



ECUADOR
UNIVERSIDAD
INTERNACIONAL
SEK
SER MEJORES

FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
GENERADOR DE BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE
DE LA RESERVA BIOLÓGICA LIMONCOCHA”**

Realizado por:

PAULA ESTEFANÍA ENCALADA ROSALES

Director del proyecto:

PhD (c) Johanna Medrano Barboza

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 8 de marzo del 2021

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

DECLARATORIA JURAMENTADA

Yo, PAULA ESTEFANÍA ENCALADA ROSALES, con cédula de identidad # 1723257489, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

1723257489

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
GENERADOR DE BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE
DE LA RESERVA BIOLÓGICA LIMONCOCHA”**

Realizado por:

PAULA ESTEFANÍA ENCALADA ROSALES

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JOHANNA LUCÍA MEDRANO BARBOZA

quien considera que constituye un trabajo original de su autor


FIRMA

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 8 de marzo del 2021

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

Eficiencia Energética y Energías Renovables

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

DEDICATORIA

A mis padres, quienes me han apoyado siempre y son la luz de mi vida.

A mi abuelita Georgina, a quien, aunque no pueda ver, sé que siempre me acompaña.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

AGRADECIMIENTO

A mis padres, Verónica y Guillermo, por darme la oportunidad de cumplir mis sueños.

A mis profesores Johanna y Rubén, por enseñarme, apoyarme siempre y confiar en mí.

A Jenni y Juan Carlos por su gran ayuda y su enorme aporte en esta investigación.

A Juan y Kevin, por su linda amistad, apoyo y por compartir este camino juntos.

A Jonathan, mi compañero de vida y mi mejor amigo, por el apoyo y la paciencia.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

Para someter a:

To be submitted:

Paula Encalada Rosales¹, Johanna Medrano Barboza^{1*},
José Rubén Ramírez Iglesias¹, Juan Carlos Navarro Castro¹

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
 GENERADOR DE BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE
 DE LA RESERVA BIOLÓGICA LIMONCOCHA”**

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador. 08/03/2021

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: PhD (c) Johanna Medrano Barboza,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

Teléfono: 0969094576; email: johanna.medrano@uisek.edu.ec

RESUMEN

El rápido crecimiento de la población es directamente proporcional a la demanda energética de ciertos combustibles fósiles y la problemática ambiental que se deriva del uso de estos combustibles produce un gran interés en desarrollar fuentes de energía alternativas y limpias, tal como los biocombustibles de tercera generación, los cuales se pueden producir a partir de materias primas renovables como biomasa, la cual constituye una de las alternativas más sustentables. La capacidad productora de lípidos de las microalgas hace que estos microorganismos despierten un gran interés como materia prima para la producción de energía limpia. En este estudio se aisló a la microalga *Desmodesmus communis* a partir de muestras de agua procedentes de la laguna de la Reserva Biológica Limoncocha (RBL). Se realizó una identificación morfológica mediante comparaciones bibliográficas y una identificación molecular con PCR utilizando códigos de barras moleculares y la construcción de árboles filogenéticos basados en las regiones ITS y 18S. Se realizó un cultivo por lotes de diez días utilizando medio BG11, en el que diariamente se determinó la remoción de nutrientes, al finalizar el tiempo de cultivo se obtuvo una concentración final de biomasa de $2,4 \pm 0,12$ g/L. Posteriormente, se evaluó el porcentaje de lípidos y ácidos grasos libres (AGL) con los solventes cloroformo:metanol (1:2) y acetato de etilo; los mejores porcentajes de extracción fueron 19,70% de lípidos y 63,46% de AGL, ambos en base seca y con el solvente cloroformo:metanol (1:2). Los resultados sugieren una mejor extracción de lípidos de esta microalga con cloroformo:metanol (1:2) en comparación con el solvente acetato de etilo. Aun cuando los resultados de lípidos y AGL no llegaron a los límites requeridos, no se descarta la posibilidad de emplear esta especie con fines de obtención de biocombustibles, por lo que se necesitan más estudios.

Palabras clave: *Desmodesmus*, microalgas, potencial, biocombustibles, lípidos, ácidos grasos libres (AGL).

ABSTRACT

The rapid growth of the population is directly proportional to the energy demand for certain fossil fuels and the environmental problems arising from the use of fossil fuels, cause a strong interest in developing alternatives and clean energy sources, such as third-generation biofuels, which can be produced from renewable raw materials such as biomass, which is one of the most sustainable alternatives. The lipid-producing capacity of some species of microalgae makes these microorganisms arouse great interest as a raw material for sustainable energy production. In this study, the microalgae *Desmodesmus communis* was isolated from water samples from the lagoon of the Limoncocha Biological Reserve (RBL). Morphological identification was carried out through bibliographic comparisons and molecular identification with PCR using molecular barcodes and with the construction of phylogenetic trees based on the ITS and 18S regions. A ten-day batch culture was carried out using BG11 medium, in which the removal of nutrients was determined daily, at the end of the culture period, the final biomass concentration was 2.4 ± 0.12 g/L. Subsequently, the percentage of lipids and free fatty acids (FFA) were evaluated with the solvents chloroform: methanol (1:2) and ethyl acetate; the best extraction percentages were 19.70% of lipids and 63.46% of FFA, both using dry biomass and chloroform: methanol (1:2) as solvent. These results suggest a better lipid extraction of these microalgae with chloroform: methanol (1:2) compared to ethyl acetate. Despite the fact that the results of lipids and FFA did not reach the required limits, the possibility of using this specie for obtaining biofuels is not ruled out, so more studies are needed.

Keywords: *Desmodesmus*, microalgae, potential, biofuels, lipids, free fatty acids (FFA)

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la población mundial se ha duplicado, la expectativa de vida ha aumentado y con esto, el uso de las energías primarias (Jones & Mayfield, 2012). La generación de energía en el mundo depende principalmente de los combustibles fósiles, cuya implementación deriva en las emisiones de gases de efecto invernadero como el CO₂ contribuyendo a la contaminación y al calentamiento global (Edenhofer *et al.*, 2011).

El aumento de la demanda energética contribuye al uso excesivo de los combustibles fósiles y tiene como consecuencia su agotamiento, por lo que en la actualidad se ha impulsado el desarrollo de alternativas sustentables y de nuevas tecnologías; tal es el caso de los biocombustibles, que permiten abastecer la demanda de energía sin que se ponga en riesgo el medio ambiente y los ecosistemas más vulnerables (Khan *et al.*, 2018). Los biocombustibles son derivados de semillas, plantas, residuos agrícolas y microorganismos, cuyo proceso de combustión genera CO₂; sin embargo, éste CO₂ fue fijado previamente por la biomasa empleada en su proceso fotosintético y luego de la combustión, vuelve a la atmósfera, por este motivo se considera que tienen un ciclo de carbono neutral, a diferencia de los combustibles fósiles (Romero Salvador, 2010).

