López et al., 2009), comparó el glicerol acidificado y destilado en co-digestión con lodos granulares y no granulares, encontró que el rendimiento de metano disminuyó cuando la cantidad de glicerol acidificado aumentó, pero cuando se usó glicerol destilado, el rendimiento de metano aumentó o disminuyó dependiendo del porcentaje de glicerol. Cuando el glicerol fue co-digerido con ensilaje de maíz, grano de maíz y estiércol de cerdo, se reportó que la máxima producción de metano fue con glicerol al 6% mientras que

a concentraciones mayores de glicerol de hasta 15% dieron rendimientos más bajos (Amon et al., 2006).

La producción de metano también se ha evaluado usando diferentes residuos de microalga en co-digestión con diferentes sustratos. Algunos ejemplos de rendimiento de metano, expresado en $\text{mL CH}_4 \text{ g}_{\text{SValim}}^{-1}$, se presentan de la siguiente manera: estiércol de aves de corral y la microalga *Scenedesmus*, 112.7 (Nasr et al., 1983); ensilado de maíz, granos de maíz, estiércol de cerdo y glicerol, 365 – 439 (Amon et al., 2006); *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. y papel, 292 (Yen & Brune, 2007); residuos de biomasa de *Chlorella* sp. y glicerol, 302 (Ehimen et al., 2011); y estiércol de aves de corral y glicerol, 480 (Chow et al., 2015). Zhen et al. (2016) exploraron la co-digestión de mezclado de diferentes microalgas (MM) (*Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp.) y residuos de alimentos (FW) en el rango de 0 - 100 % de microalga. Ellos encontraron que el mejor rendimiento fue con una relación MM: FW de 20:80. Ehimen et al. (2009) evaluaron la producción de metano usando residuos de biomasa de microalga de la producción de biodiesel, así como la co-digestión con glicerol. Estos autores reportaron que el metano aumentó del 4 al 7 % para la codigestión de glicerol con residuos de microalga. Como trabajo adicional, Ehimen et al. (2011) exploraron la influencia del tiempo de retención hidráulica (TRH), la relación C:N y los sólidos totales (ST) en la producción de metano mediante la co-digestión de residuos de microalga con glicerol bajo condiciones mesofílicas. Sus hallazgos principales indicaron que la relación C:N está de 5 - 25, se obtuvo la máxima producción de metano con un valor de 12.44 que era un rendimiento 50 % mayor que la microalga sola.

Alzate et al. (2014) reportaron que la producción de metano de microalga extraída de aceite era mayor que la no extraída. Ellos atribuyeron este desempeño debido al hecho de que la extracción de lípidos constituyó un pretratamiento que aumentó el potencial bioquímico de metano de la microalga. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, y dado que no hay datos reportados sobre co-digestión de residuos mixtos de producción de biodiesel, la contribución del presente

trabajo fue evaluar la viabilidad técnica de usar glicerol y microalga extraída de aceite en co-digestión con pollinaza para mejorar el potencial bioquímico de metano (PBM). Las influencias de diferentes relaciones de materias primas fueron investigadas para determinar las mejores condiciones de co-digestión. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Gompertz modificado (Kim et al., 2003; Olsson et al., 2014; Zwietering et al., 1990)

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Procedimiento experimental

Tres diferentes materias primas fueron usadas como sigue: glicerol grado United States Pharmacopeial Convention (USP); biomasa de microalga extraída de aceite *Chlorella vulgaris* en polvo (FutureFoods Company, México); y pollinaza (de una granja avícola comercial en Tepetlaoxtoc, México). Las características de las materias primas se resumen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Características físicas y químicas de los sustratos.

Parámetros	Unidades	Sustratos		
		Microalga	Glicerol	Pollinaza
ST	[%]	93.65 ± 0.19	99.86	66.28 ± 1.16
SV/ST	[%]	92.75 ± 0.03	NA	69.61 ± 0.71
Proteína	[% B.S.]	60.13 ± 0.03	NA	24.70 ± 2.13
Extracto etéreo	[% B.S.]	0.97 ± 0.18	NA	1.81 ± 0.15
Cenizas	[% B.S.]	6.79 ± 0.02	NA	20.13 ± 0.12
Carbohidratos	[% B.S.]	25.76 ± 0.25	NA	19.65 ± 3.52
Fibra cruda	[% B.S.]	3.81 ± 0.24	NA	16.25 ± 0.37
C	[% p/p]	50.27 ± 0.05	38.79 ± 0.15	34.86 ± 1.28
H	[% p/p]	7.02 ± 0.11	7.97 ± 0.63	4.80 ± 0.19
N	[% p/p]	9.40 ± 0.03	0.72 ± 0.05	4.28 ± 0.08
S	[% p/p]	1.61 ± 0.20	0.57 ± 0.12	0.44 ± 0.04
C:N	[-]	5.35 ± 0.02	53.62 ± 3.34	8.15 ± 0.21

NA: no analizados

El experimento se realizó en botellas serológicas nombrados como microcosmos con una capacidad de 305 mL y un volumen de trabajo de 250 mL cada uno. El inóculo fue añadido a una proporción de 10 % (v/v). El inóculo se obtuvo a partir de un digestor de laboratorio mesofílico, el cual estuvo operando durante un año y alimentado con pollinaza como sustrato único al 3 % de ST. Los tratamientos, que incluyeron diferentes proporciones de microalga (0 - 30 %), glicerol (0 - 3 %) y pollinaza (67 - 100 %) en solución acuosa, fueron preparados por triplicado. Las características del tratamiento se presentan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Proporción C:N, pH, ST, SV y composición química de los tratamientos.

No.	Sustratos			C:N	pH	ST [% B.S.]	SV/ST [%]	DQO [mg L ⁻¹]	N-NH ₃ [mg L ⁻¹]
	M	G	P						
1	30	3.0	67.0	6.94	7.99	2.98 ± 0.04	78.2 ± 0.1	18416 ± 3858	475 ± 38
2	30	0.0	70.0	6.79	7.96	3.05 ± 0.04	78.6 ± 0.1	18416 ± 4409	416 ± 65
3	25	2.5	72.5	7.10	8.15	2.97 ± 0.01	77.5 ± 0.2	13416 ± 833	433 ± 22
4	20	2.0	78.0	7.33	8.34	3.02 ± 0.05	76.3 ± 0.1	14041 ± 1102	408 ± 36
5	15	1.5	83.5	7.46	8.36	2.98 ± 0.01	75.5 ± 0.1	12791 ± 2402	408 ± 8
6	15	0.0	85.0	7.37	8.21	3.08 ± 0.05	75.6 ± 0.4	12583 ± 551	416 ± 22
7	10	1.0	89.0	7.67	8.45	3.08 ± 0.02	74.3 ± 0.1	18416 ± 6981	483 ± 46
8	5	0.5	94.5	7.90	8.55	3.05 ± 0.02	73.1 ± 0.1	13000 ± 1443	491 ± 44
9	0	3.0	97.0	8.39	8.60	2.90 ± 0.06	72.4 ± 0.3	15083 ± 2402	391 ± 8
10	0	1.5	98.5	8.27	8.51	2.98 ± 0.03	71.9 ± 0.3	12375 ± 2194	383 ± 58
11	0	0.0	100.0	8.15	8.57	3.09 ± 0.07	71.9 ± 0.2	12166 ± 908	483 ± 58

El lodo se obtuvo añadiendo agua a la materia prima y filtrando la solución resultante para eliminar partículas grandes. Todos los tratamientos tuvieron 3 % de ST. Los microcosmos fueron sellados con un septum de goma y tapa metálica, y fueron purgados usando gas nitrógeno para desplazar el oxígeno. La incubación se realizó a 37.7 ± 1 °C. Los ensayos se realizaron durante 90 días.

2.4.2 Métodos analíticos

Para los sustratos, se determinaron los ST, sólidos volátiles (SV), sólidos fijos (SF) y DQO usando el Standard Methods de APHA (1998), mientras que el nitrógeno amoniacal se determinó con el Método 10031 (HACH, 2004). El pH se midió con un potenciómetro (Thermo Scientific Orion 5 Star, Singapur). Los perfiles de ácidos grasos volátiles (AGV) se obtuvieron para los ácidos de acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, iso-valerato, caproato, isocaproato y heptanoato usando cromatografía de gases (CG) (Claurus 500, Perkin Elmer, USA) equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar Elite-FFAP con una longitud de 30 m y 0.32 mm de diámetro (Perkin Elmer, USA). Los AGV se determinaron usando una muestra de efluente que se acidificó a pH 3 con HCl y se centrifugó a 14,500 rpm durante 10 min (microcentrífuga modelo MiniSpin Plus Eppendorf, Alemania). El sobrenadante se inyectó con un auto-muestreador utilizando 5 µL de volumen. Las condiciones de operación fueron las siguientes: flujo de gas 5 mL min⁻¹ a 10.6 psi, puerto de inyección a 150 °C, horno a 100 °C durante 8 minutos con rampa de 160 °C durante 8.5 min, detector a 250 °C y tiempo de retención de 16.5 min. Se utilizó helio como gas acarreador. Se utilizó como estándar Free Volatiles Mix grado analítico (46975-U, marca Sigma-Aldrich, USA). El análisis elemental (C, H, N, S) se realizó con un analizador Perkin Elmer PE2400; El compuesto estándar fue cisteína (reactivo analítico, Perkin Elmer).

El contenido de proteína se determinó con el procedimiento de micro-Kjeldahl según métodos estándar (APHA, 1998). El contenido de extracto etéreo se obtuvo con hexano en un sistema Soxtec (Foss modelo 2050, España). Se determinó la ceniza con SF. Los carbohidratos se estimaron como la fracción restante de ST después de la eliminación de proteínas, lípidos y SF. La fibra en bruto se determinó con el método ISO 5498. La determinación de agua en glicerol se realizó utilizando el método de valoración colorimétrica de Karl Fischer USP 28-NF 23. La producción de biogás se cuantificó mediante el método de desplazamiento en agua salina al 10 % (v/v). El contenido de metano se evaluó

utilizando un CG (Claurus 500, Perkin Elmer, USA). Se inyectaron 10 uL de muestra de biogás en el GC bajo las siguientes condiciones: flujo de 14 mL min⁻¹ a 14 psi, puerto de inyección a 100 °C, horno a 70 °C y detector a 100 °C. El tiempo de retención fue de 4 min; se utilizó helio como gas acarreador. El porcentaje de metano se obtuvo usando una curva de calibración con metano puro (HDSP No. P-4618-F, Praxair, México). El porcentaje de metano es reportado en condiciones normales de temperatura y presión.

2.4.3 Modelado y análisis estadístico

Los resultados de la producción de metano se ajustaron al modelo de Gompertz modificado (Kim et al., 2003; Olsson et al., 2014; Ortega-Martinez et al., 2016; Zwietering et al., 1990), que se presenta en la Ec. (1).

$$RMA = PBM \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{PBM} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

RMA es el rendimiento de metano acumulado (mL CH₄ g_{SV}alim⁻¹) en el tiempo t (d), PBM es el potencial de metano bioquímico (mL CH₄ g_{SV}alim⁻¹), μ_m es la tasa de producción de metano por día (mL CH₄ g_{SV}alim⁻¹ d⁻¹), e es la constante matemática (2.718282), λ es el tiempo de la fase lag (d), t es el tiempo de digestión (d). Todos los modelos de regresión se ajustaron usando SigmaPlot version 12.5. Un análisis de componentes principales (PCA) fue usado para evaluar los resultados de la mezcla de la alimentación (relación C:N, pH, ST, SV, DQO, N-NH₃ y el modelo de Gompertz modificado PBM, μ_m y λ). PCA también se utilizó para evaluar los perfiles de los tres principales ácidos grasos (acetato, propionato y butirato) a lo largo de todo el período de digestión. PCA se realizó con el paquete SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.5 Resultados y discusión

2.5.1 Potencial bioquímico de metano

Fig. 2.1 muestra el metano acumulado producido en todos los tratamientos durante 90 días. En todos los casos, se pueden definir tres períodos típicos: la fase lag, la producción exponencial de metano y la acumulación asintótica de metano. La metanogénesis en este microbioma se espera que se produzca a través de la vía acetoclástica porque se trata de un sistema mesofílico (Batstone et al., 2002). La formación de acetato en la digestión mesofílica se produce principalmente a través de la fermentación de los carbohidratos (acidogénesis). El acetato adicional también podría surgir, a través de la fermentación de aminoácidos y la oxidación de ácidos grasos de cadena larga (Batstone et al., 2002). El retraso inicial en la acumulación de metano duró aproximadamente 10 días en todos los microcosmos, podría atribuirse a la contaminación con oxígeno que inhibirá la metanogénesis hasta que el oxígeno sea eliminado por anaerobios facultativos (Botheju & Bakke, 2011). Durante el segundo período, se produjo metano debido al gran y rápido consumo de las reservas de acetato. En el tercer período, después de la disminución inicial de los niveles de acetato, la producción de metano parece estar basada en el desglose de un aumento de la reserva de propionato, el cual se convirtió en acetato adicional. Cuando la producción de metano disminuyó durante los últimos 20 - 30 días, la acumulación de acetato volvió a aumentar, lo que refleja la disminución de la metanogénesis acetoclástica.

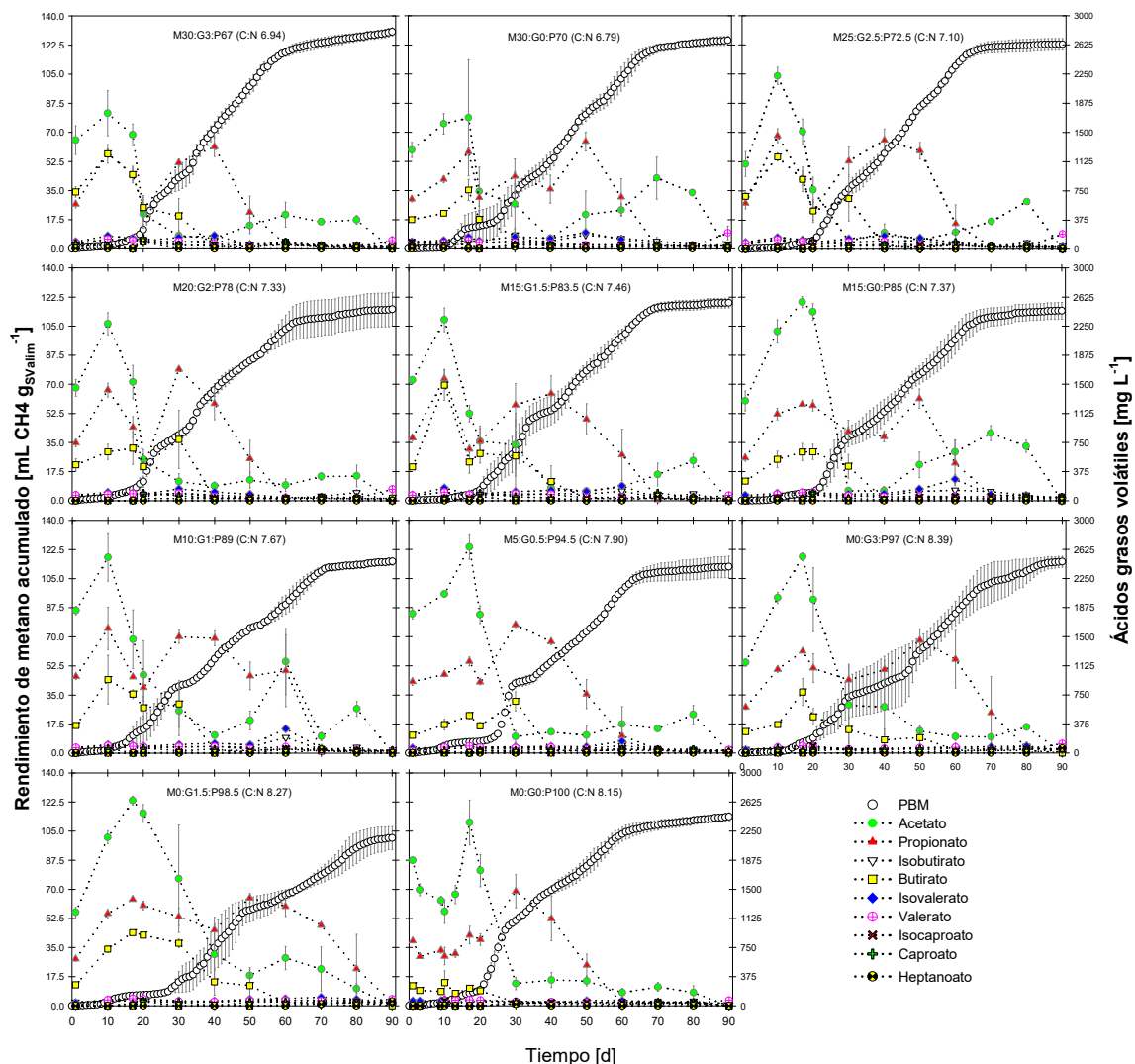


Figura 2.1. Rendimiento de metano acumulado y perfil de AGV durante el ensayo.

