

Evaluación del potencial del efluente de palma (POME) como medio de cultivo de la microalga de alto valor lipídico, *Chlorella vulgaris*, en su aplicación como fuente de biodiesel

Mariadaniela Bolaños Madriz

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación del potencial del efluente de palma (POME) como medio de cultivo de la microalga de alto valor lipídico, *Chlorella vulgaris*, en su aplicación como fuente de biodiesel

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Maríadaniela Bolaños Madríz

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2015

Evaluación del potencial del efluente de palma (POME) como medio de cultivo de la microalga de alto valor lipídico, *Chlorella vulgaris*, en su aplicación como fuente de biodiesel

Presentado por:

Maríadaniela Bolaños Madríz

Aprobado:

Patricio E. Paz, Ph.D.
Asesor principal

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Juan A. Ruano, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Evaluación del potencial del efluente de palma (POME) como medio de cultivo de la microalga de alto valor lipídico, *Chlorella vulgaris*, en su aplicación como fuente de biodiesel

Mariadaniela Bolaños Madríz

Resumen: La alta dependencia sobre los combustibles fósiles ha generado gran interés en la búsqueda de fuentes alternativas de energía, en respuesta a la fuerte competencia y demanda energética, el aumento en los precios del gas y petróleo y los impactos ambientales que la explotación de estos recursos genera. Es por esto que a partir de la década de los setenta, las fuentes de energía renovable han ido desarrollándose, aportando cada vez más a la potencia neta mundial añadida por año. Una de las fuentes de energía renovable que brinda esperanzas en la producción de energía limpia y que no compite por suelo arable, agua e insumos agrícolas para la producción de alimentos, es la generación de biocombustibles de tercera generación a partir de algas y microorganismos. *Chlorella vulgaris* posee el potencial de generar alta cantidad de lípidos con una acelerada tasa de crecimiento en aguas residuales como el POME; que tras recibir un tratamiento secundario de agua, aún posee alta carga de nitrógeno y fósforo residual; elementos clave para el crecimiento del alga. El objetivo de este estudio consistió en evaluar 25%, 50% y 75% POME como medio de cultivo para *Chlorella vulgaris*. Para esto, se determinó el crecimiento específico μ (d^{-1}), porcentaje de extracción, perfil de ácidos grasos y productividad en términos de peso seco y lípidos (mg/L/d). *Chlorella vulgaris* en 25% POME presentó los mejores resultados con un porcentaje de extracción de 12.90%, una productividad lipídica de 55.05 mg/L/d y una predominancia de ácido oleico en su perfil de lípidos (40.95%).

Palabras clave: Biocombustibles, *Chlorella vulgaris*, combustibles fósiles, efluente, energía renovable, POME.

Abstract: High dependency on fossil fuels has generated an interest in searching for alternatives to supply the high demand and reduce the environmental impact. Since the early seventies, renewable sources of energy have been developed, each contributing to the net production of energy. Of the sources of renewable energy with high potential is the generation of third generation biofuels from algae. *Chlorella vulgaris* has the potential to produce high amounts of lipids with an accelerated growth rate in residual waters such as palm oil meal extract (POME). The objective of this study was the evaluation of 25%, 50% and 75% POME as growth media for *Chlorella vulgaris*. The specific growth μ (d^{-1}) was determined as well as extraction percentage, fatty acid profile and productivity. *Chlorella vulgaris* in 25% POME presented the best results, with an extraction percentage of 12.9%, a lipid production of 55.05 mg/L/d and a predominance of oleic acid in its lipid profile (40.95%).

Keywords: Biofuel, *Chlorella vulgaris*, fossil fuel, POME, renewable energy.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4. CONCLUSIONES	18
5. RECOMENDACIONES	19
6. LITERATURA CITADA.....	20

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Rendimiento de Diferentes Cultivos Oleaginosos en kg de aceite por hectárea por año (kg/ha/año).....	3
2. Análisis de parámetros de interés de POME a partir del tratamiento secundario en piscinas facultativas de la empresa ECOPALSA para la producción de <i>Chlorella vulgaris</i>	5
3. Componentes del UTEX's Proteose Medium	6
4. Proporción de reactivos y agua destilada aplicados a la biomasa seca cosechada de <i>Chlorella vulgaris</i> para el método de extracción de aceite Bligh y Dyer.....	9
5. Especificaciones del cromatógrafo de gases Agilent 7890 ^a	10
6. Resultados de crecimiento específico, $\mu(d^{-1})$ de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada en POME.....	12
7. Parámetros productivos de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada en efluente de palma africana (POME)	12
8. Comparación de los parámetros productivos de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Chlorella sp</i> al ser cultivadas en medios con distintos porcentajes de POME.....	14
9. Perfil de ácidos grasos de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada en 25% POME y 75% agua.....	15
10. Perfil de ácidos grasos de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada en 50% POME y 50% agua.....	16
11. Perfil de ácidos grasos de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada en 75% POME y 25% agua	17

1. INTRODUCCIÓN

El acelerado aumento poblacional ha provocado que a partir de 1850 se observe un incremento en el uso de combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural) como respuesta a una creciente demanda energética; la cual espera un alza del 37% para 2035 (BP 2015). Esto se debe a que el uso de los recursos energéticos impacta la economía y sociedad a nivel residencial, industrial y en transporte. Tan sólo tomando el caso del petróleo, se proyecta que de los 21 millones de barriles/día que se espera se produzcan entre 2006 y 2030, el 80% de la producción sea destinada a la industria transportista; uno de los sectores más contribuyentes al crecimiento económico-social.