Los biocombustibles se clasifican en tres generaciones: la primera es producida a partir de soya, aceite de palma, girasol, maíz, entre otros; esto representa una desventaja ya que requieren una gran cantidad de suelo cultivable, lo cual reduce la cantidad de alimentos disponibles para el consumo humano y animal (Suárez Londoño, 2019). Los biocombustibles de segunda generación se generan a partir de desechos vegetales, residuos agrícolas y tienen como desventaja la gran cantidad de materia prima necesaria para su producción. (Ramírez *et al.*, 2012). Mientras que, el biocombustible de tercera generación, producido a partir de técnicas de cultivo celular con biomasa

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

de microorganismos cumple con criterios de sustentabilidad, ya que es renovable, biodegradable y tiene menos toxicidad y un menor impacto ambiental (Castro-Martínez *et al.*, 2012).

Una alternativa para utilizarse como materia prima de biocombustibles de tercera generación son las microalgas. En los últimos años se ha incentivado la investigación de estos microorganismos, principalmente por ser fuentes de sustancias de un alto valor bioactivo (Guamán & González, 2016). Producen componentes lipídicos que sirven de base para diferentes usos bioenergéticos, pueden tolerar y adaptarse a una variedad de condiciones ambientales (Jones & Mayfield, 2012); además de tener una mayor eficiencia fotosintética, logran convertir entre el 3 y 8% de la energía solar en biomasa, tienen un ciclo de reproducción más corto y mayor eficiencia de absorción de nutrientes en comparación con las plantas terrestres (Lardon *et al.*, 2009; Komolafe *et al.*, 2014).

Las microalgas tienen la ventaja de que la síntesis de sus lípidos puede ser manipulada por cambios en las condiciones de cultivo (Arias Peñaranda *et al.*, 2013). La producción de biocombustibles depende de la selección de la cepa de microalga y debe tomar en cuenta factores como la productividad de lípidos, la cual se expresa como cantidad de lípidos por unidad de volumen y tiempo; además, de su capacidad para adaptarse a ambientes extremos de temperatura, pH, salinidad, entre otros (Brennan & Owende, 2010).

Las especies que predominan para la obtención de lípidos son del grupo de algas verdes. El Laboratorio Nacional de Energía Renovables (NREL) en Estados Unidos reportó que *Dunaliella*, *Scenedesmus* y *Chlorella* son los principales géneros que se han cultivado a escala comercial para la obtención de biodiesel (Sheehan *et al.*, 1998). Asimismo, especies como *Desmodesmus* muestran una alta producción de biomasa y rendimiento lipídico (Komolafe *et al.*, 2014). Estas especies se

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

encuentran en cuerpos de agua dulce, aguas residuales de las plantas de tratamiento, aguas contaminadas con metales pesados y son muy comunes en lagos eutrofizados (Elias, 2018).

En varias regiones de América del Sur, como en Brasil, el sector de la bioenergía ha incorporado con éxito la tecnología del biodiesel obtenido a base de algas; a pesar de esto, en el Ecuador no se ha analizado el potencial de dicha alternativa (Vega-Quezada *et al.*, 2017), por lo que es importante estudiar las características de las microalgas autóctonas del Ecuador, saber su potencial natural para un área de producción, ya sea en biocombustibles, suplementos alimenticios o cosmetología, o incluso aplicabilidades relacionadas con procesos de biorremediación.

La Amazonía ecuatoriana tiene un ecosistema diverso, la Reserva Biológica Limoncocha (RBL) está ubicada en el cantón Shushufindi de la provincia de Sucumbíos, en la Región Oriental ecuatoriana. Por su superficie y categorización de humedal, la RBL constituye uno de los ecosistemas más importantes del Ecuador siendo una reserva natural con estatus de protección (Armas & Lasso, 2011). Se encuentra en un sector donde predominan las actividades petroleras, además de otras actividades antropogénicas que pueden representar un riesgo para los recursos hídricos de la zona; por ejemplo, se puede esperar un estado de eutrofización en los cuerpos de agua, gracias a un aumento de nutrientes como nitrógeno y fósforo debido al uso de fertilizantes en la agricultura y descargas de aguas residuales domésticas en la laguna (Costa *et al.*, 2018).

En este estudio se planteó determinar el potencial de generación de biocombustibles de *Desmodesmus communis*, una microalga aislada de la laguna de la RBL e identificada morfológica y molecularmente mediante el uso de códigos de barras con el fin de evaluar si especies de microalgas autóctonas del Ecuador pueden ser útiles como materia prima para la elaboración de

biocombustibles como el biodiesel, al poseer más del 20% de lípidos totales (Khan et al., 2018; Park, Craggs & Shilton, 2011a; Rawat et al., 2013).

2. MÉTODOS

Aislamiento y cultivo

La toma de muestras de agua realizada en la laguna de la RBL (Sucumbíos - Ecuador 0°24'S 76°36'O) se efectuó amparado en el convenio marco entre el Ministerio del Ambiente y Agua (MAE) y la Universidad Internacional SEK, #MAE-CGJ-2019-0130-O. Se tomaron muestras de agua del centro de la laguna con un muestreador de agua Van Dorn (botella de agua vertical) con intervalos de 20 cm hasta la profundidad de 260 cm. Adicionalmente, se colectaron muestras en la superficie del centro de la laguna y en la desembocadura del río Pishira en tubos falcon de 50 mL, previamente esterilizados con luz UV-C, y se almacenaron a 4°C.

Se prepararon los medios selectivos BG11 (Blue-Green Medium) y BBM (Bold 's basal Medium) según Andersen (2005). A cada medio se le colocó 1,4% de agar para hacer cultivos sólidos, se concentraron las muestras por centrifugación a 3500xg por cuatro minutos para posteriormente sembrar 100 µL de muestra con asa de Digrafsky (diseminación estéril) en cajas Petri. Cada muestra se sembró en placas con medio BG11 y BBM, se mantuvieron a temperatura ambiente (Quito - Ecuador) en un fotoperiodo de 12:12 con intensidad de luz de 60 µmol m⁻² s⁻¹. Se hicieron repiques sucesivos de colonias hasta obtener cultivos axénicos verificados por microscopio (Leica, modelo DM750). Se eligió la muestra y medio selectivo en el que se observó un mejor crecimiento (1cm) y finalmente se le asignó el código L1cmC3B-17519, para su almacenamiento en la institución.

Identificación morfológica

La identificación morfológica se realizó mediante técnicas microscópicas según Clarke & Eberhardt (2002), se identificó el género y especie mediante comparación con las descripciones originales de Bica *et al.* (2012) y Hentschke & Torgan (2010), además de la comparación con las especies disponibles en la base de datos de algas de Guiry (2020).