El PCA aplicado al acetato (A), propionato (P) y butirato (B) se presenta en la Fig. 2, donde A_i , P_i , y B_i son las concentraciones de ácidos grasos a i días después de que iniciaron los ensayos. Las variaciones en los resultados se explican cómo el 37.9 % por el Componente 1 y el 20.5 % por el Componente 2. La variación en el Componente 1 está positivamente relacionada con B70, P70 y B50 y negativamente con B90 y P40, mientras que el Componente 2 está influenciado principalmente por P10, B10, y A10. En la Fig. 2.2, es evidente que PCA puede disminuir las dimensiones de los datos y facilitar la interpretación de los datos; Por lo tanto, es posible ver que el tratamiento con P se separa de los otros

tratamientos. En el caso de la doble codigestión (G-P o M-P), el PCA las situó a la derecha del control mientras que los tratamientos de triple co-digestión (M-G-P) se visualizaron en la parte superior izquierda de la gráfica. Este análisis muestra que los perfiles de AGV de estos tratamientos tienen amplias similitudes, probablemente debido a que se basa en metabolitos (AGV) que representan la posición central en la red alimentaria metanogénica (acidogénesis y acetogénesis) que tiene menos diversidad microbiana y metabólica que la etapa hidrolítica inicial (Campanaro et al., 2016). Sin embargo, algunas diferencias en los perfiles AGV también fueron evidentes.

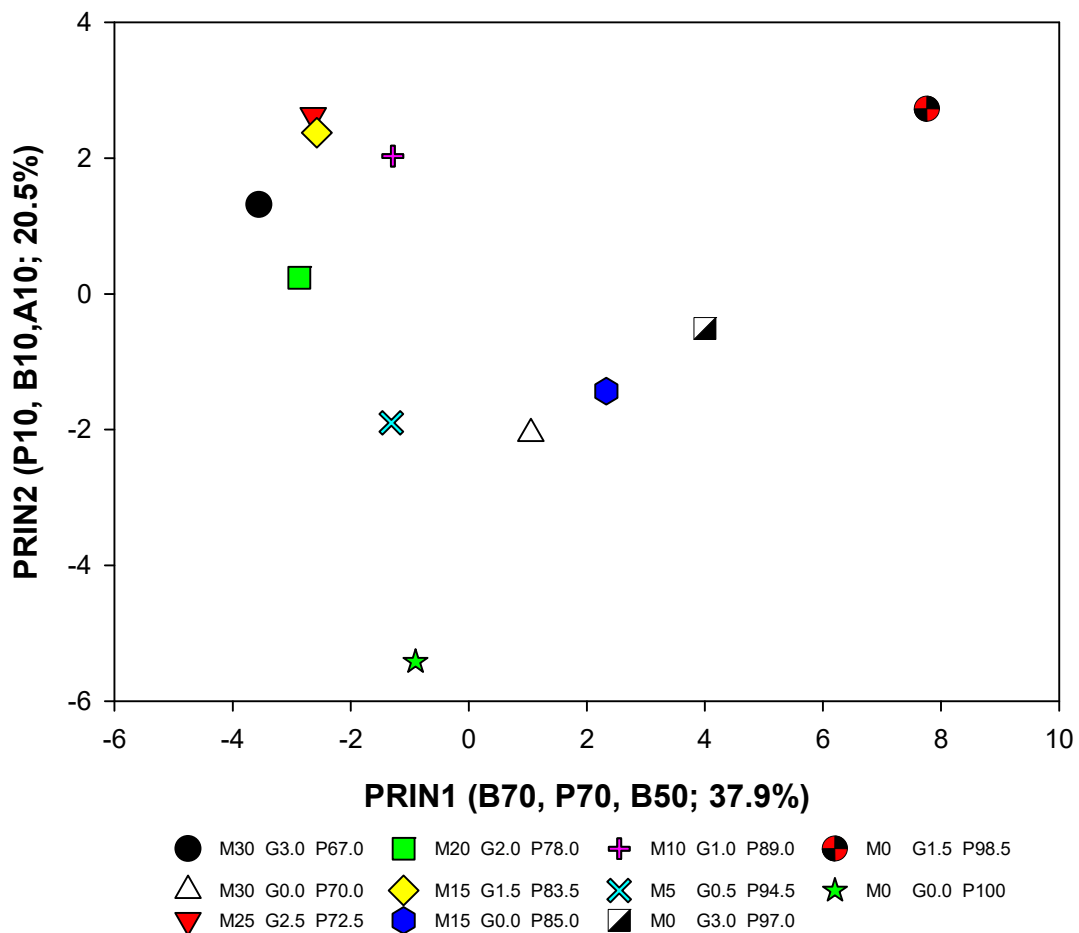


Figura 2.2. Análisis de componentes principales basado en el perfil de AGV.

Con el fin de aclarar las tendencias, los AGV se representaron individualmente en la Fig. 2.3. Así, fue posible reconocer cuatro comportamientos diferentes como

sigue:

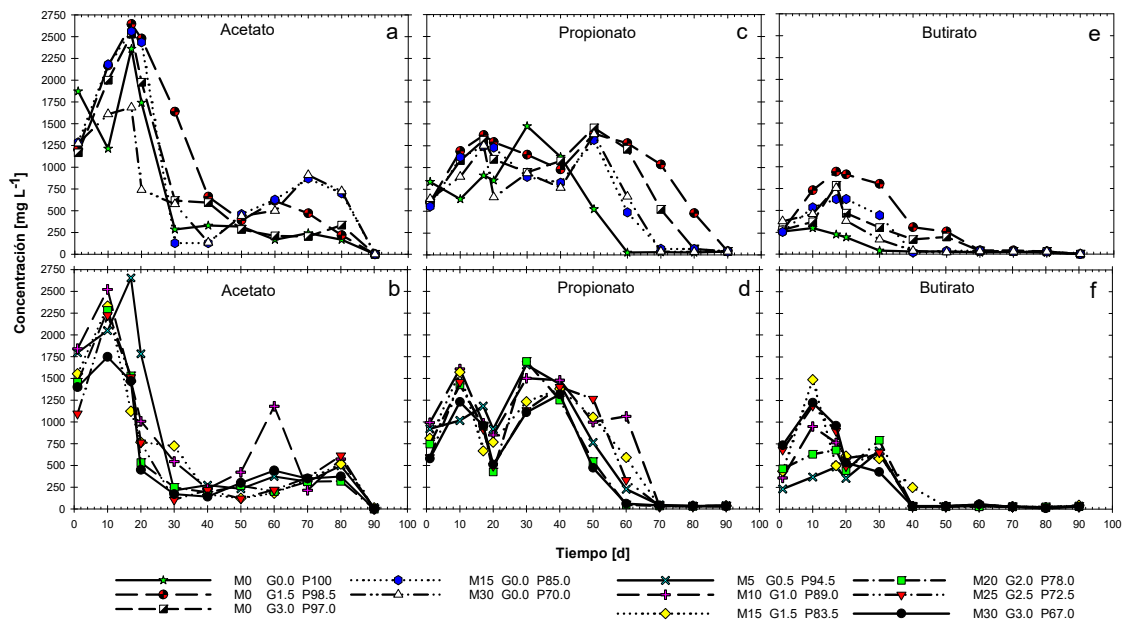


Figure 2.3. Patrones de acetato, propionato y butirato a lo largo de la evaluación de PBM

P mono-digestión. Este tratamiento tiene un comportamiento único comparado con los otros tratamientos (Fig. 2.3a, c, e). La concentración de acetato presenta una distribución unimodal con el pico más alto al día 17, correspondiente al final de la fase lag, seguido de una pronunciada disminución entre los días 15 y 30, y luego se ralentiza conduciendo al agotamiento completo. La concentración máxima de propionato ocurrió en el día 30 seguido de una reducción completa en el día 60. El consumo de butirato comenzó en el día 10 y terminó en el día 30.

- o G-P co-digestión. Los perfiles de acetato de ambos tratamientos fueron similares: ambos tenían una concentración máxima en el día 17, unos pocos días antes del final de la fase lag, mientras que uno mostraba una distribución bimodal (Fig. 2.3a, c, e). El propionato mostró una distribución bimodal con dos concentraciones máximas similares en los días 17 y 50. La reducción completa del propionato se produjo en los días 80 y 90 para

las relaciones M:G:P 0:3:97 y 0:1,5:98,5, respectivamente. Para el butirato, el máximo de ambos tratamientos fue el día 17.

- o M-P co-digestión. Los patrones de AGV son muy similares a la co-digestión G-P (Fig. 2.3a, c, e). El perfil de acetato de ambos tratamientos presentaron una distribución bimodal y una máxima concentración en el día 17. El propionato presentó una distribución bimodal con dos similares concentraciones en los días 17 y 50, y un consumo completo en el día 70. La concentración máxima de butirato en ambos tratamientos Fue en los días 17 para 30:0:70 y 20 para 15:0:85.
- o M-G-P co-digestión. Los seis tratamientos tuvieron comportamientos similares (Fig. 2.3b, d, f). La concentración de acetato presentó una distribución unimodal en todos los tratamientos excepto la proporción M:G:P de 10:1:89 que tenía una distribución bimodal. El primer pico alto para los 5 tratamientos similares fue el día 10 y el segundo y único fue el día 80; para el otro tratamiento, los picos altos fueron en los días 22 y 65. La concentración de propionato también mostró distribución bimodal en todos los tratamientos. El primer pico alto ocurrió entre los días 10 y 17, mientras que el segundo pico ocurrió entre el día 30 y 40. Los perfiles de butirato no estaban bien definidos: tres tratamientos mostraron una distribución unimodal, mientras que otros tres mostraron una distribución bimodal. El acetato se procesó completamente al día 90. La captación de propionato se completó al día 40 para 5 tratamientos y al día 50 para uno. El butirato tuvo la concentración más baja después del día 40 para cinco tratamientos y después de 50 días para la otra.

Los patrones anteriores tienen varias características comunes. En los primeros 10 - 20 días, los niveles de acetato, propionato y butirato aumentaron rápidamente. La mayor parte de la reserva inicial de acetato fue probablemente

creada por la fermentación de carbohidratos, y suplementada además por la oxidación de butirato y propionato.

Los carbohidratos estaban presentes tanto en la pollinaza como en la microalga. Los carbohidratos fácilmente degradables (hexosas y pentosas) en la biomasa de microalga podrían fermentarse en estos tres ácidos grasos. La conversión de glicerol en acetato y butirato también es probable que se haya producido durante este tiempo (Viana et al., 2012). Además, cada uno de los tratamientos mostró dos picos de propionato. Proponemos que el primer pico correspondió a la fermentación inicial de carbohidratos, mientras que el segundo pico pudo haber sido debido a la fermentación del ácido láctico (Ren et al., 1997). En un digestor mesofílico que trata el glicerol, Ferguson et al. (2016) encontraron que el ácido láctico era el principal producto de fermentación dentro de los tres días de la co-digestión con glicerol. Sin embargo, la presencia de ácido láctico no se midió en nuestro estudio y requiere confirmación experimental adicional. En contraste con todos los tratamientos, los microcosmos de control (100 % P) mostraron una disminución de los ácidos grasos durante los primeros 10 días, lo que podría atribuirse a niveles reducidos de carbohidratos fácilmente degradados.

La Tabla 2.3 muestra el promedio de los parámetros modificados del modelo de Gompertz aplicados a las repeticiones individuales. En la tabla también se muestran los coeficientes de determinación para cada repetición. El PBM y μ_m mostraron una ligera tendencia a la caída a medida que aumenta la relación C:N mientras que la fase lag mostró una tendencia opuesta al aumentar. En el caso de la PBM, casi todos los tratamientos mostraron un mejor PBM que el control. La comparación de los tratamientos mostró que el testigo (T11) produjo 113.2 mL CH₄ g_{SV}valim⁻¹, mientras M-P co-digestión de T2 y T6 produjeron 129.6 y 117.8, respectivamente. Esto indicó una tendencia en la que las proporciones más altas de microalgas mejoraron el PBM. En el caso de la co-digestión con glicerol, el PBM mostró un patrón diferente en comparación con el control: la menor cantidad de glicerol (T10) se asoció con PBM reducida (97.4 mL CH₄ g_{SV}valim⁻¹), mientras

que la mayor cantidad de glicerol (T9) se asoció con el mayor PBM (116.7). Resultados similares han sido reportados en la literatura (Siles López et al., 2009).

Algunos grupos de investigación han encontrado que el rendimiento de metano a partir de microalgas puede ser mejorado mediante el uso de pre-tratamientos o codigestión. Por ejemplo, se encontró que las microalgas como único sustrato producían entre 82.1 (Passos et al., 2016) y 88.0 mL CH₄ g_{SV}alim⁻¹ (Zhen et al., 2016). En el primero, el rendimiento se incrementó en un 75.2 % cuando se aplicó un pretratamiento con KOH al 0.5 % a 80 °C durante 2 h, mientras que en el último se incrementó el rendimiento cuando se usó codigestión con microalgas:desechos alimentos (20:80) se utilizó.