Las fuentes de energía primaria son aquellas que no han sufrido ninguna modificación química o física para su uso energético. En 2013, el 78% de la producción de energía primaria correspondió a fuentes de combustible fósil (EIA 2015). Estas fuentes están directamente ligadas a la concentración atmosférica de dióxido de carbono. Entre 1970 y 2004, del 70% de las emisiones antropogénicas mundiales de gases de efecto invernadero, el 56.6% fue generado por combustibles fósiles (Pachauri y Reisinger 2007). Y como si fuera poco, en los próximos 20 años se espera un incremento del 35% en las emisiones de CO₂, como respuesta a un aumento proyectado del 12% en el uso de recursos energéticos *per cápita* (BP 2015).

Esto genera una creciente preocupación en cuanto al futuro de los combustibles fósiles, considerando la fuerte competencia y demanda energética, el aumento en los precios del gas y petróleo y los riesgos que representan para la seguridad medioambiental. Es por ello que en 2005 se firmó el Protocolo de Kioto, que estimula la inversión en fuentes de energía renovable.

Según la UNEP, la inversión sobre fuentes renovables de energía y combustible creció un 17% en 2014 con respecto al año anterior. Esto (sin incluir fuentes de energía hidroeléctrica) representó el 48% de la potencia neta mundial añadida ese año (FS-UNEP 2015). Hoy, las fuentes de energía renovable representan un 3% del consumo energético mundial, con un incremento esperado del 5% sobre la oferta para 2035. De este incremento, casi dos tercios será provisto por energía eólica y solar, mientras que la generación de energía a base de biomasa vendrá creciendo en un 3.1% anual (BP 2015).

En América Latina, la estructuración energética al 2006 estaba conformada por 43.41% petróleo, 25.44% gas natural y 14.96% biomasa (leña y caña con un 8.8%) (Montenegro 2013). Este amplio aprovechamiento de los recursos provenientes de la biomasa, en comparación con otras regiones del mundo, provee una fuerte ventaja a los países latinoamericanos de generar energías limpias a bajo costo.

A partir de la crisis de los setenta, la biomasa ha resultado ser una fuente importante de biocombustible como alternativa a la alta dependencia del petróleo importado en Estados Unidos. Esto ha impulsado reformas que motivan el desarrollo de políticas energéticas; promoviendo nuevos estándares, normas, reglamentos e incentivos tributarios que favorecen la producción y uso de biocombustibles (Drenan 2007). Un claro ejemplo se observa con el "Renewable Fuel Standard" (RFS) promulgado por el "Energy Policy Act of 2005" y aprobado por el congreso de Estados Unidos. El RFS ha incrementado el uso mínimo anual de biocombustibles de 9 billones de galones en 2008 a 36 billones para 2022 (Schnepf y Yacobucci 2013). Este tipo de cambios en la legislación de muchos países, sumado a la fuerte gestión de investigación que busca potenciar fuentes mucho más eficientes y competitivas de energía renovable, ha llamado la atención a la industria de los biocombustibles.

Los biocombustibles se clasifican según su tipo de generación, la cual va incrementando según nivel de eficacia por unidad de área. Los biocombustibles de primera generación son aquellos que compiten directamente con el suministro de alimentos y provienen de la fermentación de los azúcares de cultivos como maíz y caña, la extracción de plantas oleaginosas como la colza y la palma o las grasas de origen animal. En la actualidad, existen fuertes críticas hacia los sistemas primarios de generación de biocombustible debido a la competencia por suelo arable, agua e insumos agrícolas que generan con respecto a cultivos destinados a la alimentación humana. Esto ha dado paso a los biocombustibles de segunda generación, que son aquellos producidos a partir de biomasa lignocelulósica y otros desperdicios como madera (Scragg 2009; Medina 2013).

Hoy en día, la tendencia apunta a la producción de biocombustibles de tercera generación a partir de algas y microorganismos. Las algas son organismos unicelulares o multicelulares, procariotas (p. ej. Cianobacterias de la clase *Cyanophyceae*) o eucariotas (p. ej. algas verdes de la división *Chlorophyta*) que varían ampliamente en cuanto a forma, color y tamaño (Mata *et al.* 2010).

La atención despertada por este tipo de biocombustibles de tercera generación se debe principalmente a las ventajas que presentan las algas para ser cultivadas. Esto se debe a su capacidad de sobrevivencia en ambientes que van desde salobres a salinos; su minúsculo tamaño (0.2-2 μ m) (Griffiths *et al.* 2011) que les permite una menor demanda de agua y espacio en comparación a otros cultivos, su rápida tasa de crecimiento (24 h para duplicar su peso inicial.) (Christi 2007), el potencial lipídico que presentan y la generación de derivados de alto valor biológico que se utilizan en industrias como farmacéutica, cosmética y alimenticia (Mata *et al.* 2010).

En términos de potencial lipídico, según la naturaleza de la cepa, la microalga puede llegar a producir entre 9 (58,700) y 23 (136,900) veces más litros de aceite por hectárea que la palma africana; el cultivo oleaginoso más productivo del momento (Cuadro 1) (Christi 2007).

Cuadro 1. Rendimiento de diferentes cultivos oleaginosos en kg de aceite por hectárea por año (kg/ha/año)

Cultivo	Rendimiento en aceite (L/ha)
Maíz	172
Soya	446
Canola	1190
Jatropha	1892
Coco	2689
Palma africana	5950
Alga ^a	58700
Alga ^b	136900

^a 30% de aceite en base a peso seco

^b 70% de aceite en base a peso seco

Para poder crecer, estas necesitan de luz, oxígeno, CO₂ y nutrientes. En cuanto a nutrientes, los elementos más comunes que forman parte del contenido celular de las microalgas se reflejan en la fórmula molecular de su biomasa: CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01} (Chisti 2007). Con una gran capacidad de aprovechar NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻ para su crecimiento, las algas pueden jugar un papel importante en la bioremediación de aguas residuales, que por lo general contienen trazas importantes de dichos compuestos (Mata *et al.* 2010).