Identificación molecular

La amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y 18S de ADN ribosomal (ADNr) se realizó mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) de colonia. Se utilizaron los cebadores ITS1-4 (White *et al.*, 1990) modificado por Hadi *et al.* (2016) y los cebadores CHLOROF-R para la región 18S (Moro *et al.*, 2009). La mezcla se realizó siguiendo las indicaciones del kit MasterMix™ de PROMEGA®.

Para las regiones ITS1-5.8S-ITS2, el programa de ciclado y las concentraciones de cebadores se emplearon según lo descrito por Hadi *et al.* (2016), se utilizó 0,25 µL de cada cebador a una concentración de 10 µM, el programa de ciclado consistió en 96°C durante 5 min, 40 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 1 min, hibridación de cebadores a 52°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min, con una final extensión a 72°C durante 5 min.

Para las regiones 18S de ADN ribosomal (ADNr), el programa de ciclado y las concentraciones de cebadores se emplearon según lo descrito por Moro *et al.* (2009), se utilizó 1,25 µL de cada cebador a una concentración de 10 µM, el programa de ciclado consistió en 94°C durante 3 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación de cebadores a 59°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min, con un ciclo adicional de 10 min a 72°C.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñido con Sybr-safe™ (0,1 µL/mL). La purificación de los productos de amplificación se realizó utilizando el kit Quick PCR Purification™ de THERMO®, siguiendo las instrucciones de la casa comercial y se secuenciaron por el método Dideoxi-nucleotidos de Sanger por medio de la empresa MacroGEN®. Las secuencias obtenidas se ensamblaron en una secuencia consenso, usando el programa GeneStudio Professional Edition.

Análisis filogenético

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación se realizó un alineamiento de secuencias tipo local (BLAST) con el fin de encontrar similitudes entre la secuencia problema y las secuencias de las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente, se realizó un análisis de filogenia mediante el programa MEGA (Kumar, 2016) en la construcción del árbol filogenético con los marcadores ITS y 18S utilizando diferentes métodos de análisis (Maximum Likelihood y Neighbor joining) con el fin de indicar las relaciones evolutivas del organismo.

Determinación del crecimiento algal y obtención de biomasa

Se realizaron cultivos líquidos triplicados de 1 litro en biorreactores con una alimentación por lotes, utilizando medio BG11 (20 mg/L Na₂CO₃, 1 mg/L Na₂ EDTA, 1500 mg/L NaNO₃, 40 mg/L K₂HPO₄, 75 mg/L MgSO₄.7H₂O, 36 mg/L CaCl₂.2H₂O, 6 mg/L ácido cítrico, 6 mg/L citrato férrico de amonio, 1 mL/L solución de trazas de metales) (Andersen, 2005) y un periodo de cultivo de diez días, empleando un inóculo inicial de 8,36x10⁵ células/mL, con las mismas condiciones mencionadas anteriormente y suministro de aireación constante, usando un compresor de aire JAD S-4000B con una tasa de aireación de 4,2 L/min.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

Para determinar la curva de crecimiento celular, se realizaron conteos diarios empleando una cámara de Neubauer y la fórmula representada en la Ecuación (1) (Bastidas, 2011).

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total células contadas} \times 10000}{\text{Número de cuadrados} \times \text{dilución}} \text{ [células/mL]} \quad (\text{Ec. 1})$$

Para corroborar el crecimiento celular se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro (HACH DR 5000) de los cultivos a 680 nm según Sun *et al.* (2019). Finalmente, se realizó la determinación del peso seco siguiendo el método de Arredondo-Vega & Voltolina, (2007). Brevemente, se tomó 1 mL de cultivo y se colocó en un papel filtro previamente pesado, se dejó secar 12 horas a 60°C hasta peso constante. Se registró la diferencia en el peso total.

Determinación de consumo de nutrientes

Se tomaron muestras de 15 mL de cultivo a diario, las cuales se centrifugaron a 4500 xg por cinco minutos y se extrajo el sobrenadante para determinar los parámetros químicos del cultivo. Se utilizaron protocolos estandarizados de la Casa Comercial HACH, para determinar fosfatos (fósforo reactivo) (PO_4^{3-}) (HACH 8114), demanda química de oxígeno (HACH 8000) y nitratos (NO_3^-) (HACH 8039).

Determinación de porcentaje de lípidos y ácidos grasos libres (AGL)

Se determinó el porcentaje de lípidos (% de grasa total) mediante el método Bligh & Dyer modificado por IMARPE (Salazar Pérez, 2012). Se utilizaron los solventes orgánicos grado HPLC cloroformo:metanol (1:2) y acetato de etilo, con 0,25 g de biomasa seca y húmeda. Los experimentos se realizaron por triplicado. Después de la primera sonicación se dejó reposar por 24h a 4°C protegido de la luz. Posteriormente, se realizó la segunda sonicación, se recuperó el extracto, se agregó solución salina al 0.58%, se aplicó Vortex, se centrifugó y finalmente se colocó

la fase orgánica en un tubo previamente pesado para secarlo a 68°C por 12 horas hasta peso constante.

Los AGL se determinaron según Tanzi *et al.* (2013) por triplicado, utilizando los solventes orgánicos grado HPLC cloroformo:metanol (1:2) y acetato de etilo; junto con 0,5 g de biomasa seca y 0,1 g de KOH. Se llevó a reflujo a 60°C durante 5 h a 300 rpm. Se filtró, se añadió 5 mL de solvente utilizado en el paso previo y 5 mL de agua destilada. La solución se trasladó a un embudo de decantación, se liberaron los gases y se dejó reposar por diez minutos. Se extrajo la fase orgánica en un tubo previamente pasado para secarlo a 68°C por 12 horas hasta peso constante.

Análisis estadístico

Los parámetros asociados a la concentración celular, densidad óptica, biomasa, y consumo de nutrientes fueron expresados como el valor \pm desviación estándar ($X \pm DE$), y se realizó una comparación de medias de los diferentes grupos de experimentación a través de la prueba Kruskal Wallis, empleando el programa Statgraphics versión 18. Las diferencias de medias entre cada grupo se consideraron estadísticamente significativas al presentar valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Aislamiento e identificación morfológica de *Desmodesmus communis*

A partir de los muestreos efectuados, se encontró mayor crecimiento en las muestras de agua tomadas en el centro de la laguna de la RBL a 1cm de profundidad, con las que se logró obtener un cultivo axénico, comprobado mediante observación al microscopio. En la figura 1A se muestran las placas con los cultivos axénicos de la especie L1cmC3B-17519 en BG11, el cual fue el medio que logró generar con mayor facilidad y rapidez colonias de microalgas. Al realizar la observación

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

en microscopio óptico con un aumento de 40x, se determinó que la especie L1cmC3B-17519 presentó la característica de agruparse en cenobios compuestos de dos, cuatro y hasta ocho células (figura 1B).