En general, y basado en los datos de la Tabla 2.3, se encontró que cada triple co-digestión con M-G-P y doble co-digestión con M-P mejoró la producción de metano en comparación con el control. Por el contrario, la co-digestión con G-P mostró una disminución (14.0 %) o un aumento (3.0 %) de PBM dependiendo de la relación G:P. Los PBM de M-G-P fueron en todos los casos superiores al control (2.0 - 15.8 % más alto). El T1 (30:3:67) obtuvo el mayor rendimiento (131.1 mL de CH₄ g_{SV}alim⁻¹), lo que se puede atribuir al hecho de que los tratamientos con microalga extraída de aceite tienen una concentración de carbohidratos mayor que la pollinaza (Tabla 2.1). Por lo tanto, los sustratos en la triple co-digestión son más accesibles a la actividad microbiana y, por consiguiente, disponibles para la acidogénesis y acetogénesis. Estos resultados están en concordancia con la composición de los microcosmos después de 90 días (Tabla 2.4). La mayor reducción de ST se hizo por los tratamientos que tuvieron el mejor rendimiento fueron T1 (30: 3: 67) y T2 (30:0:70), con incrementos de PBM de 38.8 y 37.3%, respectivamente. En el caso de la DQO, todos los tratamientos alcanzaron una reducción del 90%. Los niveles de amoníaco aumentaron del 17.8% al 94.5 %, con una concentración máxima de 776 mg L⁻¹, que está por debajo de la concentración de inhibición para la producción de metano.

Tabla 2.3. Parámetros del modelo modificado de Gompertz determinados a partir de los datos experimentales.

	PBM	μ_m media	λ media	R ²
Sustratos	[mL CH ₄ g ^{SValim} ⁻¹]	[mL CH ₄ g ^{SValim} ⁻¹ d ⁻¹]	[d]	[-]
M30 G3.0 P67.0	131.1 ^a	3.30 ^a	17.36 ^a	0.9986 0.9943 0.9967
M30 G0.0 P70.0	129.6 ^a	2.84 ^{a,b}	18.83 ^a	0.9920 0.9937 0.9945
M25 G2.5 P72.5	127.7 ^{ab}	3.02 ^{a,b}	19.86 ^a	0.9953 0.9923 0.9963
M20 G2.0 P78.0	116.5 ^{ab}	2.77 ^{a,b}	15.36 ^a	0.9937 0.9886 0.9932
M15 G1.5 P83.5	122.3 ^{ab}	2.90 ^{a,b}	20.32 ^a	0.9832 0.9897 0.9923
M15 G0.0 P85.0	117.8 ^{ab}	2.62 ^{a,b}	18.79 ^a	0.9885 0.9905 0.9917
M10 G1.0 P89.0	118.3 ^{ab}	2.23 ^b	14.16 ^a	0.9896 0.9900 0.9945
M5 G0.5 P94.5	115.5 ^{ab}	2.55 ^{a,b}	18.0386 ^a	0.9847 0.9962 0.9934
M0 G3.0 P97.0	116.7 ^{ab}	2.39 ^{a,b}	21.7339 ^a	0.9898 0.9784 0.9802
M0 G1.5 P98.5	97.4 ^b	2.44 ^{a,b}	26.4479 ^a	0.9741

					0.9900
					0.9772
M0	G0.0 P100	113.2 ^{ab}	2.83 ^{a,b}	14.1252 ^a	0.9939
					0.9942
					0.9870

Tabla 2.4. Composición química del digestato después de los 90 días.

No.	pH	ST [% B.S.]	SV/ST [%]	DQO [mg L ⁻¹]	N-NH ₃ [mg L ⁻¹]
1	7.48	1.83 ± 0.18	60.0 ± 2.7	1533 ± 136	715 ± 32
2	7.51	1.92 ± 0.09	67.5 ± 1.3	1551 ± 28	776 ± 27
3	7.33	1.50 ± 0.19	58.7 ± 2.9	1542 ± 16	666 ± 1
4	7.37	1.72 ± 0.12	58.7 ± 1.6	1296 ± 116	630 ± 71
5	7.36	1.73 ± 0.04	58.9 ± 1.9	1375 ± 106	706 ± 54
6	7.46	1.57 ± 0.04	62.4 ± 0.4	1500 ± 25	718 ± 4
7	7.44	1.90 ± 0.22	56.5 ± 1.5	1278 ± 52	560 ± 12
8	7.40	1.77 ± 0.15	60.4 ± 0.5	1185 ± 130	551 ± 11
9	7.48	1.57 ± 0.04	56.9 ± 1.5	1292 ± 135	508 ± 7
10	7.51	1.52 ± 0.01	58.9 ± 2.8	1227 ± 58	565 ± 5
11	7.50	1.62 ± 0.09	55.8 ± 2.8	1153 ± 82	576 ± 10

El PCA aplicado a la composición inicial (C:N, pH, ST, SV, DQO, N-NH₃) y el modelo de Gompertz modificado (PBM, μ_m , y λ) se presenta en la Fig. 2.4. Las variaciones en los resultados se explican el 51.4 % por el Componente 1 y 24.8 % por el Componente 2. La variación en el Componente 1 está positivamente relacionada con SV y PBM y negativamente con C:N, mientras que el Componente 2 está influenciada principalmente por ST y N-NH₃. En la Fig. 2.4, los tratamientos utilizando G-P fueron completamente separados de los otros tratamientos que mostraron menor SV, PBM, ST y N-NH₃. Además, los tratamientos con M-P se localizaron a lo largo del eje Y de la gráfica y mostraron principalmente cambios en SV y PBM. Estos dos grupos están completamente separados del control (P) que mostró altos niveles de ST y N-NH₃. En el caso de

la triple co-digestión (M-G-P), los valores se extienden a lo largo de la gráfica. Sin embargo, existe una tendencia de los grupos a formar con los tratamientos que tienen similares ST y PBM que es similar a lo que fue encontrado por el modelo modificado de Gompertz.

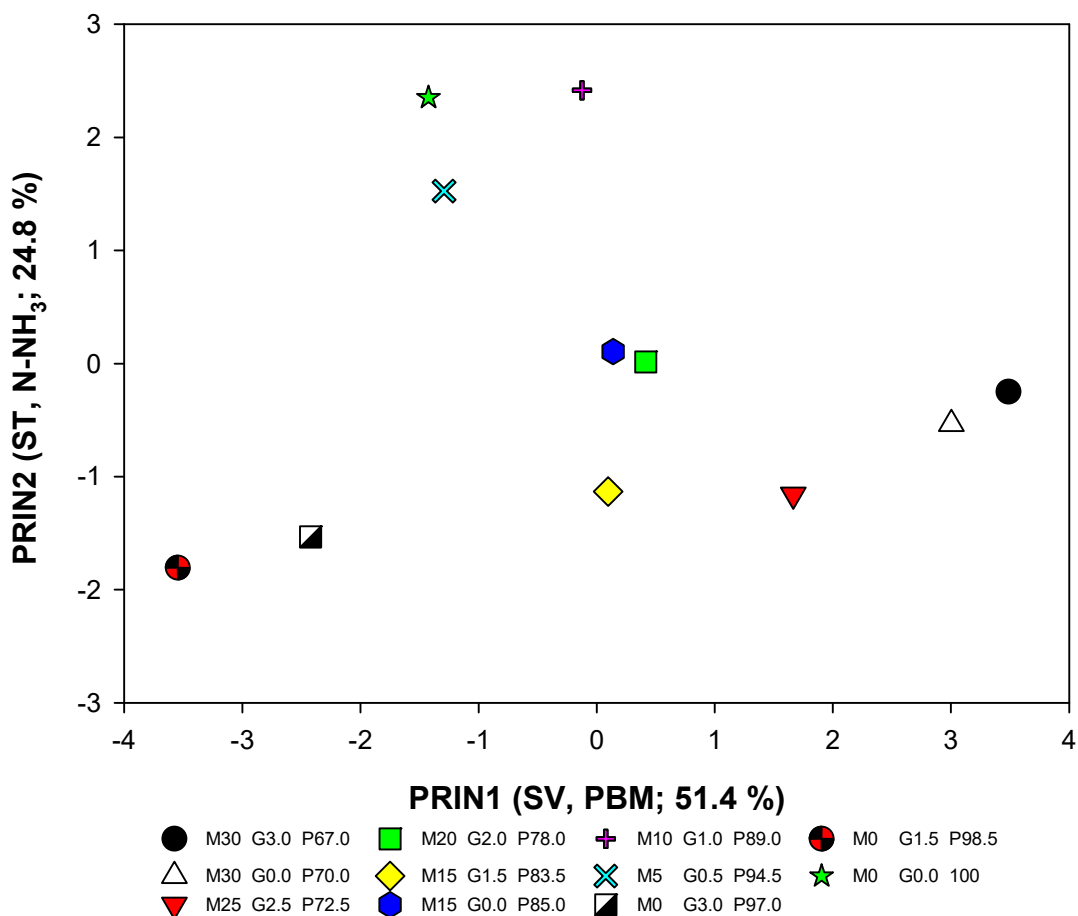


Figura 2.4. Análisis de componentes principales basado en la composición química inicial y PBM.

2.6 Conclusión

En la mayoría de los casos, la PBM procedente de la co-digestión con microalga extraída de aceite, glicerol y pollinaza bajo condiciones mesofílicas tuvo un rendimiento mejor que la mono-digestión con pollinaza. M-G-P aumentó el PBM (2.0 - 15.8 %), M-P también aumentó el PBM (4.1 - 14.1 %); G-P mostró un aumento (3.0 %) o disminución (14.0 %) dependiendo de la relación G-P. El tratamiento M-G-P 30:3:67 (6.94 C:N) tuvo el rendimiento más alto (131.1 mL CH₄

g_{SV}lim⁻¹). Los perfiles de AGV mostraron diferencias entre los tres tipos de co-digestión y el control, lo que sugiere diferencias en la disponibilidad de moléculas de sustrato fácilmente degradadas y la cinética de la ruta metabólica dependen de la composición de la alimentación.

2.7 Literatura citada

- Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I. 2014. Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. *Chemical Engineering Journal*, **243**, 405-410.
- Amon, B., Amon, T., Kryvoruchko, V., Bodiroza, V., Pötsch, E., Zollitsch, W. 2006. Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: Effects of dairy systems and of glycerine supplementation. *International Congress Series*, **1293**, 217-220.
- APHA, A., WPCF. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed, Washington, DC, USA.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, R.I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. 2002. *Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1)* IWA Publishing, London
- Botheju, D., Bakke, R. 2011. Oxygen Effects in Anaerobic Digestion – A Review. *The Open Waste Management Journal*, **4**, 1-19.
- Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P.G., De Francisci, D., Valle, G., Angelidaki, I. 2016. Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. *Biotechnology for Biofuels*, **9**(1), 26.
- Chow, W.L., Chan, Y.J., Chong, M.F., Poh, P.E. 2015. Co-digestion studies of saleable glycerin with palm oil mill effluent and poultry manure. *Journal of Engineering Science and Technology*, **10**(8), 17-26.
- Ehimen, E.A., Connaughton, S., Sun, Z., Carrington, G.C. 2009. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. *GCB Bioenergy*, **1**(6), 371-381.

- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., Birch, E.J., Eaton-Rye, J.J. 2011. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. *Applied Energy*, **88**(10), 3454-3463.
- Ferguson, R.M.W., Coulon, F., Villa, R. 2016. Organic loading rate: A promising microbial management tool in anaerobic digestion. *Water Research*, **100**, 348-356.
- Fountoulakis, M.S., Manios, T. 2009. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Bioresource Technology*, **100**(12), 3043-3047.
- HACH. 2004. *Hach water analysis handbook. Method 10031. 4th ed*, Colorado, USA.
- Kim, H.W., Han, S.K., Shin, H.S. 2003. The optimisation of food waste addition as a co-substrate in anaerobic digestion of sewage sludge. *Waste Manag Res*, **21**(6), 515-26.
- Nasr, F.A., Shehata, S.A., El-Zanfaly, H.T. 1983. Methane and algal production from poultry waste and its public health aspects. *Environment International*, **9**(5), 415-424.
- Olsson, J., Feng, X.M., Ascue, J., Gentili, F.G., Shabiimam, M.A., Nehrenheim, E., Thorin, E. 2014. Co-digestion of cultivated microalgae and sewage sludge from municipal waste water treatment. *Bioresource Technology*, **171**, 203-210.
- Ortega-Martinez, E., Sapkaite, I., Fdz-Polanco, F., Donoso-Bravo, A. 2016. From pre-treatment toward inter-treatment. Getting some clues from sewage sludge biomethanation. *Bioresource Technology*, **212**, 227-235.
- Passos, F., Felix, L., Rocha, H., Pereira, J.d.O., de Aquino, S. 2016. Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: Thermochemical pretreatment and biogas production. *Bioresource Technology*, **209**, 305-312.

- Ren, N.Q., Wang, B.Z., Huang, J.C. 1997. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **54**(5), 428-433.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, **27**(4), 409-416.
- Siles López, J.Á., Martín Santos, M.d.I.Á., Chica Pérez, A.F., Martín Martín, A. 2009. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology*, **100**(23), 5609-5615.
- Viana, M.B., Freitas, A.V., Leitão, R.C., Pinto, G.A.S., Santaella, S.T. 2012. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, **1**(1), 81-92.
- Ward, A.J., Lewis, D.M., Green, F.B. 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, **5**, 204-214.
- Yang, Y.H., Klinthong, W., Tan, C.S. 2015. Optimization of continuous lipid extraction from *Chlorella vulgaris* by CO₂-expanded methanol for biodiesel production. *BIORESOURCETECHNOLOGY*, **198**, 550-556.
- Yen, H.-W., Brune, D.E. 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, **98**(1), 130-134.
- Yuan, X., Wang, M., Park, C., Sahu, A.K., Ergas, S.J. 2012. Microalgae growth using high-strength wastewater followed by anaerobic co-digestion. *Water Environment Research*, **84**(5), 396-404.
- Zhen, G., Lu, X., Kobayashi, T., Kumar, G., Xu, K. 2016. Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. *Chemical Engineering Journal*, **299**, 332-341.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(6), 1875-1881.

CAPITULO 3.

BIOCONVERSIÓN DE BIOMASA *Chlorella vulgaris* LIBRE DE ACEITE Y GLICEROL A METANO MEDIANTE CO-DIGESTIÓN ANAERÓBICA CONTINUA CON POLLINAZA

OIL-EXTRACTED *Chlorella vulgaris* BIOMASS AND GLYCEROL BIOCONVERSION TO METHANE VIA CONTINUOUS ANAEROBIC CO-DIGESTION WITH CHICKEN LITTER¹

3.1 Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de la co-digestión anaeróbica continua mesofílica utilizando microalga libre de aceite (M) y glicerol (G) en co-digestión con pollinaza (P). El proceso incluyó la puesta en marcha y estabilización de biorreactores anaeróbicos continuos utilizando P como materia prima y la adaptación correspondiente a las materias primas M-P y M-G-P. Los tratamientos se seleccionaron basándose en un informe previo sobre la evaluación del Potencial Bioquímico de metano (PBM) (Meneses-Reyes et al., 2017), teniendo en cuenta sólo las mejores relaciones de materias primas M-G-P. El desempeño fue evaluado por la Actividad Metanogénica Específica (AME); La mejor respuesta (270.0 mL CH₄ g^{SVañadidos}⁻¹) se obtuvo con una triple co-digestión M-G-P 30:3:67, que fue 39,0% por encima del tratamiento P. Estos hallazgos han demostrado que los dos principales residuos de la producción de biodiesel de microalgas (G y M) pueden utilizarse como materia prima para mejorar la producción de metano mediante la digestión anaeróbica.

Palabras clave: microalga libre de aceite; glicerol; residuos de biodiesel; mesofílico; CSTR; actividad metanogénica específica.

¹ José Carlos Meneses-Reyes, Guadalupe Hernández-Eugenio, David H. Huber, Nagamani Balagurusamy, Teodoro Espinosa-Solares.