Con NO₃⁻ y NH₄⁺ como las principales formas de nitrógeno disponible en el efluente de palma africana, se puede pensar en este tipo de agua residual como buen medio de cultivo para las microalgas (Fakir y Yakoob 2011).

En 2011 se produjo 48.5 millones de toneladas métricas de aceite de palma africana (FAOSTAT 2013). El llamado POME, que por sus siglas en inglés se lee como efluente de palma africana, es una suspensión coloidal, viscosa, color marrón que resulta de los procesos de esterilización, clarificación y trituración de las nueces durante el proceso de extracción del aceite. Generalmente, este se compone por 95-96% agua, 4-5% sólidos totales, 2-4% sólidos suspendidos y 0.6-0.7% aceite (Fakir y Yaakob 2011).

Se dice que por cada racimo de fruta fresca (RFF) procesado en planta, se generan 0.75 toneladas de efluente de palma africana (POME) (Fakir y Yaakob 2011). Esta vasta cantidad de efluente necesita ser tratada antes de poder verterse a cuerpos de agua, debido a que sus componentes orgánicos resultan ser fuertes contaminantes y pueden provocar procesos de eutrofización mortales para la fauna acuícola. Tratamientos secundarios (llámese físicos, químicos o biológicos) del efluente de palma aún dejan niveles importantes de nitrógeno y fósforo residual que pueden ser aprovechados (Cuadro 2), con lo cual se puede esperar que las microalgas cubran sus requerimientos nutricionales.

Típicamente, las extractoras de palma africana emiten CO₂ al ambiente debido a la combustión que se da en las calderas que alimentan de energía al sistema. Por su parte, las algas requieren de un suministro continuo de CO₂ para su proceso fotosintético de

crecimiento. Al ser cultivadas en POME, bajo tanques abiertos, estas serían capaces de utilizar el carbono inorgánico emitido por la planta extractora hasta en un 18% para el caso de cepas como *Chlorella vulgaris* (Wan-Loy 2012). Esta asimilación de CO₂ las hace fuente de energía carbono-neutral; es decir que sus emisiones de carbono equivalen al secuestro que realizan para fomentar su crecimiento. Acorde con Chisti, para producir 100 toneladas de biomasa seca a partir de algas, se requiere fijar 183 toneladas de CO₂.

Por estas razones, este estudio se realizó con el fin de evaluar el potencial del efluente de palma (POME) como medio de cultivo del alga de alto valor lipídico, *Chlorella vulgaris*, como fuente competente y de bajo costo para la elaboración de biodiesel; alternativa necesaria ante los combustibles fósiles.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El ensayo tuvo lugar en el Laboratorio de Biología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Esta está ubicada en el Valle del Yegüare; a 32 km de Tegucigalpa, carretera a Danlí, Honduras. Con una altura de 800 msnm, tiene una temperatura promedio anual de 26 °C y una precipitación media anual de 1,110 mm, distribuidos en los meses de mayo a noviembre.

Medio de cultivo

Se utilizó efluente de palma (POME) colectado de la piscina facultativa de la planta extractora Palmas Centro Americanas S.A., perteneciente al Grupo PALCASA. La extractora está ubicada en Aldea El Castaño, km 15. Carretera de El Progreso a Tela. El POME, tras ser colectado, se trasladó a Zamorano en recipientes de plástico, donde posteriormente se refrigeró a 4°C para detener procesos de biodegradación de sus componentes y evitar contaminación.

Cuadro 2. Análisis de parámetros de interés de POME a partir del tratamiento secundario en piscinas facultativas de la empresa ECOPALSA para la producción de *Chlorella vulgaris*

Parámetro	Método	Unidades	POME TRATADO
DQO	5220C	mg/L	1483
DBO	5210B	mg/L	71
Sólidos Totales	2540B	mg/L	5682.0
Ntotal	Kjendahl	ppm	40.6
Ptotal	8190 Method Acid Persulfate Digestion HACH	mg/L	72.5
Nitratos N-NO ₃	4500-NO ₃ B UV- Spectrophometric Screening	mg/L	7.23
Fosfatos P-PO ₃	8048 Method PhosVer3 (Ascorbic Acid) HACH	mg/L	62.25

Cepa y medio de cultivo sintético

Chlorella vulgaris se adquirió a través del UTEX (The Culture Collection of Algae) de la Universidad de Texas en Austin. La cepa, contenida en 15 ml de medio agar, se importó en un tubo plástico con tapón de rosca. *Chlorella vulgaris*, UTEX2714, fue aislada y recolectada por L.E. Gonzalez en 1994 y es originaria de Santa fe de Bogotá, Colombia.

El medio sintético de cultivo, “Proteose Medium” (Cuadro 3), también fue adquirido por medio del UTEX. Se hizo la compra de 6 tubos plásticos de tapón de rosca con un contenido de 15 ml de este medio líquido para reproducir el inóculo inicial.