Figura 1. Cultivo L1cmC3B-17519. (A) cultivos axénicos, (B) aumento de muestras a 40x, (C) aumento de muestras a 100x

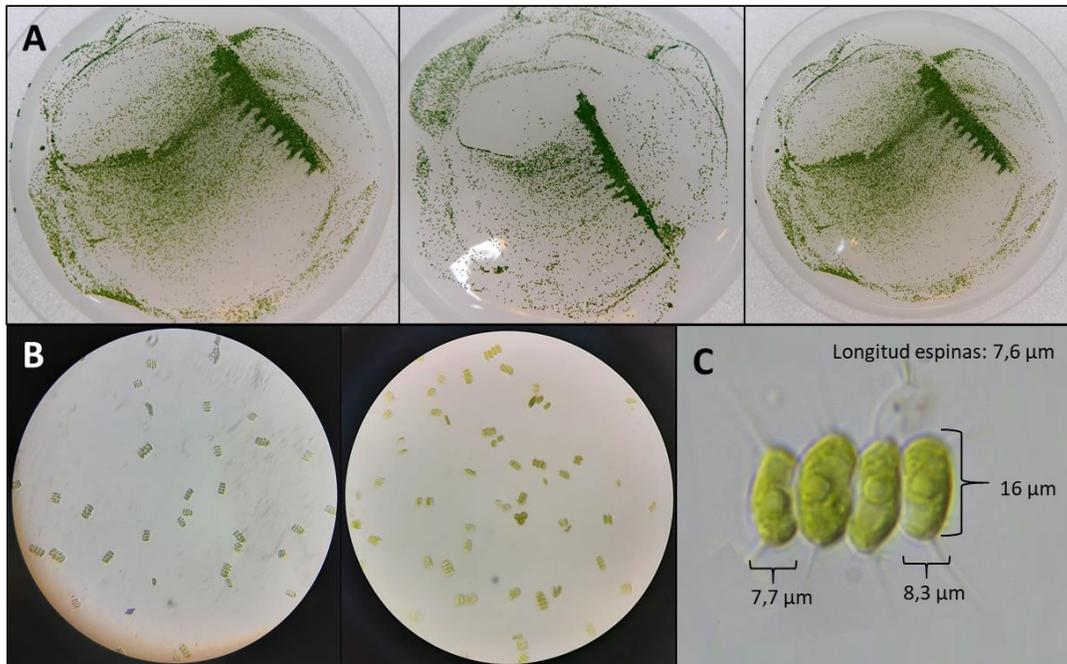


Tabla 1: Descripción taxonómica de la microalga estudiada

Especie	<i>Desmodesmus communis</i> (Edenhofer Hegewald, 2000)
Obra	Hegewald, E. (2000). New combinations in the genus <i>Desmodesmus</i> (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). <i>Algological Studies</i> 96: 1-18.
Descripción	Cenobio de cuatro células dispuestas linealmente. Células externas oblongas, células intermedias oblongas. Espinos principales rectos con base espesada. Cloroplasto único, parietal y un pirenoide. Ancho 7,7μm - 8,3μm de las células exteriores. Largo de 16μm, Longitud de espinas de 7,6μm. (Figura 1C)

La especie del cultivo L1cmC3B-17519 concuerda con la descripción hecha por Hentschke & Torgan (2010) y Bica *et al.* (2012), los individuos o cepas analizadas tienen un rango de medidas,

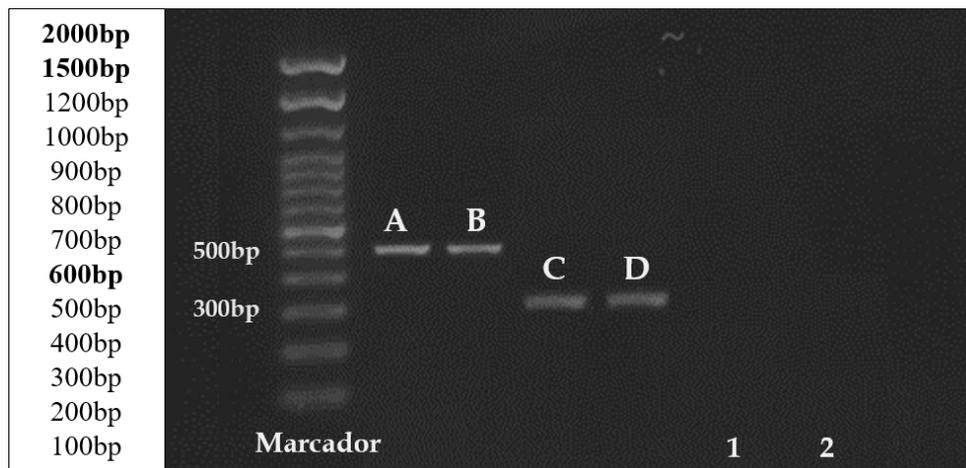
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

a pesar de que ciertas dimensiones estaban fuera de rango, se analizó la relación largo-ancho y las medidas de los espinos, lo que nos confirma la similitud de *Desmodesmus communis* con la especie estudiada.

Identificación molecular y análisis filogenético

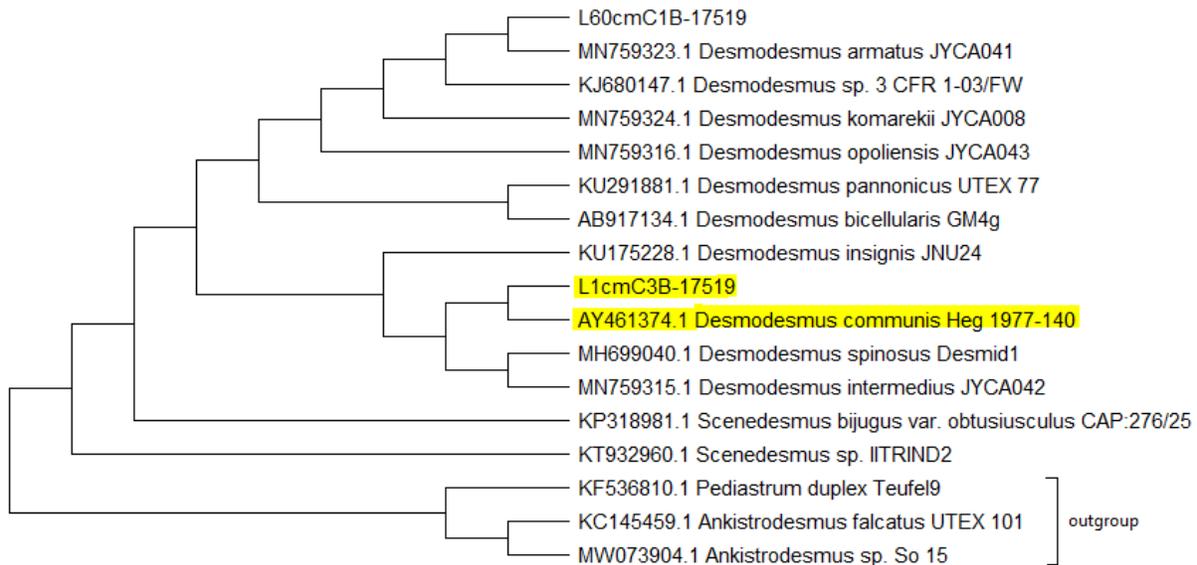
Se realizó una PCR de colonias utilizando las regiones ITS y 18S. En la figura 2 se observa la amplificación por duplicado de los productos de PCR en gel de agarosa al 1,8%, las bandas A y B corresponden a la región 18S, las bandas C y D corresponden a la región ITS. La PCR generó amplicones de aproximadamente 500 y 300 bp, respectivamente.