3.2 Abstract

The objective of this work was to evaluate the performance of mesophilic continuous anaerobic co-digestion using oil-extracted microalgae (M) and glycerol (G) in co-digestion with chicken litter (CL). The process included the starting up and stabilization of continuous anaerobic bioreactors using CL as a feedstock and the corresponding adaptation to M-CL and M-G-CL feedstocks. The treatments were selected based on a previous report on Biochemical Methane Potential (BMP) evaluation (Meneses-Reyes et al., 2017), taking in consideration only the best M-G-CL feedstock ratios. The performance was evaluated by the Specific Methanogenic Activity (SMA); the best response ($270.0 \text{ mL CH}_4 \text{ g}_{\text{VSadded}}^{-1}$) was obtained with a triple co-digestion M-G-CL 30:3:67, which was 39.0 % above the CL treatment. These findings have shown that the two main residuals from microalgae biodiesel production (G and M) can be used as a feedstock to improve methane production through anaerobic digestion.

Keywords: oil-extracted microalgae; glycerol; biodiesel residuals; mesophilic; CSTR; specific methanogenic activity.

3.3 Introducción

Las microalgas tienen el potencial de ser un importante recurso renovable para la producción de biodiesel debido a su alta productividad y capacidad para producir lípidos (Malcata, 2011). El escalamiento de la producción de microalgas a nivel industrial, presenta retos como la eliminación o la reutilización de residuos de biocombustibles (Dong et al., 2015). En particular, la producción de biodiesel a partir de microalgas produce grandes cantidades de desechos de biomasa celulares libre de aceite y glicerol como subproductos (Ward et al., 2014). Un método propuesto para el reciclado de estos desechos es la digestión anaeróbica (DA) que puede convertir mezclas complejas de compuestos orgánicos en metano (González-Fernández et al., 2012). Sin embargo, con el fin de utilizar estos residuos con DA, varios desafíos deben ser abordados.

Las dos fracciones principales de desechos en la producción de biodiesel a partir de microalgas presentan problemas potenciales para el proceso DA. Los residuos de biomasa de microalga consiste en compuestos de la pared celular que varían mucho en la degradabilidad (Mussnug et al., 2010). *Chlorella*, por ejemplo, tiene una pared celular que es altamente resistente a la degradación en la DA (González-Fernández et al., 2012). El segundo residuo, es el glicerol, también puede ser utilizado como sustrato para la DA, pero se ha encontrado tanto para mejorar o reducir la producción de metano de la concentración, la pureza y la aclimatación del microbioma de la DA (Viana et al., 2012). Los altos niveles de glicerol crudo pueden ser prohibitivos debido a las sales inorgánicas o a la acumulación de ácidos grasos de cadena larga. Por ejemplo, Usack and Angenent (2015) evaluaron el glicerol como un sustrato y encontraron que la producción de metano se incrementó a una baja tasa de carga orgánica (TCO), pero se inhibió a alta TCO. Además, dado que los microbiomas se adaptan a sustratos particulares a lo largo del tiempo, la elección del microbioma de la DA que se va a utilizar y si se ha aclimatado a cualquiera de los sustratos, pueden ser importantes (De Vrieze et al., 2014).

Los problemas asociados con sustratos particulares pueden ser mitigados a través de la co-digestión. La co-digestión puede aumentar el rendimiento de metano mediante la mejora del desbalance de nutrientes y facilitar el metabolismo sinérgico microbiano (Astals et al., 2015). Las microalgas han sido probadas en co-digestión con una variedad de sustratos para mejorar el desempeño y la economía de la DA (González-Fernández et al., 2012; Posadas et al., 2017), incluyendo estiércol de ganado (Astals et al., 2015), efluentes de aguas residuales municipales (Yuan et al., 2012), y residuos FOG (mantecas, aceites y grasas) (Park & Li, 2012). Muchos estudios también han evaluado el uso de glicerol para aumentar la producción de metano con co-sustratos que tienen bajas relaciones C:N (Viana et al., 2012). Se encontró que la co-digestión con glicerol bruto en un digestor de lodo a escala piloto mejoró el rendimiento con una ganancia de energía neta (Baba et al., 2013).

Evaluar la idoneidad de las mezclas de sustrato antes de la implementación a escala completa es útil porque muchas variables pueden afectar la eficiencia de la DA. Un método para medir la calidad de las nuevas materias primas es el potencial bioquímico del metano (PBM) (Angelidaki et al., 2009). El PBM es una métrica comúnmente empleada porque la metanogénesis se encuentra al final de una red alimentaria microbiana compleja que puede verse afectada por muchas variables cualquiera de las cuales podría inhibir el proceso global. Por ejemplo, la metanogénesis puede verse afectada por la composición nutricional de la materia prima, la relación C:N, la biodegradabilidad del sustrato, y los inhibidores químicos (Chen et al., 2008; Ward et al., 2008). Además, el método PBM en sí mismo es una variable importante. Las pruebas de BMP se realizan como ensayos tipo batch en botellas serológicas con cultivos microbianos activos extraídos de cualquier digestor anaeróbico. Aunque estos ensayos tradicionales son importantes, particularmente para el cribado a gran escala de sustratos, difieren sustancialmente de los digestores operativos. A diferencia de los reactores de flujo continuo en estado estacionario, la reacción termodinámica en las pruebas batch puede ser inhibida como metabolitos intermedios y la

acumulación de productos finales, cambiando de este modo la cinética de la red alimentaria (Labatut et al., 2011). Además, la variación del inóculo (microbioma) también puede afectar los resultados del PBM (De Vrieze et al., 2015).

La BMP de tres *Chlorella* spp., nombradas, *C. minutissima*, *C. vulgaris* y *C. pyrenoidosa*, han sido recientemente reportadas (Prajapati et al., 2014). Estos autores encontraron que la biomasa de *C. pyrenoidosa* tuvo un rendimiento de biogás relativamente más alto de $0.464 \pm 0.066 \text{ m}^3 \text{ biogás kg}_{\text{SVañadidos}}^{-1}$ y un 57 % (v/v) de contenido de CH_4 durante 30 días de digestión. Esto corresponde a $264.5 \text{ mL CH}_4 \text{ g}_{\text{SValimentados}}^{-1}$, mientras que para *Chlorella vulgaris*, $245.0 \text{ mL CH}_4 \text{ g}_{\text{SValimentados}}^{-1}$ se ha reportado (Wieczorek et al., 2014). En un estudio reciente, nuestro equipo de investigación utilizó el PBM para evaluar la eficiencia de la co-digestión con dos residuos de la producción de biodiesel, la biomasa de microalgas libre de aceite (M) de *Chlorella vulgaris* y glicerol (G) (Meneses-Reyes et al., 2017). Este análisis BMP utilizó un microbioma de DA previamente estabilizado con pollinaza como materia prima. Once combinaciones de estos tres sustratos se evaluaron en diferentes proporciones utilizando microcosmos tradicionales en batch en pruebas de PBM. Se encontró que el tratamiento M-G-P 30:3:67 tuvo el rendimiento más alto ($131.1 \text{ mL CH}_4 \text{ g}_{\text{SValimentados}}^{-1}$) seguido por el tratamiento M-G-P 30:0:70 ($129.6 \text{ mL CH}_4 \text{ g}_{\text{SValimentados}}^{-1}$); ambos PBM fueron los más altos con respecto al control ($113.2 \text{ mL CH}_4 \text{ g}_{\text{SValimentados}}^{-1}$ M-G-P 0:0:100). En este estudio de seguimiento, hemos probado si estas tres mezclas de co-sustrato también podría aumentar la productividad de la DA en biorreactores continuos. El proceso incluyó la puesta en marcha y estabilización de biorreactores continuos utilizando P como materia prima y la adaptación correspondiente a las materias primas M-P y M-G-P. Se utilizó la AME como parámetro principal para la comparación.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Puesta en marcha de los digestores y estabilización de microbioma

Los primeros dos digestores de acero inoxidable con chaqueta se pusieron en marcha en diciembre de 2014. El volumen de trabajo fue de 10 L y 3 L de espacio de cabeza; cada digestor se inoculó con 2 L de inóculo que se tomó de un digestor de tipo laguna cubierta alimentado con estiércol de ganado lechero (Rancho La Hondonada en Querétaro, México). Ambos digestores se llenaron hasta el volumen de trabajo utilizando polvo de pollinaza (abertura de malla de 1 mm de tamaño de partícula) en solución acuosa al 1 % de sólidos totales (ST). La recirculación se llevó a cabo cada 3 horas con un flujo de 620 mL min^{-1} durante 15 min utilizando una bomba dosificadora de diafragma (modelo BL20 Black Stone, Hanna Instruments, Rumania). La temperatura se mantuvo a $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$; el tiempo de retención hidráulica (TRH) fue de 30 d. Los digestores se mantuvieron en esta condición durante 1 TRH. El siguiente paso fue cambiar la concentración de la alimentación a 2 % ST por 2 TRH, seguido por 3 % ST por 8 TRH. El último paso fue dividir equitativamente cada digestor, creando 3 nuevos digestores, y utilizando 3 % ST de alimentación para alcanzar el volumen de trabajo de 10 L. Con el fin de alcanzar las condiciones de estado estacionario para los nuevos digestores, se alimentaron con la misma concentración de 3 % ST cercano a 3 TRH (88 d).

Este punto fue designado como tiempo 0 para el presente trabajo. La AME se evaluó durante los días -2 a 0 para los seis digestores para verificar que tuvieron resultados similares antes de la aplicación de los tratamientos. La alimentación se cambió a la composición de los tratamientos el día 1. La AME se monitoreo durante más de 6 TRH y la comparación de tratamientos se realizó usando los datos desde el día 290 a 292. La Figura 3.1 resume todos los procedimientos descritos anteriormente.

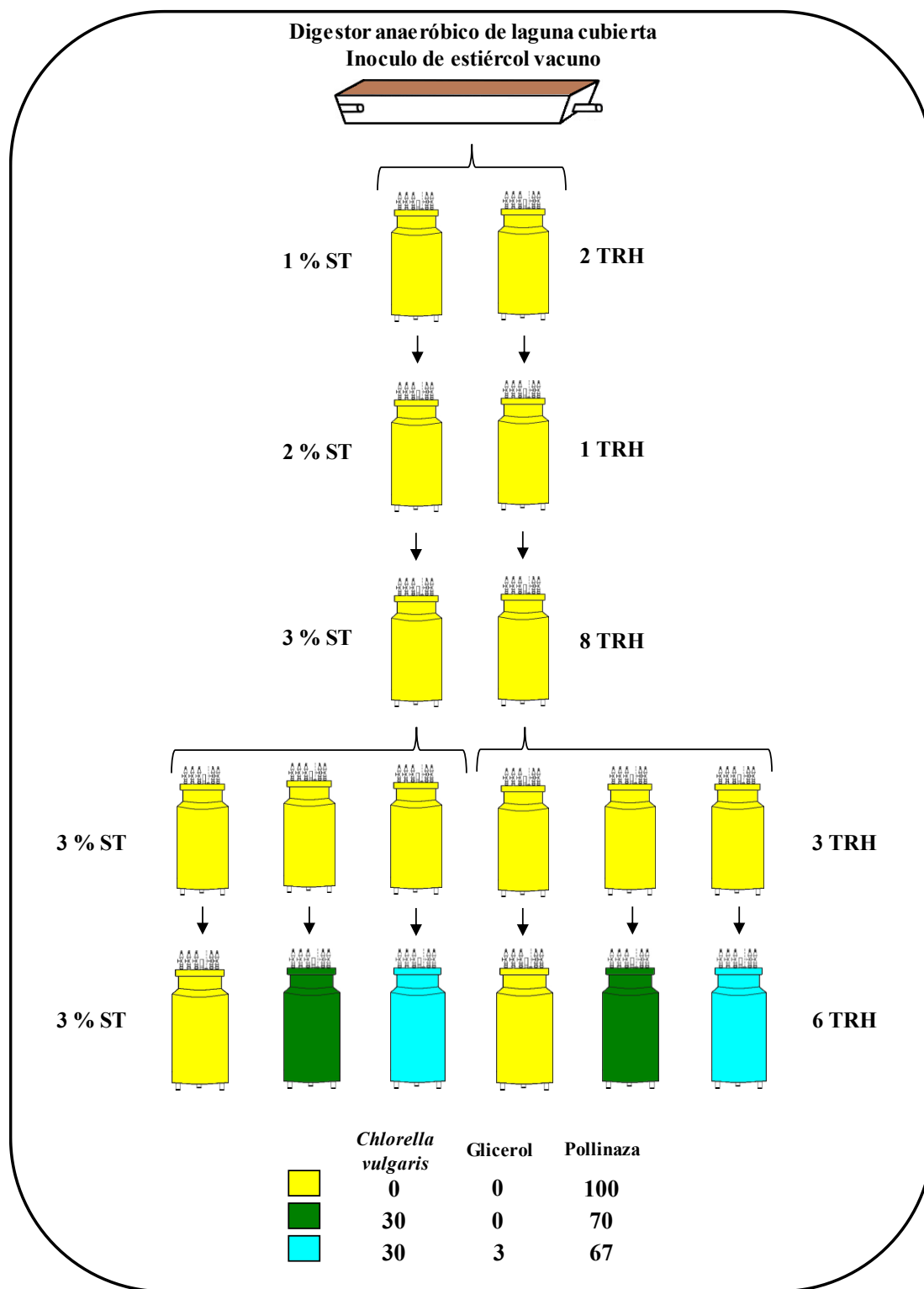


Figura 3.1. Puesta en marcha y estabilización de biorreactores continuos utilizando P como materia prima y la adaptación correspondiente a los tratamientos M-P y M-G-P.

3.4.2 Procedimiento experimental

Se usaron tres materias primas diferentes como se indica a continuación: glicerol grado United States Pharmacopeial (USP); biomasa de microalga libre de aceite de *Chlorella vulgaris* en polvo (FutureFoods Company, México); y pollinaza (de una granja avícola comercial en Tepetlaoxtoc, México). Las características de las materias primas se informaron anteriormente (Meneses-Reyes et al., 2017). Los tratamientos fueron combinaciones de M-G-P como sigue: 0:0:100, 30:0:70 y 30:3:67, que se denominaron como sigue P, M-P y M-G-P. Estos tratamientos fueron definidos con base a los resultados de las pruebas de PBM previamente reportadas por nuestro equipo (Meneses-Reyes et al., 2017); las relaciones C:N de los tratamientos fueron, respectivamente, 6.94, 6.79 y 8.15 (Meneses-Reyes et al., 2017). La concentración de la alimentación (3 % ST) y TRH (30 d) se mantuvieron constantes durante todo el experimento.

3.4.3 Métodos analíticos

Para los sustratos, ST, sólidos volátiles (SV), sólidos fijos (SF), y DQO fueron determinados utilizando los métodos estandarizados de APHA (1998), mientras que el nitrógeno amoniacal se determinó con el método 10031 (HACH, 2004). El pH se midió con un potenciómetro (Thermo Scientific Orion 5 Star, Singapur). El perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) se midió acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, iso-valerato, caproato, iso-caproato y heptanoato usando cromatografía de gases (CG) (Claurus 500, Perkin Elmer, EE.UU.) equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar Elite-FFAP con una longitud de 30 m y 0.32 mm de diámetro (Perkin Elmer, EE.UU.). Los AGV se determinaron usando una muestra de efluente el cual fue se acidificó a pH 3 con HCl y se centrifugó a 14,500 rpm durante 10 min (microcentrífuga modelo MiniSpin Plus Eppendorf, Alemania). El sobrenadante se inyectó con un auto-muestreador utilizando 5 μ L de volumen. Las condiciones de operación fueron las siguientes: flujo de gas 5 mL min⁻¹ a 10.6 psi, puerto de inyección a 150 °C, horno a 100 °C durante 8 min con rampa de 160 °C durante 8.5 min, detector de 250 °C y tiempo de retención de 16.5 min. Se utilizó helio como gas acarreador.