Cuadro 3. Componentes del UTEX’s Proteose Medium

Componente	Cantidad	Concentración de la solución madre	Concentración final
NaNO ₃ (Fisher BP360-500)	10 mL/L	10 g/400mL dH ₂ O	2.94 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma C-3881)	10 mL/L	1 g/400mL dH ₂ O	0.17 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma 230391)	10 mL/L	3 g/400mL dH ₂ O	0.30 mM
K ₂ HPO ₄ (Sigma P 3786)	10 mL/L	3 g/400mL dH ₂ O	0.43 mM
KH ₂ PO ₄ (Sigma P 0662)	10 mL/L	7 g/400mL dH ₂ O	1.29 mM
NaCl (Fisher S271-500)	10 mL/L	1 g/400mL dH ₂ O	0.43 mM
Proteose Peptone (BD 211684)	1 g/L	-	-

Condiciones de cultivo

Chlorella vulgaris se trasladó a su medio de cultivo “Proteose Medium”, donde permaneció por 34 días en tubos de ensayo bajo luz constante. Posterior a ello, se cultivó la cepa en Erlenmeyers de 1,000 ml con un contenido de 500 ml de medio de cultivo en sus distintas proporciones POME y agua destilada: 25:75, 50:50 y 75:25, por duplicado. El POME fue filtrado con una bomba de vacío en un embudo Buchner con papel filtro Whatman de 12.5 cm. Cada tratamiento, en conjunto con su repetición, se inoculó a una concentración de 2.10×10^9 células de *Chlorella vulgaris*. (Para cada tratamiento se aplicó 20 mL de solución homogenizada con agua a una concentración de 105,156.25 células/ μ L).

La concentración inicial se obtuvo mediante conteo celular en una Cámara de Neubauer bajo un microscopio, aplicando la fórmula 1:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10,000}{\text{número de cuadros}} \quad [1]$$

Los Erlenmeyer se colocaron en un Baño María BW-20H a 26 ± 2 °C. Se les proveyó 40 Watts de luz blanca fluorescente bajo un régimen 16:8 horas luz durante los 23 días de duración del experimento. El oxígeno se suministró mediante una bomba de acuario LIFEGARD Quiet1One® 1200, conectada a un cerebro provisto de válvulas unidas a mangueras de silicón que fueron ensambladas a una piedra difusora.

Recolección de datos

El pH de los tratamientos se midió con un potenciómetro HI 7061 a partir del octavo día de cultivadas las algas. Además, se neutralizó el pH de todos los tratamientos con 1M de HCl hasta hacer llegar el pH a 7.2. Para la determinación del crecimiento específico, cada 3 a 4 días se obtuvo una muestra de 3 ml por cada tratamiento y se colocó en un espectrofotómetro Cary 8454 UV-Vis calibrado a 505 y 650 nm.

Los datos obtenidos de absorbancia se ingresaron en la siguiente fórmula para determinar crecimiento específico (Sacasa Castellanos 2013; Kamyab *et al.* 2015):

$$\text{Crecimiento específico } \mu \text{ (d.}^{-1}\text{)}: \frac{\ln DO_1 - \ln DO_0}{t_1 - t_0} \quad [2]$$

Dónde:

DO_1 = Densidad óptica al final del período

DO_0 = Densidad óptica al inicio del período

t_1 = Día de inicio del período

t_0 = Día final del período

Para el cálculo de productividad, tanto lipídica y en peso seco, así como también para porcentaje de extracción, se aplicó las siguientes fórmulas (Belotti *et al.* 2013; Kamyab *et al.* 2015):

Productividad en peso seco:

$$P_{ps} \text{ (mg/L/día)} = \frac{P_f}{t} \quad [3]$$

Dónde:

P_f = Peso de la biomasa seca al finalizar el experimento

t = Tiempo total de duración del experimento

Productividad lipídica:

$$P_l \text{ (mg/L/día)} = P_{ps} \times l \text{ (\%)} \quad [4]$$

Dónde:

P_{ps} = Productividad en peso seco

l = Contenido lipídico en porcentaje de extracción de aceite

Porcentaje de extracción:

$$\text{Rendimiento de extracción} = \frac{PLe}{PBs} \quad [5]$$

Dónde:

PLe = Peso de los lípidos extraídos

PBs = Peso de la biomasa seca

Cosecha de la biomasa y determinación del peso seco

Para la cosecha, los tratamientos se sometieron a un pretratamiento por floculación para concentrar las células de *Chlorella vulgaris* y garantizar una cosecha más eficiente. El procedimiento se realizó según lo ejecutado por Hadyianto y Nur (2014) con algunas modificaciones: se añadió 0.5M de NaOH hasta llevar el pH de cada tratamiento a 11.5. La adición de 0.5M de NaOH se hizo paulatinamente mediante el siguiente procedimiento: con un agitador magnético, se aplicó 1,000 rpm de agitación durante 10 minutos a cada tratamiento. Seguidamente, se disminuyó la velocidad de agitación a 250 rpm por un tiempo de 20 minutos. Durante ambos períodos se alcalinizó el pH gradualmente. Al finalizar, se dejó asentar los tratamientos durante 30 minutos.

Se tomaron muestras de 3 ml por cada tratamiento antes y después del floculado y fueron llevadas al espectrofotómetro para evaluar la eficiencia de floculación. Los resultados obtenidos por espectrofotometría fueron analizados con la fórmula de eficiencia de floculación:

$$\text{Eficiencia de floculación (\%)} = \left[\frac{DO_i - DO_f}{DO_i} \right] \times 100 \quad [6]$$

Tras el floculado de la microalga, los tratamientos fueron sometidos a un proceso de centrifugación mediante una centrífuga Symphony™ 4417R a 4,500 rpm durante 10 minutos. Se removió el sobrenadante y la biomasa colectada fue colocada en beakers de 25 ml y sometida a calor mediante un horno Fisher Scientific 750F a 105 °C durante 12 horas. Seguidamente, los beakers con la biomasa seca se colocaron en congelación a -20 °C para proseguir con la extracción del aceite al día siguiente.