Figura 2. Productos de amplificación obtenidos a partir de los códigos de barras empleados para la identificación molecular. (A) y (B) productos de PCR con cebadores CHLO 18S. (C) y (D) productos de PCR con cebadores ITS. (1) y (2) control agua de cada primer



Las secuencias consenso obtenidas a partir de los amplicones analizados fueron de 455 bp para la región 18S y de 256 bp para la región ITS. La secuencia correspondiente a ITS de L1cmC3B-17519 presentó un porcentaje de identidad de 98,44% con la especie AY4661374.1 *Desmodesmus communis*. Posteriormente, se realizó un árbol filogenético para corroborar el BLAST y obtener un resultado más concreto con un análisis de las relaciones evolutivas de la microalga estudiada con las especies presentes en la base de datos de GeneBank.

Figura 3. Árbol filogenético (Maximum likelihood) basado en secuencias ITS



La construcción del árbol filogenético se realizó con el programa MEGA y fue basado en la secuencia ITS con el método de sustitución nucleotídica de Maximum likelihood (modelo K2+G) (figura 3). Aparentemente, L1cmC3B-17519 es de la especie *Desmodesmus communis* debido a su similitud con la especie AY461374.1 *Desmodesmus communis* Heg, ya que se encuentran en el mismo clado teniendo el mismo ancestro en común. Aunque se realizó un árbol filogenético basado en la secuencia 18S, los análisis no fueron concluyentes utilizando diferentes métodos de análisis como Maximum likelihood (modelo K2+G) y Neighbor joining, por lo que no hubo una identificación confiable y se descartaron los resultados obtenidos.

Crecimiento algal

La Figura 4 muestra las curvas de concentración celular, D.O._{680nm} y biomasa de L1cmC3B-17519 cultivada en medio comercial BG11. En el día 0 los valores iniciales fueron $8,36 \times 10^5$ cel/mL la densidad celular, 1,102 D.O. y $0,7 \pm 0,11$ g/L de biomasa. Se observa un crecimiento sostenido de la microalga durante los primeros siete días de cultivo, hasta alcanzar una fase estacionaria en el día nueve. Los valores finales de densidad celular, D.O. y biomasa seca fueron $2,56 \pm 0,22 \times 10^6$

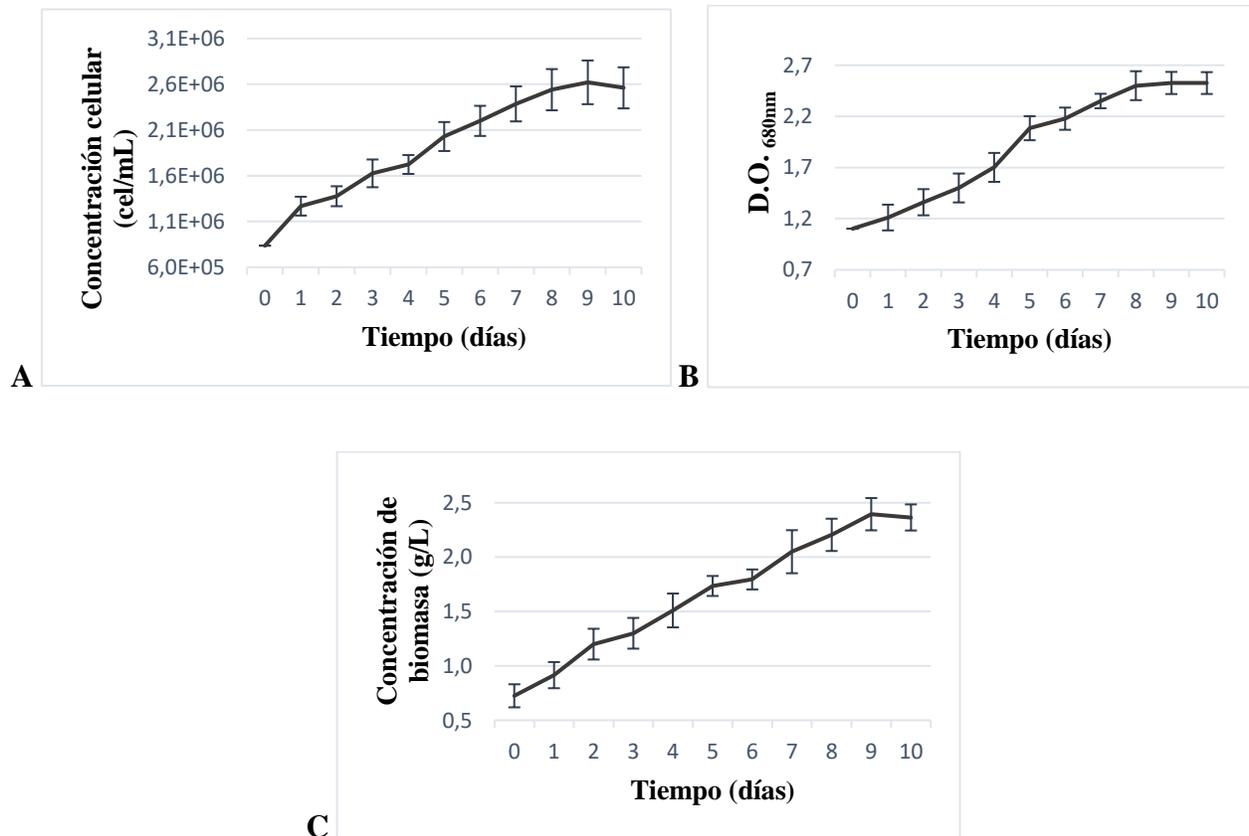
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

cel/mL; $2,526 \pm 0,11$ y $2,4 \pm 0,12$ g/L, respectivamente. El análisis estadístico mostró que estos valores son estadísticamente diferentes en comparación con los valores iniciales ($p < 0,05$). La productividad volumétrica (PV) de la biomasa fue de $0,24$ g/L d, calculada con la Ecuación (2); para la productividad específica (PE) (d^{-1}) se dividió la productividad volumétrica para la concentración de biomasa Ecuación (3) y el resultado encontrado fue de $0,1 d^{-1}$:

$$PV \text{ Biomasa} = \frac{\text{Peso biomasa seca (g)}}{\text{Volumen de cultivo (L)} \times \text{Tiempo de cultivo (d)}} \left[\frac{g}{L d} \right] \quad (\text{Ec. 2})$$

$$PE \text{ Biomasa} = \frac{PV \text{ Biomasa} \left[\frac{g}{L d} \right]}{\text{Concentración de biomasa} \left[\frac{g}{L} \right]} [d^{-1}] \quad (\text{Ec. 3})$$