La solución Free Volatile Acid Mix grado analítico (46975-U, marca Sigma-Aldrich, EE.UU.) se usó como estándar.

La producción de biogás se cuantificó con un caudalímetro que utiliza el desplazamiento de volumen y un contador digital (LA8N-BN, Autonics, Corea). El contenido de metano se evaluó utilizando un CG (Claurus 500, Perkin Elmer, EE.UU.). Una muestra de 10 μL de biogás se introdujo en el CG; las condiciones de operación fueron las siguientes: flujo 14 mL min^{-1} a 14 psi, 100 °C en el puerto de inyección, 70 °C en el horno y 100 °C en el detector. El tiempo de retención fue de 4 min y se utilizó helio como gas acarreador. El porcentaje de metano se obtuvo usando una curva de calibración con metano puro (HDSP No. P-4618-F, Praxair, México). El contenido de metano se reporta como contenido en condiciones normales de temperatura y presión.

3.4.4 Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con el paquete SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.), cuando las diferencias fueron encontradas se aplicó la prueba de Tukey por comparación de medias ($\alpha = 0.05$).

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Rendimiento de los digestores

En la Figura 3.2 se presentan el pH, la concentración de metano y el nitrógeno amoniacal de las variaciones de los digestores, entre la división y estabilización de digestores con pollinaza y también la adaptación y estabilización a la nueva alimentación, donde ambos procesos se dividen por una línea discontinua. Está claro que desde el día -88, los seis digestores tuvieron un comportamiento similar. El pH permaneció prácticamente constante incluso desde el momento en que los dos digestores se dividieron en seis (día -88). Después del cambio de alimento en el día 1, el pH era casi constante independiente de la alimentación, que es un indicador de la estabilidad de los digestores. De manera similar, los cambios de concentración de metano siguieron el mismo patrón en el día -88: los digestores

tuvieron su valor más bajo que subió a partir del día -88 hasta el día -38; después de este período, las concentraciones de metano tuvieron ligeras variaciones. Los valores de nitrógeno amoniacal variaron más que los otros y alcanzaron valores más constantes para los tratamientos al final del período de estabilización.

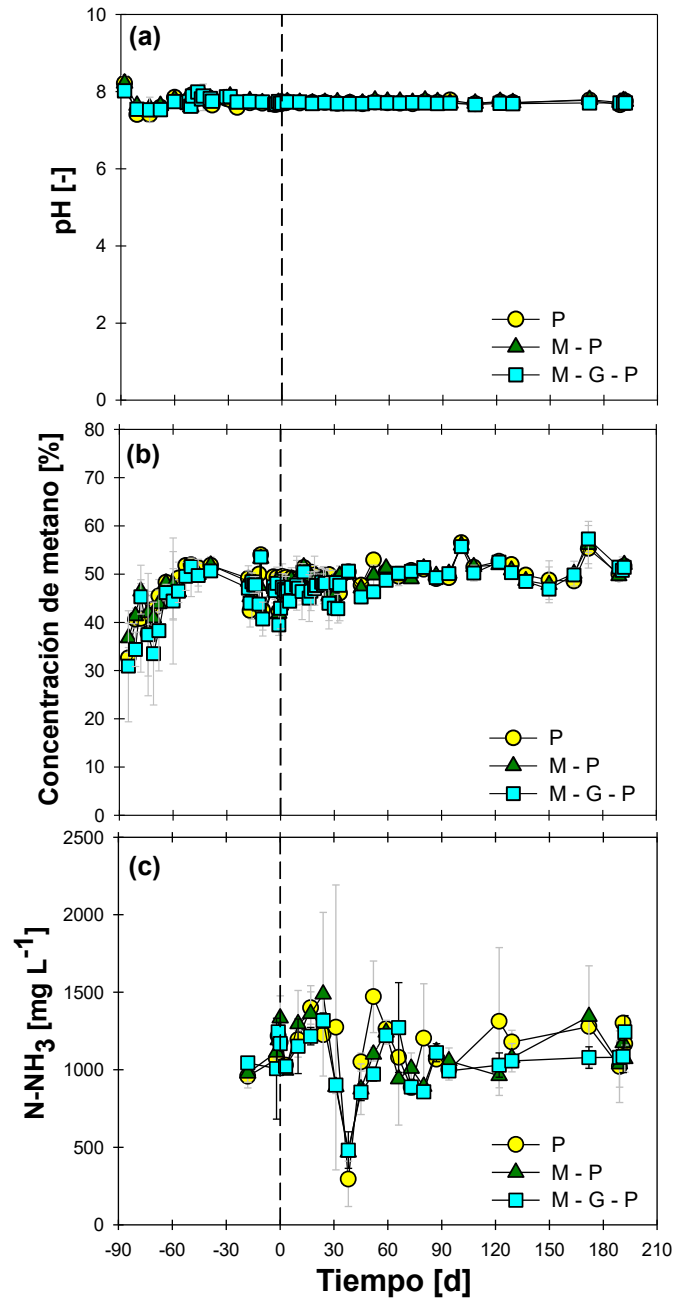


Figura 3.2 Cambios observados en las características fisicoquímicas de los biorreactores continuos antes y después de la adaptación a los tratamientos M-P y M-G-P, tomando P como control.

Durante los días -88 a 0, las concentraciones de AGV se vieron afectadas (Figura 3.3). Está claro que hubo acumulación de AGV de acetato, propionato y de cadena media en todos los tratamientos. La acumulación inicial se podría atribuir al hecho de que los microbios fueron probablemente estresados por la contaminación con oxígeno mientras se producía el proceso de partición. A pocos días después de dividir los biorreactores, las concentraciones de acetato y propionato alcanzaron los valores máximos en todos los tratamientos. Expresados en mg L^{-1} , eran los siguientes: P, 1117 y 403; M-P, 810 y 274; y M-G-P, 952 y 303. El acetato y el propionato disminuyeron, alcanzando valores bajos similares para los tres tratamientos al día cero. Los valores más altos fueron 169 mg L^{-1} para acetato y 74 mg L^{-1} para propionato que fueron relativamente bajos, lo que indica que los digestores tuvieron buenos resultados y no hubo efectos inhibidores. En el caso de un AGV más largos, los cambios en la concentración siguieron una tendencia similar a la del acetato y del propionato. Así, las condiciones para los digestores durante los tres tratamientos fueron prácticamente iguales cuando el cambio de alimentación tuvo lugar al día cero.

En la Figura 3.3 se muestra también que los AGV cambiaron después de cambiar la materia prima. Los tratamientos M-P y M-G-P tuvieron una reducción en las concentraciones de acetato y propionato, mientras que el control P mostró algunas variaciones durante el proceso. Las co-digestiones doble y triple tenían menor variabilidad y concentraciones de acetato y propionato con respecto al control. La co-digestión triple tuvo los niveles más bajos de acetato y propionato, lo que indica que la mayoría de estos ácidos grasos fueron consumidos por el microbioma, lo que podría resultar en una mejor producción de metano. En el caso de los AGV más largos, las concentraciones después de cambiar las materias primas eran bajas y la mayor parte del tiempo por debajo de 30 mg L^{-1} .

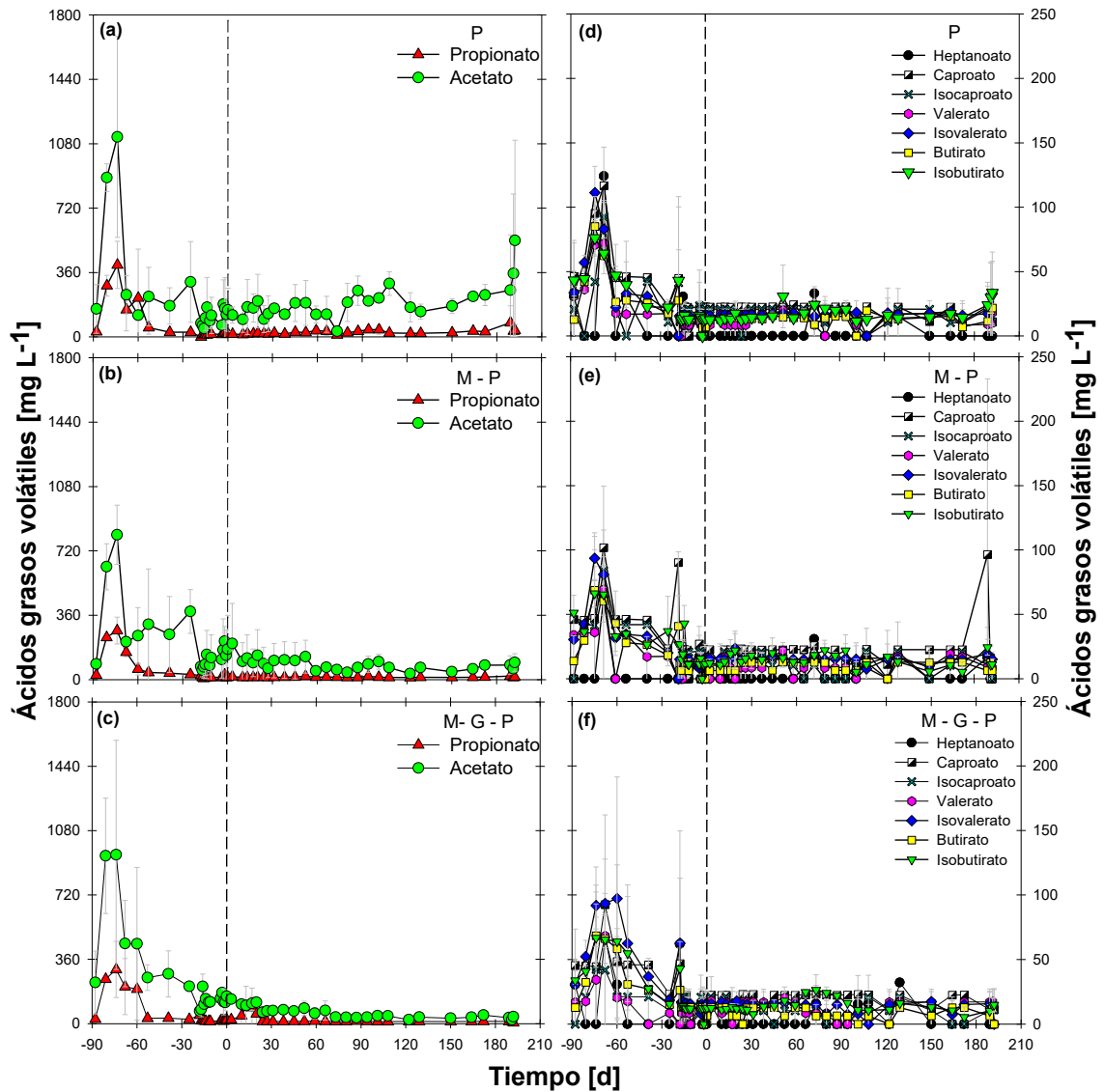


Figura 3.3 Cambios observados en los AGV de los biorreactores continuos antes y después de la adaptación a los tratamientos M-P y M-G-P, tomando P como control.

3.5.2 Actividad metanogénica específica

La Figura 3.4 muestra la AME para los tres tratamientos: P tuvo más variación que M-P y M-G-P. La comparación de AME se realizó en dos periodos: justo antes del cambio de alimentación (-2 a 0 días) y al final del proceso de estabilización (190 a 192 días). Los resultados presentados en la Tabla 3.1 indican que el pH y el nitrógeno amoniacal permanecieron prácticamente

constantes durante el período previo al cambio de alimentación y después de la estabilización de los reactores. En el caso de la concentración de metano, hubo diferencias estadísticas significativas en los tratamientos M-P y M-G-P, mostrando un aumento en las concentraciones. La AME en el período 0 a -2 días mostró que los reactores alimentados con M-G-P tenían valores más bajos que M-P y P, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, comparando los dos períodos, la AME fue mayor para M-P y M-G-P. Teniendo en cuenta el hecho de que se encontraron bajos niveles de acetato y propionato en los tratamientos M-P y M-G-P, se esperaba que los valores de AME más altos en estos tratamientos fueran esperados. La Tabla 3.1 muestra que los tratamientos con P, M-P y M-G-P aumentaron respectivamente 6.9, 67.7 y 99.8 mL de CH_4 $\text{g}_{\text{SVañadidos}}^{-1}$, lo que corresponde a mejoras de 3.7, 35.6 y 58.6 %. Los valores de AME observados después de la estabilización fueron, respectivamente, 194.2, 257.7 y 270.0 mL CH_4 $\text{g}_{\text{SVañadidos}}^{-1}$ para los tratamientos P, M-P y M-G-P. En comparación con el control, este fue un aumento de 32.7 y 39.0 % para M-P y M-G-P, respectivamente.

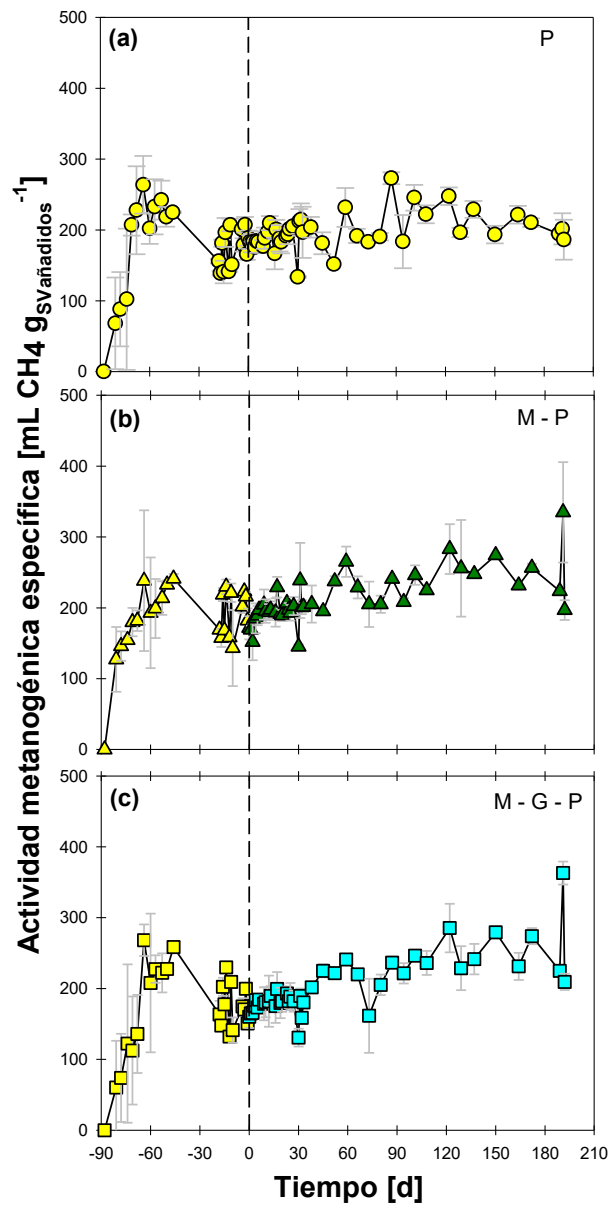


Figura 3.4. Cambios observados en la AME de los biorreactores continuos antes y después de la adaptación a los tratamientos M-P y M-G-P, tomando P como control.