Extracción

La extracción de aceite se hizo mediante el método Bligh & Dyer modificado (Bligh & Dyer; Ghasemi Naghdi *et al.* 2014). Por cada gramo de biomasa seca obtenida, se añadieron 5 ml de cloroformo y 10 ml de metanol. La mezcla biomasa-reactivos se sometió a agitación mediante un Fisher Vortex Genie 2™ por 5 minutos. Seguidamente se volvió a añadir 5 ml de cloroformo con 5 minutos de vortex y posteriormente se agregó 9 ml de agua destilada. El producto del procedimiento anterior se sometió a un centrifugado con una Symphony™ 4417R a 6000 rpm durante 20 minutos.

Cuadro 4. Proporción de reactivos y agua destilada aplicados a la biomasa seca cosechada de *Chlorella vulgaris* para el método de extracción de aceite Bligh y Dyer.

Tratamiento	Peso de la biomasa seca (g)	Cloroformo (ml)	Metanol (ml)	Agua destilada (ml)
25:75	0.103	1.025	1.025	0.873
25:75 ₂	0.093	0.930	0.930	0.923
50:50	0.105	1.047	1.047	0.942
50:50 ₂	0.099	0.989	0.989	0.890
75:25	0.084	0.838	0.838	0.754
75:25 ₂	0.074	0.743	0.743	0.669

Al séptimo día de ejecutado el procedimiento Bligh & Dyer para la extracción del aceite, se observó una separación de fases. El sobrenadante fue transferido a tubos de ensayo previamente pesados y colocados en una incubadora Thermolyne Type 42000 por 60 minutos a 60 °C para garantizar la completa evaporación de los reactivos.

Perfil de lípidos

Los tratamientos fueron sometidos a un perfil de lípidos grasos para determinar los ácidos grasos predominantes en el aceite; con lo cual se pudo evaluar el potencial como materia prima para la elaboración de biodiesel. El procedimiento para la preparación de metil-esteres de ácidos grasos se hizo acorde al método AOCS Ce 2-66. Las muestras preparadas se inyectaron mediante el método AOCS Ce 1j-07 en un cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Cuadro 5) para la posterior identificación de los picos presentes en la muestra de aceite.

Cuadro 5. Especificaciones del cromatógrafo de gases Agilent 7890A

Equipado con una cámara termostática para la columna capilar, capaz de mantener la temperatura deseada a 0.1°C.

Equipado con una unidad de inyección con control de temperatura, modo Split.

Equipado con un detector de ionización de llama con amplificador e integrador.

Equipado con una columna capilar: de silica fundida 100m x 0.25 mm x 0.25µm. Supelco SP™ 2560.

Gas de arrastre: Hidrógeno 99.99%, calidad cromatografía de gases, seco, sin oxígeno.

Gases de llama: Hidrógeno y aire, calidad cromatografía de gases.

Gas make-up: Nitrógeno.

Puerto de inyección Split liner: 4 mm l.d., 6.3 mm o.d. x 78.5 mm.

Diseño experimental

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistical Analysis System (SAS® 2013). Se usó el Modelo Linear General (GLM) con Bloques Completos al Azar (BCA) para evaluar el crecimiento específico de la microalga presente en cada uno de los tratamientos en los días 8, 10, 15, 19 y 23, a longitudes de onda de 505nm y 650nm. La separación de medias estuvo dada por el modelo de Fisher's Least Significance Difference (LSD), con una probabilidad exigida ≤ 0.05 .

Para las variables: peso seco, porcentaje de extracción, productividad en peso seco y productividad de lípidos, se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA), considerando una separación de medias por LSD y probabilidad igualmente exigida ≤ 0.05 .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento específico

El Cuadro 6 muestra el crecimiento específico por día tomado en los días 8, 10, 15, 19 y 23. Los máximos crecimientos específicos (1.29 d^{-1} y 1.08 d^{-1}) se observaron en los tratamientos 25:75 y 50:50 al día 23. Estos resultados sobrepasan los encontrados por Hadiyanto y Nur (2012), quienes obtuvieron un valor de $\mu=0.066 \text{ d}^{-1}$ al evaluar *Chlorella sp.* en 50% POME +1 g/L urea en 15 días de cultivo. Putri *et al.* (2011) y Kamyab *et al.* (2015) también obtuvieron valores menores comparados con este estudio ($\mu=0.084 \text{ d}^{-1}$ y $\mu=0.168 \text{ d}^{-1}$, respectivamente) al cultivar *Chlorella vulgaris* en Bold Basal Medium con POME como fuente de carbono y *Chlorella pyrenoidosa* en POME 10 veces diluido bajo un sistema HPBR (fotobiorreactor híbrido).

Según Serrano Bermúdez (2011) la disponibilidad del hierro como micro elemento para el crecimiento de microalgas “es vital para el funcionamiento del metabolismo, debido a su papel clave en el transporte de electrones, reducción de nitritos, nitratos y sulfatos, fijación del nitrógeno molecular y eliminación de especies reactivas como radicales libres y peróxidos.” El crecimiento específico más bajo encontrado en 75% POME y 25% agua se puede atribuir a la oscura coloración del medio debido a la alta concentración de POME, que genera ácidos tánicos (Hadiyanto *et al.* 2012) La presencia de ácidos tánicos como factores anti nutricionales que inhiben la absorción de minerales como el hierro, pudo haber afectado el crecimiento en este tratamiento (Sukumaran *et al.* 2014).

Esta tasa de crecimiento ($\mu=0.76 \text{ d}^{-1}$) también puede explicarse debido a la reducción celular que se generó a raíz de la disminución en la tasa fotosintética y asimilación de CO_2 bajo altas concentraciones de POME, que provocan un efecto sombra, limitando la penetración de luz al medio (Sukumaran *et al.* 2014).