Figura 4. Curvas de crecimiento de L1cmC3B-17519. (A) Crecimiento celular, (B) Densidad óptica, (C) Concentración de biomasa. Se muestra cada punto de medición registrado, junto con su desviación estándar asociada (media \pm DE).

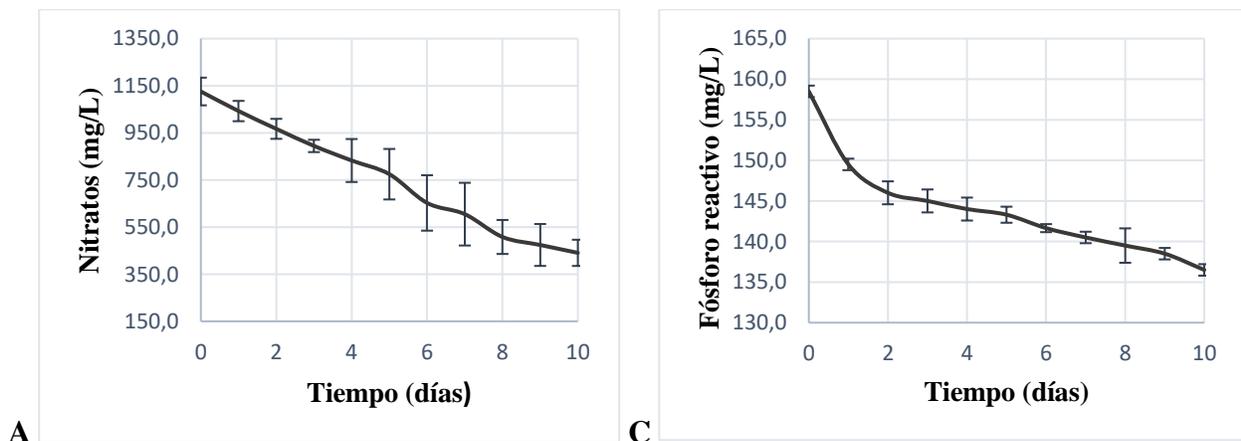


Consumo de nutrientes

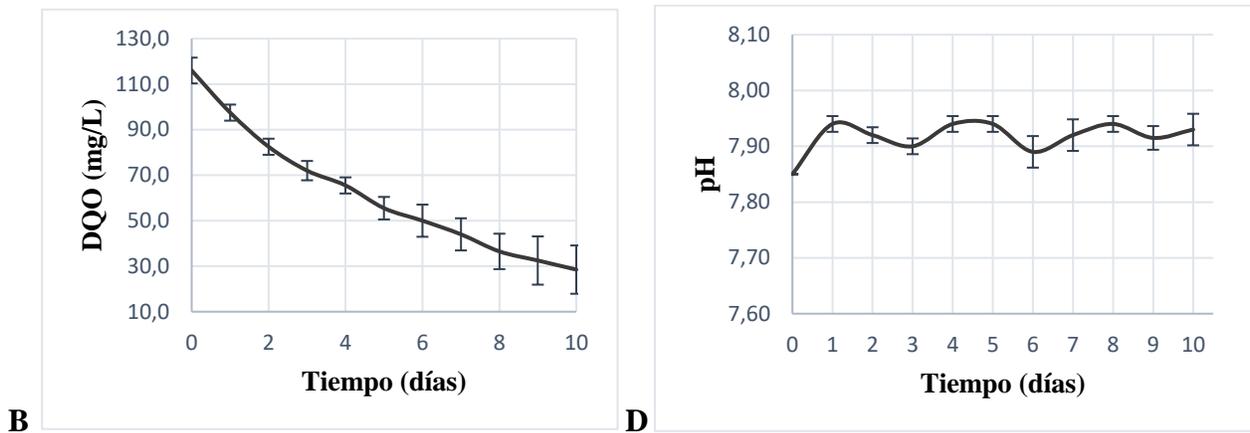
Se estudiaron cuatro parámetros para el consumo de nutrientes. Para ello se utilizaron medidas indirectas de nitrógeno en forma de nitratos (NO_3^-), fósforo en forma de fosfatos (PO_4^{3-}) y carbono en forma de DQO. Los valores iniciales fueron $1125,5 \pm 58,69$ mg/L NO_3^- , $158,5 \pm 0,71$ mg/L PO_4^{3-} y $116 \pm 5,66$ mg/L DQO, respectivamente (figuras 5A, B y C). En el caso del pH del medio, se realizó un control diario con solución de HCl 0,05M, manteniendo el pH en un rango entre 7,85 y 7,94 (figura 5D) para que las microalgas crecieran en un ambiente óptimo.

Los diferentes parámetros químicos evaluados mostraron una reducción durante el tiempo del ensayo hasta alcanzar valores finales de $440,7 \pm 55,65$ mg/L NO_3^- para nitratos, $136,5 \pm 0,71$ mg/L PO_4^{3-} para fósforo reactivo y $28,5 \pm 10,61$ mg/L de DQO. El análisis estadístico mostró que estos valores son estadísticamente diferentes en comparación con los valores iniciales ($p < 0,05$), por lo que se comprueba una remoción de nutrientes al haber una diferencia significativa entre el día cero y el día diez.

Figura 5. Cinética de remoción de nutrientes (A) nitratos, (B) DQO, (C) fósforo reactivo y monitoreo de pH (D). Se muestra cada punto de medición registrado, junto con su desviación estándar asociada (media \pm DE).



AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA



Lípidos y AGL

Para la extracción de lípidos se utilizaron los solventes orgánicos cloroformo:metanol (1:2) y acetato de etilo, el porcentaje final se obtuvo haciendo un promedio de los triplicados y aplicando la Ecuación (4), donde, %G es el porcentaje de grasa en la muestra, T2 es el peso de un tubo muestreador con la grasa seca (g), T1 es el peso de tubo muestreador vacío y pesado (g) y W es el peso inicial de la muestra (g).