Tabla 3.1. Cambios observados antes y después de los tratamientos.

Evaluación periodo [días]	Tratamiento o materia prima	pH [-]	CH ₄ [%]	N-NH ₃ [mg L ⁻¹]	AME [mL CH ₄ g _{SVañadidos} ⁻¹]
-2 a 0	P	7.7 ^a	45.9 ^{bc}	1153 ^a	187.3 ^{bc}
	P	7.7 ^a	44.7 ^c	1213 ^a	190.0 ^{bc}
	P	7.7 ^a	43.5 ^c	1140 ^a	170.2 ^c
190 a 192	P	7.7 ^a	50.9 ^{ab}	1161 ^a	194.2 ^{abc}
	M-P	7.7 ^a	50.9 ^{ab}	1094 ^a	257.7 ^{ab}
	M-G-P	7.7 ^a	51.2 ^a	1136 ^a	270.0 ^a

*Diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes en $\alpha = 0.05$.

Cuando se compara la AME con los datos de la literatura (Tabla 3.2), es posible ver que el valor para P es similar a otros estudios (Safley et al., 1987; Webb & Hawkes, 1985) en condiciones mesofílicas, pero inferior a las condiciones termofílicas (Sharma et al., 2013). La Tabla 3.2 también muestra que para la pollinaza la co-digestión mejora la AME (Borowski et al., 2014; Chow et al., 2015; Sharma et al., 2013). También es importante notar que el PBM, ha sido previamente reportado usando la misma alimentación (Meneses-Reyes et al., 2017), y la AME de este trabajo tienen la misma tendencia: el valor más bajo es para P, seguido de M-P, y el máximo para M-G-P. Este hecho podría atribuirse a la composición de la alimentación, que podría tener más nutrientes disponibles para la producción de metano, lo que se puede verificar por los bajos niveles de acetato y propionato observados durante la fermentación. Además, encontramos que la AME medida en los biorreactores continuos fue mucho mayor que el rendimiento en las anteriores pruebas del PBM (Meneses-Reyes et al., 2017). Esto es probablemente debido a las diferencias en la cinética de la vía metabólica de los reactores discontinuos contra los reactores de flujo continuo.

Tabla 3.2. Actividad metanogénica específica reportada para co-digestión anaeróbica continúa usando aves de corral, pollinaza, microalga y/o glicerol como sustrato.

Sustrato	Co-sustrato	Tipo de proceso	AME o PBM [mL CH ₄ g _{sv} ⁻¹]	Referencia
Cama de aves de corral	Ninguno	Continuo	150 – 215	(Webb & Hawkes, 1985)
Estiércol de aves de corral	Ninguno	Continuo	227	(Safley et al., 1987)
<i>Chlorella</i> spp.	<i>Scenedesmus</i> spp.	Continuo	90 – 143	(Yen & Brune, 2007)
50 % <i>Scenedesmus</i> spp. y <i>Chlorella</i> spp	50 % papel	Continuo	292	(Yen & Brune, 2007)
Cama de aves de corral ^a	Ninguno	Continuo	330 – 420	(Sharma et al., 2013)
40 % cama de aves de corral ^a	60 % Vinaza fina	Continuo	560	(Sharma et al., 2013)
10 % estiércol de aves de corral	70 % lodos de depuración 20 % estiércol de cerdo	Continuo	336	(Borowski et al., 2014)
84.4 % Estiércol de aves de corral	15.6 % Glicerol	Continuo	480	(Chow et al., 2015)
Pollinaza	Ninguno	Batch	113.2	(Meneses-Reyes et al., 2017)
70 % Pollinaza	30 % Microalga	Batch	129.6	(Meneses-Reyes et al., 2017)
67 % pollinaza	30 % Microalga 3 % Glicerol	Batch	131.1	(Meneses-Reyes et al., 2017)
Pollinaza	Ninguno	Continuo	194.2	<i>Presente trabajo</i>
70 % de pollo pequeño	30 % Microalga	Continuo	257.7	<i>Presente trabajo</i>
67 % pollinaza	30 % Microalga 3 % Glicerol	Continuo	270.0	<i>Presente trabajo</i>

^a Condiciones termofílicas

^b AME para continuo, PBM para Batch

3.6 Conclusión

La co-digestión con microalga libre con aceite, glicerol y pollinaza en condiciones mesofílicas tuvo una AME mejor que la co-digestión M-P y la P; que fueron 270.0, 257.7 y 194.2 mL CH₄ g^{SVañadidos}⁻¹ respectivamente. El tratamiento con la AME más alta (M-G-P, 30:3:67) tuvo una relación C:N de 6.94. Los perfiles de AGV mostraron diferencias entre los tratamientos, lo que sugiere diferencias en la disponibilidad de moléculas de sustrato fácilmente degradadas y las cinéticas de las rutas metabólicas.

3.7 Literatura citada

- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B. 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, **59**(5), 927-934.
- APHA, A., WPCF. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *20th ed*, Washington, DC, USA.
- Astals, S., Musenze, R.S., Bai, X., Tannock, S., Tait, S., Pratt, S., Jensen, P.D. 2015. Anaerobic co-digestion of pig manure and algae: Impact of intracellular algal products recovery on co-digestion performance. *Bioresource Technology*, **181**, 97-104.
- Baba, Y., Tada, C., Watanabe, R., Fukuda, Y., Chida, N., Nakai, Y. 2013. Anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer. *Bioresource Technology*, **140**, 342-348.
- Borowski, S., Domanski, J., Weatherley, L. 2014. Anaerobic co-digestion of swine and poultry manure with municipal sewage sludge. *Waste Management*, **34**(2), 513-521.

- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, **99**(10), 4044-4064.
- Chow, W.L., Chan, Y.J., Chong, M.F., Poh, P.E. 2015. Co-digestion studies of saleable glycerin with palm oil mill effluent and poultry manure. *Journal of Engineering Science and Technology*, **10**(8), 17-26.
- De Vrieze, J., Gildemyn, S., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D.H., Verstraete, W., Boon, N. 2014. Inoculum selection is crucial to ensure operational stability in anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**(1), 189-199.
- De Vrieze, J., Raport, L., Willems, B., Verbrugge, S., Volcke, E., Meers, E., Angenent, L.T., Boon, N. 2015. Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. *Microbial Biotechnology*, **8**(5), 776-786.
- Dong, T., Knoshaug, E.P., Davis, R., Laurens, L.M.L., Van Wychen, S., Pienkos, P.T., Nagle, N. 2015. Combined algal processing: A novel integrated biorefinery process to produce algal biofuels and bioproducts. *Algal Research*.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P. 2012. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **6**(2), 205-218.
- HACH. 2004. *Hach water analysis handbook. Method 10031. 4th ed*, Colorado, USA.
- 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.
- Malcata, F.X. 2011. Microalgae and biofuels: A promising partnership? *Trends in Biotechnology*, **29**(11), 542-549.
- Meneses-Reyes, J.C., Hernández-Eugenio, G., Huber, D.H., Balagurusamy, N., Espinosa-Solares, T. 2017. Biochemical methane potential of oil-extracted

- microalgae and glycerol in co-digestion with chicken litter. *Bioresource Technology*, **224**, 373-379.
- Mussnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O. 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, **150**(1), 51-56.
- Park, S., Li, Y. 2012. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. *Bioresource Technology*, **111**, 42-48.
- Posadas, E., Muñoz, R., Guieysse, B. 2017. Integrating nutrient removal and solid management restricts the feasibility of algal biofuel generation via wastewater treatment. *Algal Research*, **22**, 39-46.
- Prajapati, S.K., Malik, A., Vijay, V.K. 2014. Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. *Applied Energy*, **114**, 790-797.
- Safley, L.M., Vetter, R.L., Smith, L.D. 1987. Management and Operation of a Full-Scale Poultry Waste Digester. *Poultry Science*, **66**(6), 941-945.
- Sharma, D., Espinosa-Solares, T., Huber, D.H. 2013. Thermophilic anaerobic co-digestion of poultry litter and thin stillage. *Bioresource Technology*, **136**, 251-256.
- Usack, J.G., Angenent, L.T. 2015. Comparing the inhibitory thresholds of dairy manure co-digesters after prolonged acclimation periods: Part 1 - Performance and operating limits. *Water Research*, **87**, 446-457.
- Viana, M.B., Freitas, A.V., Leitão, R.C., Pinto, G.A.S., Santaella, S.T. 2012. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, **1**(1), 81-92.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, **99**(17), 7928-7940.
- Ward, A.J., Lewis, D.M., Green, F.B. 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, **5**, 204-214.

- Webb, A.R., Hawkes, F.R. 1985. Laboratory scale anaerobic digestion of poultry litter: Gas yield-loading rate relationships. *Agricultural Wastes*, **13**(1), 31-49.
- Wieczorek, N., Kucuker, M.A., Kuchta, K. 2014. Fermentative hydrogen and methane production from microalgal biomass (*Chlorella vulgaris*) in a two-stage combined process. *Applied Energy*, **132**, 108-117.
- Yen, H.-W., Brune, D.E. 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, **98**(1), 130-134.
- Yuan, X., Wang, M., Park, C., Sahu, A.K., Ergas, S.J. 2012. Microalgae growth using high-strength wastewater followed by anaerobic co-digestion. *Water Environment Research*, **84**(5), 396-404.

CAPITULO 4.

PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS A PARTIR DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* LIBRE DE ACEITE Y GLICEROL EN CO-DIGESTIÓN CON POLLINAZA USANDO UNA SOBREALIMENTACIÓN

PRODUCTION OF CARBOXYLIC ACIDS FROM OIL-EXTRACTED *Chlorella vulgaris* BIOMASS AND GLYCEROL IN CO-DIGESTION WITH CHICKEN LITTER USING OVERFEEDING ¹

4.1 Resumen

El objetivo de este trabajo fue aumentar la producción ácidos carboxílicos de cadena media de la co-digestión anaeróbica continua mesofílica utilizando residuos de biomasa de microalga libre de aceite (M) y glicerol (G) en co-digestión con pollinaza (P). El proceso incluyó la estabilización y la sobrealimentación. Los tratamientos contenían M-G-P con las proporciones 0:0:100, 30:0:70 y 30:3:67, designados como P, M-P y M-G-P. Los tratamientos fueron elegidos con base a lo obtenido en la evaluación del potencial bioquímico de metano (PBM) (Meneses-Reyes et al., 2017). Los biorreactores operaron a 30 d como tiempo de retención hidráulica (TRH) y la sobrealimentación duró 11 d con TRH de 20 d. El efecto de la sobrealimentación en los 3 tratamientos disminuyó la concentración de metano y la actividad metanogénica específica (AME) mientras el pH se mantuvo estable; al terminar la fase de sobrecarga, todos los digestores recuperaron las condiciones iniciales. Los ácidos carboxílicos generados al final de la sobrealimentación fueron acetato, propionato, isovalerato y butirato en orden de concentración. El tratamiento M-P obtuvo la mayor concentración de ácidos carboxílicos de cadena media con respecto al control P, con 1.23 g L⁻¹ (iC5) y 1.16 g L⁻¹ (C4), con una tasa de producción volumétrica de 0.11 g L⁻¹ d⁻¹ para ambos compuestos. Estos resultados demostraron que el uso de residuos de biodiesel (M y G) aumentaron la producción de ácidos carboxílicos de cadena media y los biorreactores continuaron con la producción de metano, siendo este proceso una alternativa para la generación de ambos productos.

Palabras claves:

Ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos de cadena media, microalga, residuos biodiesel

¹ José Carlos Meneses-Reyes, Guadalupe Hernández-Eugenio, David H. Huber, Nagamani Balagurusamy, Teodoro Espinosa-Solares.

4.2 Abstract

The objective of this work was to increase the production of medium chain carboxylic acids from mesophilic continuous anaerobic co-digestion using oil extracted microalgae (M) and glycerol (G) residues in co-digestion with chicken litter (CL). The process included stabilization and overfeeding. The treatments contained M-G-CL in proportions 0:0:100, 30:0:70 and 30:3:67, named as CL, M-CL and M-G-CL. The treatments were selected based on a predictive report on the evaluation of biochemical methane (BMP) potential (Meneses-Reyes et al., 2017). The bioreactors operated at 30 d of Hydraulic Retention Time (HRT) and overfeeding lasted 11 d with HRT 20 d. The overfeeding effect in the 3 treatments decreased the methane concentration and Methane Specific Activity (SMA) while the pH remained stable; finishing the overfeeding phase, all digesters recovered the initial conditions. The carboxylic acids generated to final process were acetate, propionate, isovalerate and butyrate in order of concentration. The M-CL treatment obtained the highest concentration of medium chain carboxylic acids with respect to control, with 1.23 g L^{-1} (iC5) and 1.16 g L^{-1} (C4), with a volumetric production rate of $0.11 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for both compounds. These results showed the use of biodiesel residues (M and G) increased the production of carboxylic acid medium chain and the bioreactors continued with the methane production, this process can be an alternative for the generation of both products.

Keywords:

Short chain fatty acids, medium chain fatty acids, microalgae, biodiesel residues

4.3 Introducción

Las microalgas son una opción prometedora para la producción sostenible de combustibles, debido a que reducen las emisiones de gases de efecto invernadero. Actualmente, la microalga *Chlorella vulgaris* se usa para la producción de biodiesel. Los residuos generados durante el proceso son la biomasa libre de aceite y glicerol. Ambos sustratos han tomado impulso como materia prima en el proceso de la DA, ya que puede producirse metano a partir de estos residuos (Ma et al., 2015). Una etapa en la DA es la acidogénesis, las bacterias acidogénicas convierten los productos de la etapa de hidrólisis inicial en hidrógeno, CO₂, acetato y ácidos grasos volátiles (AGV) (Franke-Whittle et al., 2014; Khan et al., 2016; Wang et al., 2015). Los AGV están formados por dos grupos que se clasifican por la longitud de cadena. Los ácidos grasos de cadena corta son carboxilatos de 2 a 6 carbonos, los ácidos grasos de cadena media son carboxilatos que contienen de 6 a 12 carbonos (Grootscholten et al., 2013c). Los sustratos más usados para el alargamiento de cadena son el acetato (C2) y etanol para producir carboxilatos con carbonos pares como el butirato (C4) y el caproato (C6) (Agler et al., 2011; Grootscholten et al., 2014; Spirito et al., 2014). La producción de carboxilatos con cadenas impares de carbono como valerato (C5) y heptanoato (C7) se realiza con los sustratos propionato (C3) y etanol (Agler et al., 2011; Grootscholten et al., 2013b). Las rutas metabólicas para realizar el alargamiento de cadena de carbono son mediante tres vías: 1. Homoacetogenesis el cual combina dos moléculas de dióxido de carbono en acetato; 2. formación de succinato para alargar el glicerol con un carbono a partir del dióxido de carbono (Spirito et al., 2014); y 3. reversa β -oxidación para el alargamiento de carboxilatos de cadena corta con la adición de dos carbonos de acetil-CoA derivado a partir del etanol en carboxilatos de cadena media (Agler et al., 2011; Spirito et al., 2014).