Cuadro 6. Resultados de crecimiento específico, $\mu(d^{-1})$ de *Chlorella vulgaris* cultivada en POME

Tratamiento	Crecimiento específico por día (d^{-1})				
	Día 8	Día 10	Día 15	Día 19	Día 23
25:75	0.85 ^a	0.63 ^a	0.43 ^a	0.35 ^a	1.29 ^a
50:50	0.49 ^b	0.55 ^a	0.52 ^a	0.32 ^a	1.08 ^a
75:25	0.55 ^b	0.53 ^a	0.53 ^a	0.44 ^a	0.76 ^b
Probabilidad	$P \leq 0.0445$	$P \geq 0.5056$	$P \geq 0.4942$	$P \geq 0.4780$	$P \leq 0.049$

$R^2 = 0.74$

CV% = 32.56

^{ab}: Datos con letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas entre sí según la prueba LSD con una significancia de 5%

Parámetros de productividad

En el Cuadro 7 se muestran resultados de % extracción, productividad en peso seco (mg/L/d) y productividad lipídica (mg/L/d).

Cuadro 7. Parámetros productivos de *Chlorella vulgaris* cultivada en efluente de palma africana (POME)

Tratamiento	Peso Seco (g)	Rendimiento de extracción %	Pps (mg/L/día)	Pl (mg/L/día)
25:75	0.13	12.90	4.25 ^a	55.05
50:50	0.11	10.28	4.43 ^a	45.72
75:25	0.10	12.61	3.44 ^b	42.96
Probabilidad	$P \geq 0.5733$	$P \geq 0.78$	$P \leq 0.01$	$P \geq 0.57$
R^2	0.57	0.36	0.99	0.57
CV%	21.52	23.77	1.67	21.53

Pps: Productividad en peso seco

Pl: Productividad lipídica

^{ab}: Datos con letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas entre sí según la prueba LSD con una significancia de 5%

Productividad en peso seco

Los tratamientos 50:50 y 25:75 presentaron los mayores valores de productividad en peso seco; estadísticamente distintos al encontrado en el tratamiento 75:25. La máxima productividad en peso seco de 4.43 (mg/L/día) para el tratamiento 50:50 resulta baja al compararse con los valores de 5.90 (mg/L/día) y 100 (mg/L/día) encontrados por Putri *et al.* (2011) y Kamyab *et.al.* (2015), respectivamente.

Los bajos resultados en peso seco para este estudio pudieron deberse al pobre influjo de CO₂ en el sistema. Esto es comprobado por Mejía Rendón *et al.* (2013), que incrementó la biomasa de *Chlorella vulgaris* de 0.296 g/L a 1.592g/L al variar la cantidad de CO₂ suministrado al sistema, de 0.037% (concentración ambiental) a 8.5% (provisto por un tanque de aire comprimido).

Así mismo, Chinnasamy *et al.* (2009) concluyó que la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* cultivada a una concentración de 6% de CO₂, probó ser 99% mayor que aquella en la que *Chlorella* fue cultivada a una concentración ambiental de CO₂ luego de 10 días de incubación. Por otra parte, Hadiyanto y Nur (2014) explican que la baja producción de biomasa obtenida cuando cultivaron *Chlorella vulgaris* en un medio compuesto por 60% POME, se debe a la prolongada fase de latencia que presentó la microalga en su proceso de adaptación al medio.

Productividad lipídica

No se encontró diferencias significativas para productividad lipídica entre los tratamientos 25:75, 50:50 y 75:25. La mayor productividad lipídica obtenida en este estudio (55.05 mg/L/día) sobrepasa de los valores esperados (11.2-40.0 mg/L/día) encontrados en la literatura (Mata 2010). La máxima productividad lipídica que resultó del tratamiento 25:75 (55.05 mg/L/día) presenta un valor mayor al máximo encontrado por Hadiyanto y Nur (2014) al evaluar 20% POME + 40% nutrientes sintéticos (37.4 mg/L/día). Resultados encontrados indican una gran eficiencia en la transformación de biomasa seca en aceite.

Porcentaje de extracción

Los porcentajes de extracción encontrados en este estudio se asemejan a los obtenidos por Hadiyanto y Nur (2014), en los que se reporta un rendimiento del 14% al cultivar *Chlorella sp.* en abonos de lechería digeridos y aguas municipales residuales, respectivamente. Por su parte, este estudio refleja mejores resultados a los datos obtenidos por Hadiyanto y Nur (2014), al evaluar distintos porcentajes de POME + nutrientes sintéticos. La comparación entre ambos estudios se muestra a continuación en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Comparación de los parámetros productivos de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella* sp al ser cultivadas en medios con distintos porcentajes de POME.

Medio de cultivo	Tiempo de cultivo	Crecimiento específico $\mu(d^{-1})$	% de extracción	Productividad lipídica
20%POME +40% SN ^δ	7	0.749	6.9	37.4
40%POME+60% SN ^δ	7	0.531	7.3	25.9
60%POME+80%SN ^δ	7	0.269	7.6	11.8
25% POME ^β	23	1.29	12.9	55.05
50% POME ^β	23	1.08	10.28	45.72
75% POME ^β	23	0.76	12.61	42.96

^δ Tratamiento aplicado a *Chlorella* sp.

^β Tratamiento aplicado a *Chlorella vulgaris*

Perfil de lípidos

A continuación, en los Cuadros 9, 10 y 11, se ilustran los perfiles de ácidos grasos obtenidos por cada tratamiento. Estos resultados difieren de los obtenidos por Hadyianto y Nur (2014), quienes en un medio conformado por 20% POME + 40% SN, obtuvieron (para *Chlorella* sp) un perfil caracterizado por: 65,34% ácido palmítico, 14,71% ácido oleico y 7,73% ácido linoleico; demostrando que la genética tiene un impacto sobre el tipo de ácidos grasos producidos por la cepa.