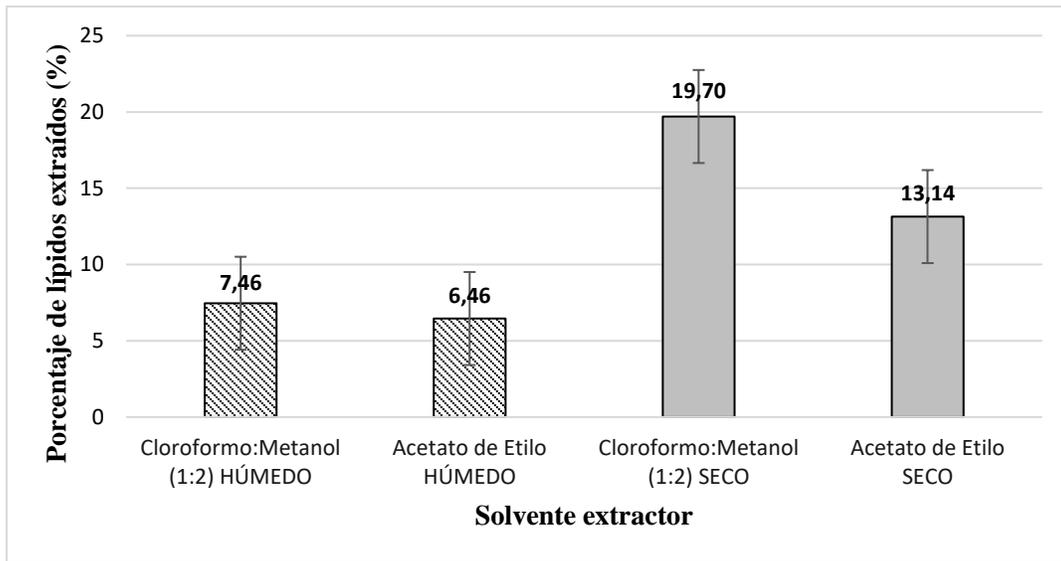
$$\%G = \left(\frac{T2 - T1}{W} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

En la figura 6 se observa el porcentaje de lípidos a partir de biomasa húmeda y seca con los dos solventes utilizados. El mayor porcentaje de extracción de lípidos en seco fue de 19,7% con el solvente cloroformo:metanol (1:2); con acetato de etilo el porcentaje fue de 13,14%. La extracción de lípidos en húmedo con el solvente cloroformo:metanol (1:2) tuvo como resultado 7,46%, mientras que, con acetato de etilo fue de 6,46%. Si bien la extracción de lípidos en húmedo no varía, en la extracción en seco el mejor solvente extractor fue la mezcla cloroformo:metanol (1:2).

En condiciones normales, las microalgas destinadas a la producción de biodiesel tienen un porcentaje mayor al 20% de lípidos totales útiles (Park, Craggs & Shilton, 2011a; Rawat *et al.*,

2013; Khan *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que esta cepa de microalga cultivada en ambiente de laboratorio en medio BG11, con fotoperiodos 12:12 y **aireación** continua, pero sin reposición de nutrientes ni control de temperatura o cambios en otras variables, no produce los suficientes lípidos para una obtención óptima de biocombustibles.

Figura 6. Porcentaje de lípidos húmedo y seco



La productividad de lípidos en una extracción con biomasa húmeda fue de 0,0155 g/L d con el solvente cloroformo:metanol (1:2), y de 0,0179 g/L d con el solvente acetato de etilo; mientras que en una extracción con biomasa seca, fue de 0,0473 g/L d y 0,0315 g/L d con cloroformo:metanol (1:2) y acetato de etilo, respectivamente. La productividad volumétrica (PV) fue calculada con la Ecuación (5); para la productividad específica (PE) (d^{-1}) se dividió la productividad volumétrica para la concentración de biomasa (Ecuación 6), encontrando valores de 0.0473 g/L d y 0,0197 d^{-1} , respectivamente.

$$PV \text{ Lípidos} = \frac{\text{Peso de lípido seco (g)}}{\text{Volumen de cultivo (L)} \times \text{Tiempo de cultivo (d)}} \left[\frac{g}{L d} \right] \quad (\text{Ec. 5})$$

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

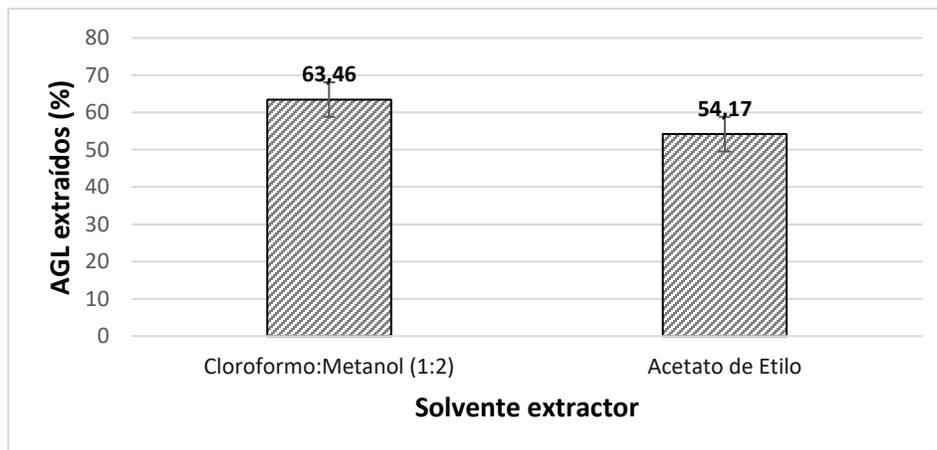
$$PE \text{ Lípidos} = \frac{PV \text{ Lípidos} \left[\frac{g}{L} \right]}{Concentración \text{ de biomasa} \left[\frac{g}{L} \right]} [d^{-1}] \quad (\text{Ec. 6})$$

Para la extracción de ácidos grasos libres (AGL) se utilizaron los disolventes orgánicos cloroformo:metanol (1:2) y acetato de etilo; el porcentaje final se obtuvo haciendo un promedio de los triplicados y aplicando la Ecuación (7), donde, %AGL es el porcentaje de ácidos grasos libres en la biomasa seca, T2 es el peso de un tubo muestreador que contiene los AGL secos (g), T1 es el peso del tubo muestreador vacío (g) y W es el peso inicial de la muestra (g).

$$\%AGL = \left(\frac{T2 - T1}{W} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

En la figura 7 se observa el porcentaje de ácidos grasos libres a partir de biomasa seca con los dos solventes utilizados. El mayor porcentaje de extracción de ácidos grasos libres fue de 63,46% con el solvente cloroformo:metanol (1:2), con acetato de etilo el porcentaje fue de 54,17%. Según Chen *et al.* (2012), las microalgas tienen un contenido de ácidos grasos libres de 70%. Esto indica que los porcentajes obtenidos en este estudio no cumplen con los rangos mínimos para una obtención óptima de biocombustibles.