Este proceso es parte de la plataforma de carboxilato e incluye bacterias de microbioma que se han estudiado en diferentes configuraciones de reactor como batch, lecho fijo de flujo ascendente, batch de secuenciación anaeróbica y filtro

anaeróbico (Vasudevan et al., 2014). En estos procesos es necesario inhibir o eliminar la ruta metanogénica para evitar el consumo de estos compuestos por las arqueas (Khan et al., 2016; Vasudevan et al., 2014). Agler et al. (2012), lograron el alargamiento de cadena para la producción de n-caproico y la metanogénesis simultáneamente, siendo factible la producción de metano por la vía hidrogeno y dióxido de carbono y no por ácido acético controlando el pH a 5.5 en el biorreactor.

Estos productos intermedios son útiles para la producción de productos tales como cetonas, ésteres o alcoholes, que tienen aplicaciones industriales y actualmente son de interés económico mundial (Grootscholten et al., 2013c; Gruhn et al., 2016; Khan et al., 2016; Sarkar et al., 2016). El interés de estudiar la producción de ácidos carboxílicos es que son precursores adecuados para la producción de biopolímeros (PHA), acidulantes, conservadores y aromatizantes, y otros productos valiosos como biocombustibles (Grootscholten et al., 2013c; Khan et al., 2016; Sarkar et al., 2016). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar un ensayo para aumentar la producción ácidos carboxílicos de cadena media, inducidos por la sobrealimentación en un sistema de biorreactores continuos mesofílicos con residuos de biomasa de microalga y glicerol en co-digestión con pollinaza sin afectar la etapa de la metanogénesis.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Historial de los digestores

En un inicio, dos digestores de acero inoxidable con chaqueta fueron puestos en marcha en diciembre de 2014. El volumen de trabajo fue de 10 L con un espacio de cabeza 3 L; cada digestor se inoculó con 2 L de inóculo, que se tomó de un digestor de tipo laguna cubierta, alimentado con estiércol de ganado lechero ("Rancho La Hondonada" en Querétaro, México). Estos iniciaron con una alimentación semi-continua con pollinaza al 1 % de sólidos totales (ST) operando a un tiempo de retención hidráulica (TRH, 30 d) bajo condiciones mesofílicas, la recirculación se realizó cada 3 horas con una tasa de flujo de 620 mL min⁻¹

durante 15 min utilizando una bomba dosificadora de diafragma (modelo BL20 Black Stone, Hanna Instruments, Rumania). Durante 11 TRH, la alimentación fue aumentando gradualmente su concentración hasta el 3 % ST. El siguiente paso fue partir los 2 digestores en 6; los cuales se llenaron hasta el volumen de trabajo con pollinaza al 3 % ST, durante 3 TRH se mantuvo la alimentación al 3 %. Posteriormente, la alimentación se cambió en 4 digestores con dos tratamientos: microalga-pollinaza (M-P) y microalga-glicerol-pollinaza (M-G-P), y 2 digestores fueron el tratamiento control con pollinaza al 100 % (P). La estabilización de los biorreactores duró 6 TRH, a partir de este punto se consideró como día cero para el presente trabajo.

4.4.2 Procedimiento experimental

Tres diferentes materias primas fueron usadas que se mencionan a continuación: glicerol grado United States Pharmacopeial Convention (USP); biomasa de microalga libre de aceite de *Chlorella vulgaris* en polvo (FutureFoods Company, México); y pollinaza (obtenida de una granja avícola comercial en Tepetlaoxtoc, México). Las características de las materias primas fueron reportadas previamente por Meneses-Reyes et al. (2017). Los tratamientos fueron combinaciones de M-G-P como sigue: 0:0:100, 30:0:70 y 30:3:67, siendo asignados como P, M-P y M-G-P respectivamente. Los tratamientos fueron definidos a los resultados obtenidos de la prueba de potencial bioquímico de metano (PBM) (Meneses-Reyes et al., 2017); la relación C:N de los tratamientos fueron 8.15, 6.79 y 6.94. En el día 0, se realizó una sobrealimentación del 3 al 14 % ST, cambiando el TRH de 30 días a 20 días en los 6 digestores, en el día 11 finalizó la sobrealimentación y se continuó con las condiciones iniciales de operación.

4.4.3 Métodos analíticos

Para los sustratos, se determinaron los ST, sólidos volátiles (SV), sólidos fijos (SF) y DQO usando el APHA (1998), mientras que el nitrógeno amoniacal se determinó con el Método 10031 (HACH, 2004). El pH se midió con un

potenciómetro (Thermo Scientific Orion 5 Star, Singapur). Los perfiles de AGV se obtuvieron para los ácidos de acetato (C2), propionato (C3), butirato (C4), isobutirato (iC4), valerato (C5), iso-valerato (iC5), caproato (C6), isocaproato (iC6) y heptanoato (C7) usando cromatografía de gases (CG) (Claurus 500, Perkin Elmer, USA) equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar Elite-FFAP con una longitud de 30 m y 0.32 mm de diámetro (Perkin Elmer, USA). Los AGV se determinaron usando una muestra de efluente que se acidificó a pH 3 con HCl y se centrifugó a 14,500 rpm durante 10 min (microcentrífuga modelo MiniSpin Plus Eppendorf, Alemania). El sobrenadante se inyectó con un auto-muestreador utilizando 5 µL de volumen. Las condiciones de operación fueron las siguientes: flujo de gas 5 mL min⁻¹ a 10.6 psi, puerto de inyección a 150 °C, horno a 100 °C durante 8 minutos con rampa de 160 °C durante 8.5 min, detector a 250 °C y tiempo de retención de 16.5 min. Se utilizó helio como gas acarreador. Se utilizó como estándar Free Volatiles Mix grado analítico (46975-U, marca Sigma-Aldrich, USA).

4.4.4 Tasa de producción volumétrica

La tasa de producción volumétrica de los productos obtenidos del perfil de AGV es definida por su concentración dividida por el TRH (Ec. (1)). La unidad de la tasa de producción volumétrica es g L⁻¹ d⁻¹ (Grootscholten et al., 2013b).

$$Tasa\ de\ producción\ volumétrica = \frac{[producto] \left(\frac{g}{L}\right)}{HRT\ (d)} \quad (1)$$

4.5 Resultados y discusión

En la Figura 4.1, se presentan los análisis de pH, concentración de metano y la actividad metanogénica específica (AME) de los digestores. A partir del día -5, los tres tratamientos tuvieron un comportamiento similar. El pH permaneció prácticamente constante hasta el día 0 (pH 7.72). Después del cambio de alimento en el día 1, el pH disminuyó levemente hasta 7.47 en promedio en los 3 tratamientos, lo que es un indicador de la estabilidad de los digestores. En

cambio, la concentración de metano fue disminuyendo de 51.1 % en promedio en los días -5 a 0 hasta 39.3 % en el día 11, en el día 12 se volvió la alimentación a las condiciones iniciales (TRH de 30 d al 3 % ST), la concentración fue aumentando hasta estabilizarse en el día 24 con una concentración del 53.1 %. La AME de P, M-P y M-G-P del día -5 a 0 fueron de 165.3, 242.6 y 262.3 mL CH₄ gSVañadidos⁻¹ respectivamente, estos valores fueron disminuyendo con el tiempo hasta alcanzar una AME de P, M-P y M-G-P de 42.3, 64.9, 113.3 mL CH₄ gSVañadidos⁻¹ respectivamente en el día 11. El cambio de alimentación se realizó en el día 12 del 14 % a 3 % de ST, lo que presentó un incremento en la AME. A partir del día 31 empezó a estabilizarse el sistema.

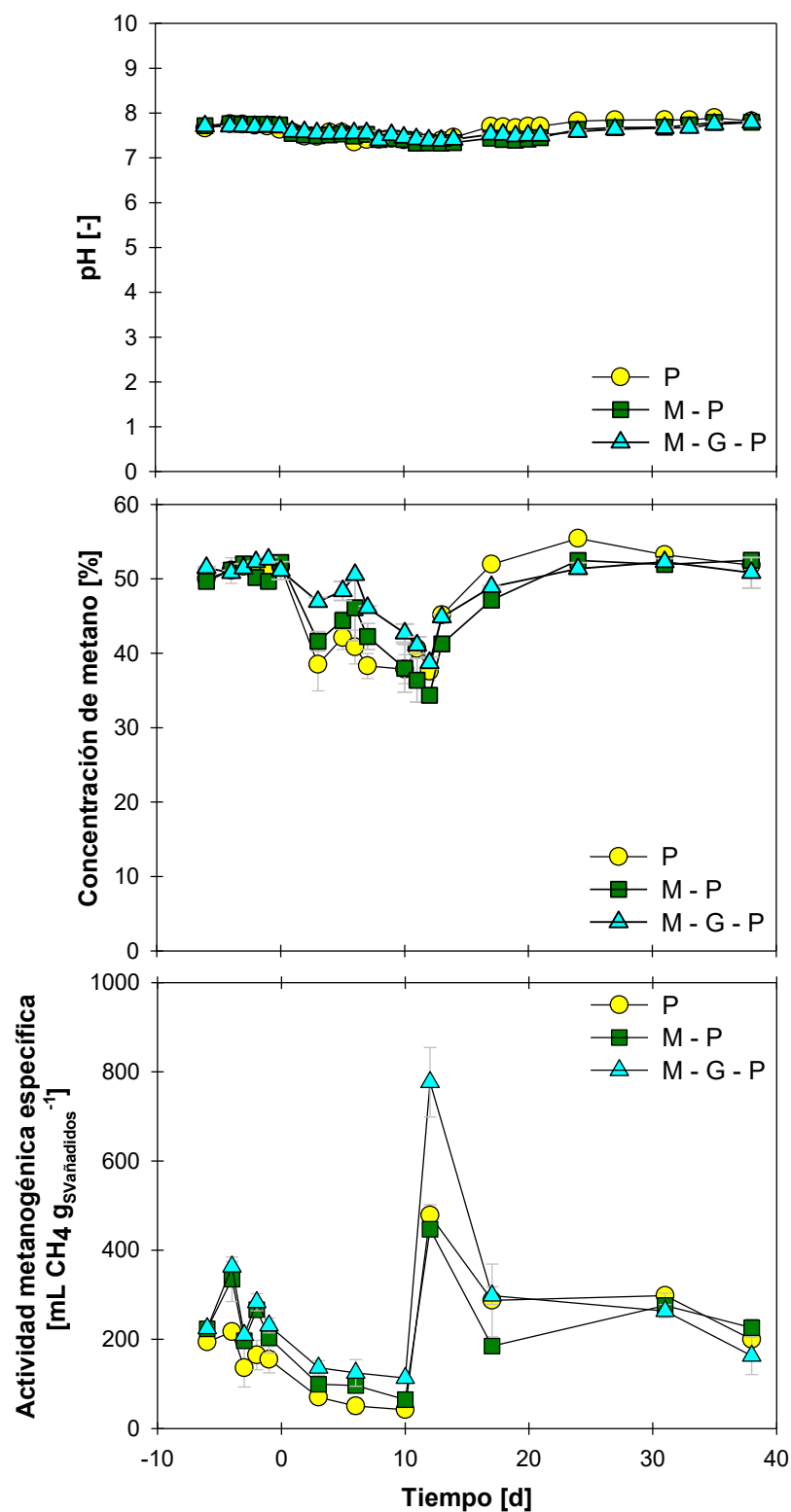


Figura 4.1 Cambios observados en las características físico-químicas y la AME de los biorreactores continuos antes y después de la sobrealimentación con las materias primas M-P y M-G-P, tomando P como control.

En la Figura 4.2, se presenta la producción de ácidos carboxílicos de cadena corta y media de los tres tratamientos, no se presentan iC6 y C7 debido a que no hubo producción de estos compuestos por la sobrealimentación. Como se puede observar, las concentraciones de los ácidos carboxílicos fueron bajas (0-753 mg L⁻¹) en los días -5 a 0 antes de realizar la sobrealimentación; a partir del día 1 las concentraciones de los ácidos carboxílicos incrementaron inmediatamente hasta alcanzar la máxima producción en el día 11. Los compuestos con mayor producción de ácidos carboxílicos (día 11) fueron C2, C3 para los 3 tratamientos. En tercer lugar, quedó C4 para P y en quinto lugar fue iC5 para M-P y M-G-P. Los tratamientos M-P y M-G-P tuvieron una producción similar. El tratamiento P tuvo una producción menor a partir del día 0; sin embargo, en el día 11 sólo los compuestos C3 y C6 alcanzaron producciones cercanas a los tratamientos M-P y M-G-P. La tasa de carga orgánica en la Figura 4.2 tuvo tendencias similares para los tratamientos M-P y M-G-P siendo menor con P.

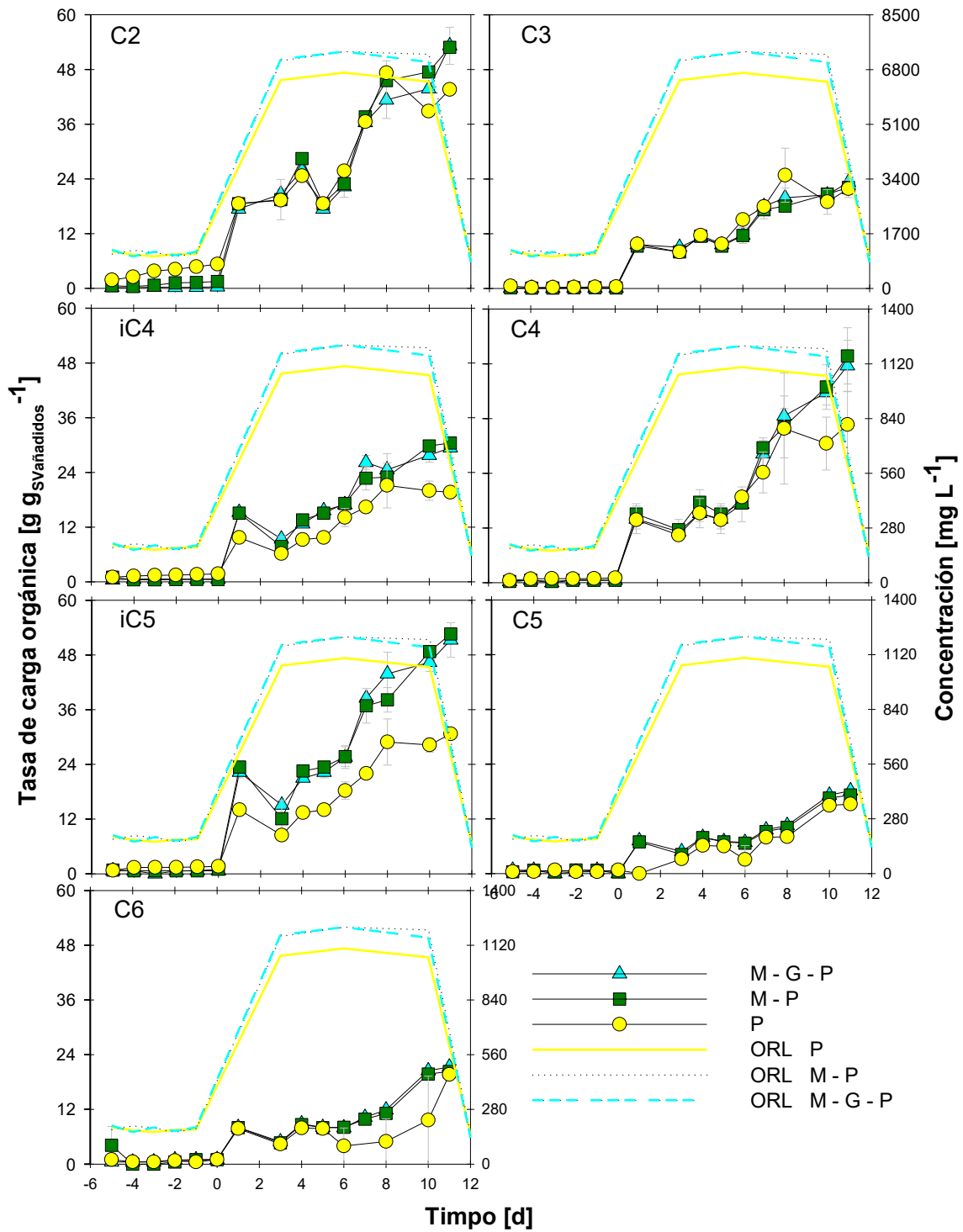


Figura 4.2. Concentración y tasa de carga orgánica de los ácidos carboxílicos de los biorreactores continuos antes y después de la sobrealimentación con las materias primas M-P y M-G-P, tomando P como control.