Así mismo, las ligeras variaciones en los porcentajes de ácidos grasos entre tratamientos, se deben a diferencias nutricionales en los medios de cultivo, como lo establecido por Sharma *et al.* (2012), quien propuso que las algas modifican el metabolismo lipídico según cambios en las condiciones en las que se encuentran; resultando en patrones variables y poco comunes en los lípidos obtenidos a partir de las algas. Por ejemplo, bajo condiciones de estrés, las algas modifican la biosíntesis de lípidos, acumulando lípidos neutrales (Sharma *et al.* 2012). Por su parte, los porcentajes de ácidos saturados resultan ser positivos para la elaboración de biodiesel.

Cuadro 9. Perfil de ácidos grasos de *Chlorella vulgaris* cultivada en 25% POME y 75% agua.

Análisis	T1	T1R	%R1	%R2	Promedio	%C V	Método de referencia
TOTAL GRASA SATURADA	4.9	2.4	40.2	40.6	40.4	0.7	AOAC 996.06
ÁCIDO HEXADECANOICO (PALMÍTICO)	4.0	1.8	32.4	30.5	31.5	4.4	AOAC 996.06
ÁCIDO OCTADECANOICO (ESTEÁRICO)	0.9	0.6	7.8	10.2	8.9	18.7	AOAC 996.06
TOTAL GRASA MONOINSATURADA	5.4	2.2	43.6	38.4	40.9	8.9	AOAC 996.06
ÁCIDO OCTADECENOICO (OLEÍCO)	5.4	2.2	43.6	38.4	40.9	8.9	AOAC 996.06
TOTAL GRASA POLIINSATURADA	2.0	1.2	16.2	21.0	18.6	18.2	AOAC 996.06
ÁCIDO OCTADECADIENOICO (LINOLEÍCO)	2.0	1.2	16.2	21.0	18.6	18.2	AOAC 996.06
TOTAL GRASA TRANS	0	0	0	0	0	0	AOAC 996.06
Total área	12.3	5.8	100	100	100		

Cuadro 10. Perfil de ácidos grasos de *Chlorella vulgaris* cultivada en 55% POME y 50% agua.

Análisis	T2	T2R	%R1	%R2	Promedio	%CV	Método de referencia
TOTAL GRASA SATURADA	3.9	2.2	62.3	53.4	57.8	10.9	AOAC 996.06
ÁCIDO HEXADECANOICO (PALMÍTICO)	1.5	0.7	24.4	17.8	21.1	22.3	AOAC 996.06
ÁCIDO OCTADECANOICO (ESTEÁRICO)	2.4	1.5	37.9	35.6	36.7	4.4	AOAC 996.06
TOTAL GRASA MONOINSATURADA	1.0	1.1	16.0	27.2	21.6	36.7	AOAC 996.06
ÁCIDO OCTADECENOICO (OLEICO)	1.0	1.1	16.0	27.2	21.6	36.7	AOAC 996.06
TOTAL GRASA POLIINSATURADA	1.4	0.8	21.7	19.5	20.6	7.7	AOAC 996.06
ÁCIDO OCTADECADIENOICO (LINOLEICO)	1.4	0.8	21.7	19.5	20.6	7.7	AOAC 996.06
TOTAL GRASA TRANS	0	0	0	0	0		AOAC 996.06
Total área	8.3	4.9	116.4	110.0	113.2		

Cuadro 11. Perfil de ácidos grasos de *Chlorella vulgaris* cultivada en 75% POME y 25% agua.

Análisis	T3	T3R	%R1	%R2	Promedio	%CV	Método de referencia
TOTAL GRASA SATURADA	3.1	1.9	39.4	41.4	40.4	3.5	AOAC 996.06
ÁCIDO HEXADECANOICO (PALMÍTICO)	2.1	1.1	26.4	22.2	24.3	12.4	AOAC 996.06
ÁCIDO OCTADECANOICO (ESTEÁRICO)	1.0	0.9	13.0	19.2	16.1	27.5	AOAC 996.06
TOTAL GRASA MONOINSATURADA	2.9	1.8	37.1	38.6	37.9	2.8	AOAC 996.06
ÁCIDO OCTADECENOICO (OLEICO)	2.9	1.8	37.1	38.6	37.9	2.8	AOAC 996.06
TOTAL GRASA POLIINSATURADA	1.9	0.9	23.5	20.0	21.8	11.3	AOAC 996.06
ÁCIDO OCTADECADIENOICO (LINOLEICO)	1.9	0.9	23.5	20.0	21.8	11.3	AOAC 996.06
TOTAL GRASA TRANS	0	0	0	0	0	0	AOAC 996.06
Total área	7.9	4.7	100	100	100		

4. CONCLUSIONES

- El efluente de palma (POME) en concentraciones de 25% y 50% resulta ser un medio potencial para la producción de microalga.
- A mayor concentración de POME, menor es la productividad en peso seco, aunque los demás parámetros productivos no muestren diferencia significativa con los demás tratamientos.
- Se debe buscar cepas robustas y de mayor valor lipídico que puedan ser cultivadas en tanques abiertos para mayor factibilidad económica.

5. RECOMENDACIONES

- Buscar un método de trans-esterificación más eficiente en extraer los ésteres mono alcalinos de ácidos grasos.
- Proveer un flujo externo de CO₂ para mejorar la tasa de crecimiento.
- Llevar el estudio a gran escala en tanques abiertos en conjunto con un análisis de factibilidad económica.
- Encontrar una longitud de onda óptima para la identificación de concentración celular en el espectrofotómetro al utilizar POME como medio de cultivo.
- Realizar análisis de calidad de Biocombustible.
- Realizar un análisis más extensivo de los componentes del POME para determinar factores que pueden influir en el cultivo de *Chlorella vulgaris*.

6. LITERATURA CITADA

BP Energy Outlook 2035, Country and Regional Insights – Global 2015. (en línea). Consultado 6 jun. 2015. Disponible en http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/Energy-economics/energy-outlook-2015/Energy_Outlook_global_insights_2035.pdf

Cambio Climático 2007: Informe de Síntesis. 2007. Pachauri, R.K. y Reisinger, A. 4 ed. Ginebra, CH. Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático IPCC. p. 104

Chinnasamy, S., B. Ramakrishnan, A. Bhatnagar y K.C. Das. 2009. Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. International Journal of Molecular Sciences 10 (2):518-532.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. Biotechnology Advances 25: 294–306.

Drenan, T. 2007. El Mercado del Biodiésel en Estados Unidos. PALMAS 28 (2):358-362.

EIA (U.S. Energy Information Administration), Office of Integrated and International Energy Analysis. 2015. Annual Energy Outlook 2015: With projections to 2040. Washington, US. DOE/EIA-0383.

Fakir, K. y Z. Yakoob. 2011. An Overview of Microalgae as a Wastewater Treatment. In Proceedings of the Jordan International Energy Conference (JIEC) (Amman, JO). Universiti Kebangsaan Malaysia, Malaysia

FS (Frankfurt School), UNEP Collaborating Centre for Climate & Sustainable Energy Finance 2015. Global Trends in Renewable Energy Investment 2015.

Ghasemi, N., S.R. Thomas-Hall, R. Durairatman, S. Pratt y P.M. Schenk. 2014. Comparative Effects of Biomass Pre-Treatments for Direct and Indirect Transesterification to Enhance Microalgal Lipid Recovery. Frontiers in Energy Research 2(57):1-10

Griffiths, M., R. Dicks, C. Richardson y S. Harrison. 2001. Advantages and Challenges of Microalgae as a Source of Oil for Biodiesel. In Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies. Ed. Stoytcheva, M. ISBN: 978-953-307-713-0.

Hadiyanto Nur, M.M.A. 2012. Potential of Palm Oil Mill Effluent (POME) as Medium Growth of *Chlorella sp* for Bioenergy Production. International Journal of Environment and Bioenergy. 3(2): 67-74.

Hadiyanto Nur, M.M.A. 2014. Lipid Extraction of Microalga *Chlorella* sp. Cultivated in Palm Oil Mill Effluent (POME) Medium. *World Applied Sciences Journal* 31 (5): 959-967.

Kamyab, H., M. Din, S. Mat Taib, J.S. Lim, A. Khudnair y C.T. Lee. 2015. Effect of Light and Carbon Source for the Production of Lipid by *Chlorella pyrenoidosa* using Agricultural Wastewater in Malaysia. *In The 3rd International Conference on Sustainable Solid Waste Management. (3rd 2015, GR) Proceedings 2015. Malaysia. p. 1-12.*

Mata, T., A. Martins y N. Caetano. 2010. Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Vol.14 p.217-232

Medina, JM. 2013. Biofuels and Food Security. *In Food Security and Global Security. (2013, España) IEEE. p. 196-224.*

Mejía Rendón, S., G.J. Colmenares Roldan y R.P. Voroney. 2013. Effect of Carbon Dioxide Concentration on the Growth Response of *Chlorella vulgaris* Under Four Different Led Illumination. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 3(2):125-131.

Montenegro Orozco, J. 2013. Panorama de las Energías Renovables y de la Eficiencia Energética en América Latina. Ecuador. OPSA-PUCE. p.5

Nigam, S., M. Prakash Rai y R. Sharma. 2011. Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella pyrenoidosa*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 7 (3): 124-129.

Pachauri, R.K. y A. Reisinger. 2007. Climate Change: Synthesis Report. IPCC, Geneva, Switzerland. 104 p.

Putri, E.V., M.F.M. Din, Z. Ahmed, H. Jamaluddin y S. Chelliapan. 2011. Investigation of Microalgae for High Lipid Content using Palm Oil Mill Effluent (Pome) as Carbon Source. *In 2011 International Conference on Environment and Industrial Innovation IPCBEE (2011, Kuala Lumpur, MY) Vol. 12. p. 85-89.*

Sacasa Castellanos, C. 2013 Batch and Continuous Studies of *Chlorella Vulgaris* in Photo-Bioreactors. M.E.Sc.Thesis. Ontario, Canada. The University of Western Ontario. 68 p.

Schnepf, R. y B.D. Yacobucci. 2013. Renewable Fuel Standard (RFS): Overview and Issues. Congressional Research Service. 31 p.

Scragg, A.H. 2009. Biofuels: Production, Application and Development. Londres, UK. CABI. 237 p.

Selmani, N., M. Mirghani y Z. Alam. 2013. Study the Growth of Microalgae in Palm Oil Mill Effluent Waste Water. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 16(1): 1-4*

Sharma, K., H. Schuhman y P.M Schenk. 2012. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies* No. 5:1532-1553.

Sukumaran, P., R. Nulit, S. Zulkifly, N. Halimoon, H. Omar y A. Ismail. 2014. Potential of fresh POME as a Growth Medium in Mass Production of *Arthrospira Platensis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(4):235-250.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2013. *World Population Prospects: The 2012 Revision, Key Findings and Advance Tables*. Working Paper No. ESA/P/WP.227.

Wan-Loy, C. 2012. Biotechnological Applications of Microalgae. *IeJSME* 6(1): 24-37