En la Tabla 4.1 se presentan trabajos referentes a la producción de ácidos carboxílicos mostrando el compuesto alimentado, los ácidos carboxílicos obtenidos, las condiciones de operación en el digestor y resultados. En la mayoría de los trabajos de investigación ingresan acetato, propionato, etanol o lactato de manera exógena al sistema de los digestores, con el fin de promover el incremento inmediato de la producción de los ácidos carboxílicos. Los principales compuestos producidos son butirato, caproato y heptanoato como se mencionan en la Tabla 4.1. Por ejemplo, Grootcholten et al. (2013b), trabajaron en digestores anaeróbicos con filtro de flujo ascendente a un TRH de 17 h mantenido un pH de 6.5 – 7.0. La alimentación fue con acetato, propionato y etanol para producir heptanoato principalmente. Ellos obtuvieron heptanoato a una concentración del 3.2 g L⁻¹ y una tasa de producción de 4.5 g L⁻¹, además de caproato y valerato con concentraciones de 4.9 g L⁻¹ y 4.6 g L⁻¹ respectivamente. Vasudevan et al. (2014), produjeron ácido n-caproico y ácido n-butírico usando como alimentación etanol y acetato en un reactor anaeróbico con filtro con un TRH de 14 h y pH 5.44. Estos autores obtuvieron una concentración de 1 g L⁻¹ y 19.4 g L⁻¹, con una tasa de producción de 1.7 g L⁻¹ d⁻¹ y 20 g L⁻¹ d⁻¹ respectivamente. Otro caso es la producción de n-caproato sintetizado a partir de lactato. Ellos compararon diferentes mezclas de alimentación usando etanol, glucosa y lactato, observaron que el lactato es más eficiente que alimentar etanol o glucosa o mezcla. Como resultado se obtuvo una concentración de 23.4 g L⁻¹ con una tasa de 2.97 g L⁻¹ d⁻¹, a un pH entre 5.5 y 6.5 (Zhu et al., 2015).

Con respecto al presente trabajo, las producciones de los ácidos carboxílicos son menores a los obtenidos por los autores antes mencionados (Tabla 4.1), esto se debe a que los digestores de dichas investigaciones están enfocados principalmente a la producción de estos compuestos; los digestores son alimentados exógenamente; inhiben la ruta metanogénica usando compuestos como el ácido 2-bromoetanosulfónico o cloroformo (Cavalcante et al., 2017; Grootcholten et al., 2013a); o el inóculo está ausente de microorganismos

metanogénicos con el fin de evitar que estos compuestos carboxílicos sean consumidos (Grootscholten et al., 2013b).

Tabla 4.1. Condiciones de extracción, concentración y tasa de producción volumétrica reportadas para ácidos carboxílicos.

Alimentación	Ácido carboxílico	pH	TRH [d]	Concentración [g L ⁻¹]			Tasa de producción volumétrica [g L ⁻¹ d ⁻¹]			Referencia
Acetato, propionato y etanol	C5	6.5 - 7.0	0.71	4.6			-			(Grootscholten et al., 2013b)
	C6			4.9			-			
	C7			3.2			4.5			
Acetato y etanol	C4	5.44	0.58	19.4			20			(Vasudevan et al., 2014)
	C6			1.0			1.7			
Lactato	C6	5.5 - 6.5	-	23.4			2.97			(Zhu et al., 2015)
Acetato y propionato	C2 C3 iC4 C4 iC5 C5 C6	7.4 - 7.7	11	P	M-P	M-G-P	P	M-P	M-G-P	Presente trabajo
				6.18	7.49	7.54	0.56	0.68	0.68	
				3.10	3.13	3.30	0.28	0.28	0.30	
				0.46	0.71	0.68	0.04	0.06	0.06	
				0.81	1.16	1.11	0.07	0.11	0.10	
				0.71	1.23	1.20	0.06	0.11	0.11	
				0.35	0.40	0.42	0.03	0.04	0.04	
				0.46	0.47	0.50	0.04	0.04	0.04	

A diferencia de las investigaciones anteriores, no fue necesario alimentar acetato o propionato debido a que se produjo de manera endógena por efecto de la sobrealimentación. Al finalizar la sobrecarga, la producción de metano se recuperó volviendo a las condiciones ideales lo que evitó la inhibición de la ruta metanogénica, lo que representa una alternativa para la producción de ambos procesos.

4.6 Conclusión

El efecto de la sobrealimentación en los digestores estabilizados disminuyó la concentración de metano en los tratamientos P, M-P y M-G-P de 51.1 % hasta 39.3 %, y la AME de 165.3, 242.6 y 262.3 mL CH₄ gSVañadidos⁻¹ hasta 42.3, 64.9, 113.3 mL CH₄ gSVañadidos⁻¹, manteniendo un pH estable (7.7-7.4). Al finalizar la sobrealimentación (día 12), la concentración de metano y la AME aumentaron

gradualmente hasta alcanzar las condiciones iniciales del proceso (día 31). En los 3 tratamientos se produjeron mayores cantidades de acetato, propionato, isovalerato y butirato (ordenados por concentración). Sin embargo, el tratamiento M-P fue el de mayor producción con 73.2 % y 43.2 % más de iC5 y C4, con una tasa de producción volumétrica de 83 % y 57 % mayor al tratamiento con pollinaza.

Los resultados obtenidos demostraron que el uso de residuos de biodiesel (M y G) aumentaron la producción de ácidos carboxílicos de cadena media y los biorreactores continuaron con la producción de metano, siendo este proceso una alternativa para la generación de ambos productos.

4.7 Literatura citada

- Agler, M.T., Spirito, C.M., Usack, J.G., Werner, J.J., Angenent, L.T. 2012. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. *Energy & Environmental Science*, **5**(8), 8189-8192.
- Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T. 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends in Biotechnology*, **29**(2), 70-78.
- APHA, A., WPCF. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed, Washington, DC, USA.
- Cavalcante, W.d.A., Leitão, R.C., Gehring, T.A., Angenent, L.T., Santaella, S.T. 2017. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. *Process Biochemistry*, **54**, 106-119.
- Franke-Whittle, I.H., Walter, A., Ebner, C., Insam, H. 2014. Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Management*, **34**(11), 2080-2089.
- Grootscholten, T.I.M., Kinsky dal Borgo, F., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. 2013a. Promoting chain elongation in mixed culture acidification reactors by addition of ethanol. *Biomass and Bioenergy*, **48**, 10-16.

- Grootscholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. 2013b. High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. *Bioresource Technology*, **136**, 715-718.
- Grootscholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. 2013c. Improving medium chain fatty acid productivity using chain elongation by reducing the hydraulic retention time in an upflow anaerobic filter. *Bioresource Technology*, **136**, 735-738.
- Grootscholten, T.I.M., Strik, D.P.B.T.B., Steinbusch, K.J.J., Buisman, C.J.N., Hamelers, H.V.M. 2014. Two-stage medium chain fatty acid (MCFA) production from municipal solid waste and ethanol. *Applied Energy*, **116**, 223-229.
- Gruhn, M., Frigon, J.-C., Guiot, S.R. 2016. Acidogenic fermentation of *Scenedesmus* sp.-AMDD: Comparison of volatile fatty acids yields between mesophilic and thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, **200**, 624-630.
- HACH. 2004. *Hach water analysis handbook. Method 10031. 4th ed*, Colorado, USA.
- Khan, M.A., Ngo, H.H., Guo, W.S., Liu, Y., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Deng, L.J., Wang, J., Wu, Y. 2016. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **219**, 738-748.
- Ma, J., Zhao, Q.-B., Laurens, L.L.M., Jarvis, E.E., Nagle, N.J., Chen, S., Frear, C.S. 2015. Mechanism, kinetics and microbiology of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion of algal biomass. *Biotechnology for Biofuels*, **8**(1), 141.
- Meneses-Reyes, J.C., Hernández-Eugenio, G., Huber, D.H., Balagurusamy, N., Espinosa-Solares, T. 2017. Biochemical methane potential of oil-extracted microalgae and glycerol in co-digestion with chicken litter. *Bioresource Technology*, **224**, 373-379.
- Sarkar, O., Kumar, A.N., Dahiya, S., Krishna, K.V., Yeruva, D.K., Mohan, S.V. 2016. Regulation of acidogenic metabolism towards enhanced short chain

- fatty acid biosynthesis from waste: metagenomic profiling. *RSC Advances*, **6**(22), 18641-18653.
- Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M., Angenent, L.T. 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Current Opinion in Biotechnology*, **27**, 115-122.
- Vasudevan, D., Richter, H., Angenent, L.T. 2014. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. *Bioresource Technology*, **151**, 378-382.
- Wang, Q., Jiang, J., Zhang, Y., Li, K. 2015. Effect of initial total solids concentration on volatile fatty acid production from food waste during anaerobic acidification. *Environmental Technology*, **36**(15), 1884-1891.
- Zhu, X., Tao, Y., Liang, C., Li, X., Wei, N., Zhang, W., Zhou, Y., Yang, Y., Bo, T. 2015. The synthesis of n-caproate from lactate: a new efficient process for medium-chain carboxylates production. *Scientific Reports*, **5**, 14360.

CAPITULO 5.

CONCLUSIONES

La microalga *Chlorella vulgaris* tiene el potencial de ser una fuente renovable para la producción de biodiesel, pero la alta producción de este biocombustible genera gran cantidad de biomasa libre de aceite. En el mismo proceso se genera glicerol proveniente de la transesterificación; este compuesto es útil en diversos usos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios, y aunque la demanda de este compuesto es importante se producen excedentes; ambos sustratos son considerados residuos que contaminan el medio ambiente. Por lo cual, se han dedicado estudios para su degradación siendo usados como materia prima en la DA.

En la DA el uso de la co-digestión es una práctica frecuente para evitar que sustratos particulares de manera individual mitiguen la producción de metano. Existen investigaciones que proponen el uso de microalga y glicerol como sustratos para la co-digestión logrando aumentar el rendimiento. Evaluar la idoneidad de las mezclas de estos sustratos antes de ser implementados a escala industrial es útil porque muchas variables pueden afectar la eficiencia de la DA.

Por tanto, en la primera parte se evaluó la factibilidad técnica de utilizar microalga *Chlorella vulgaris* libre de aceite y glicerol en codigestión con pollinaza para mejorar el PBM. Los resultados fueron que la mezcla M-G-P 30:3:67 aumentó el PBM (15.8 %) y tuvo el rendimiento más alto ($131.1 \text{ mL CH}_4 \text{ g}_{\text{SValim}}^{-1}$), el segundo tratamiento con mayor rendimiento fue M-P 30:70 que aumentó el PBM (14.1 %) con respecto al P 100.

En la segunda etapa, se eligieron los 2 tratamientos con mayor PBM para poner en marcha 6 digestores anaeróbicos mesofílicos continuos alimentados inicialmente con P al 100 % (tratamiento control), lo cual se evaluó el efecto de la bioconversión de metano de mono-digestión de pollinaza en un sistema

estabilizado a un proceso de co-digestión con *Chlorella vulgaris* y glicerol. Los resultados fueron que el cambio de alimentación P 100 a M-P 30:70 y M-G-P 30:3:67 no presentaron una perturbación y aumentó la AME un 48 % con el tratamiento M-G-P con respecto al control. Lo que permite confirmar el tratamiento en tri-codigestión con los resultados en el bioensayo de PBM tuvo mayor producción de metano que el tratamiento P 100.

En la tercera etapa fueron estabilizados nuevamente los digestores, posteriormente se realizó una sobrealimentación en los digestores con el objetivo de aumentar la producción ácidos carboxílicos de cadena corta y media en un sistema de co-digestión. La sobrealimentación generó gran cantidad de acetato, propionato, isovalerato y butirato (ordenados por concentración). El tratamiento M-P 30:70 obtuvo la mayor producción con 73.2 % y 43.2 % más de iC5 y C4, con una tasa de producción volumétrica de 83 % y 57 % mayor al tratamiento con pollinaza. Lo que demuestra que el uso de residuos de biodiesel (M y G) en la DA aumentaron la producción de ácidos carboxílicos y el efecto de la sobrecarga no afectó en gran medida la producción de metano. Debido a ello, puede considerarse un proceso alternativo para la generación de ambos productos.

5.1 Recomendaciones

Las recomendaciones que a continuación se plantean son para dar seguimiento y generar nuevas investigaciones en el tema de DA con residuos de biodiesel.

- a) Realizar un artículo científico referente al tema de la resiliencia por efecto de la sobrecarga de alimentación y saber su estabilidad de cada sistema.
- b) Realizar una segunda perturbación inoculando con microorganismos adaptados a propionato para observar si el efecto de sobrealimentación genera AGV y el tiempo de resiliencia es corto.
- c) Mejorar y aumentar la producción de ácidos carboxílicos, realizando una sobrealimentación con microorganismos adaptados a propionato.

- d) Analizar las poblaciones microbianas antes y después de realizar una perturbación para evaluar el efecto de adaptación y sobrevivencia, principalmente de microorganismos metanogénicos.
- e) Realizar un pretratamiento mediante el uso de hidrolisis en los sustratos con alto contenido de celulosa como la microalga y pollinaza para aumentar la AME y ser más eficiente el sistema.
- f) Fomentar el uso de microalga para la producción de biodiesel en México para no depender de combustibles fósiles. Usar la DA para la producción de ácidos carboxílicos y generar bioplásticos con el fin de disminuir la contaminación y sea más rentable este proceso.

Anaerobic digestion, from a philosophical point of view, is the “Animal (elephant) in a Darkroom,” a philosophic story written by Rumi (the great Persian poet) in his Masnavi. In this story, some Hindus were holding an elephant in a dark room, and many people gathered to see it. However, as the place was too dark to permit them to see the elephant, they all felt it with their hands to gain an idea of what it looked like. One felt its trunk and declared that the beast resembled a water-pipe; another felt its ear and said it must be a large fan; another felt its leg and thought it must be pillar; another felt its back and declared that the beast must be like a great throne. According to which part each person felt, he gave a different description of the animal. They all disagreed until they lit a candle.