Figura 7. Porcentaje de ácidos grasos libres



AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

Los resultados obtenidos indican que la especie *Desmodesmus communis* autóctona del Ecuador cultivada en las condiciones de esta investigación no podrá ser utilizada para la obtención de biodiesel, ya que sus porcentajes de lípidos y AGL son bajos para ser materia prima en la obtención de biodiesel; sin embargo, al comparar los valores de productividad de lípidos encontrados con otras investigaciones se observa que pueden tener potencial en la producción de biodiesel; la cantidad de lípidos podría mejorarse modificando condiciones de cultivo con características como déficit de nitrógeno, reposición de nutrientes y suministro de CO₂, entre otros.

4. DISCUSIÓN

Ecuador es considerado un país megadiverso por su alto índice de riqueza biológica; sin embargo, la biodiversidad de microorganismos ha sido escasamente estudiada. La investigación de cepas de microalgas y la formación de bancos de datos de organismos autóctonos constituyen la primera fase de exploración de ambientes naturales pues es importante conocer la biodiversidad, su potencial y utilidad de dichos organismos en el área biotecnológica y ambiental (Guamán & González, 2016).

En el presente estudio se llevó a cabo el aislamiento, identificación morfológica y molecular de la especie L1cmC3B-17519 procedente de la laguna de la Reserva Biológica Limoncocha con el fin de evaluar su potencial para la obtención de biocombustibles. Se tomaron muestras de agua que se sembraron en medio BBM y BG11 con agar, realizando repiques sucesivos de colonias para aislar la microalga, en estos cultivos se pudo observar un mejor crecimiento en el medio BG11; incluso, Kaur *et al.* (2020) menciona en su estudio que dicho medio genera un mejor crecimiento celular en comparación con el medio BBM, razón por la que se eligió al medio BG11 para el aislamiento y cultivo de L1cmC3B-17519.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

Con relación a la identificación molecular, se realizó una construcción de árboles filogenéticos basados en las regiones ITS y 18S empleando métodos como Maximum likelihood (modelo K2+G) y Neighbor joining, la construcción se realizó con el fin de tomar en cuenta relaciones evolutivas mediante un análisis con modelos estadísticos que nos puedan permitir identificar de manera más concreta y eficaz la especie con la que se trabaja. Los resultados generados con el marcador 18S no fueron concretos, ya que, al ser una región muy conservada, no permite una delineación adecuada de esta especie; por este motivo, se descartaron los resultados con dicho marcador (Saltos Rosero, 2012). La región ITS ha demostrado ser útil en la diferenciación en las especies de géneros similares al de *Desmodesmus*; además, al ser más variable en comparación con la región 18S, puede acumular mutaciones en el tiempo, dándole la capacidad de diferenciar entre especies del mismo género (Lortou & Gkelis, 2019). El árbol filogenético con el marcador ITS mostró la similitud de L1cmC3B-17519 con la especie *Desmodesmus communis* corroborando la identificación morfológica realizada previamente.

El género *Desmodesmus* nace a partir del género *Scenedesmus*; después de realizar un análisis molecular, *Scenedesmus* se retuvo para las formas no espinosas y *Desmodesmus* para las formas espinosas (Hentschke & Torgan, 2010). Las especies del género *Desmodesmus* tienen una alta adaptabilidad a diferentes ambientes naturales, son muy comunes en cualquier cuerpo de agua, ya sea oligo, meso o eutrófica y pueden ser utilizadas como bioindicadores de calidad de agua (Bicudo & Menezes, 2006). Tienen una gran facilidad de aislamiento ya que logran surgir como organismos aislados a partir de consorcios y logran tener un crecimiento eficiente en condiciones de laboratorio (Morales *et al.*, 2013). *Desmodesmus communis* es un alga verde con una amplia distribución en aguas dulces, principalmente en aquellas con temperaturas moderadas y en las ligeramente eutrofizadas. (Bica *et al.*, 2012), por lo que la RBL, debido a sus características climatológicas y

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

las actividades antropogénicas que se realizan en sus alrededores, constituye un ambiente ideal para el crecimiento de esta microalga (Costa *et al.*, 2018).

El crecimiento de microalgas viene determinado por la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo, además de condiciones ambientales como luz, pH, temperatura y la densidad celular inicial (Guldhe *et al.*, 2017). El crecimiento celular de *Desmodesmus communis* fue exponencial durante los primeros siete días, alcanzando su fase estacionaria en el día nueve. A partir de un inóculo inicial de $8,36 \times 10^5$ cel/mL, la concentración máxima del crecimiento celular de *Desmodesmus communis* fue de $2,62 \pm 0,23 \times 10^6$ cel/mL en el día nueve de cultivo; mientras que la concentración final fue de $2,56 \pm 0,22 \times 10^6$ cel/mL en el día diez; asimismo, la densidad óptica (680 nm) final fue de $2,526 \pm 0,11$ equivalentes a una concentración de $2,4 \pm 0,12$ g/L en peso seco, la productividad volumétrica de biomasa fue de 0,24 g/L d y la productividad específica fue de $0,1 \text{ d}^{-1}$.

Vanags *et al.* (2014) estudiaron varias condiciones de cultivo para la microalga *Desmodesmus communis*, condiciones en las que se variaba la concentración de CO₂, intensidad de luz y homogenización del cultivo. En dicha investigación se determinó que, en un cultivo de 12 días en medio BG11, sin agitación y con bombeo de aire-CO₂ (96:4 v/v%), se obtuvo 3,9 g/L de biomasa, una productividad volumétrica de 0,47 g/L d y una productividad específica de $0,12 \text{ d}^{-1}$. A pesar de que la concentración de biomasa es superior en el estudio de Vanags *et al.* (2014), la diferencia de la productividad específica entre ambos estudios es mínima; por su parte, la diferencia en las concentraciones de biomasa y productividad volumétrica de dicho estudio en comparación de la presente investigación podría deberse a la concentración de CO₂ (4v/v% CO₂) bombeado en el medio, además del control de la temperatura de cultivo (25°C), ya que la temperatura es un

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

parámetro fundamental en la asimilación de nutrientes del medio y el aumento de CO₂ al medio puede aumentar la productividad de biomasa al ser necesario para la formación de compuestos orgánicos (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Esto implica que, implementando condiciones ideales para el cultivo de esta especie, se puede esperar un aumento en la productividad.

Verduga Vera (2020), reportó que para *Scenedesmus sp.* la máxima densidad celular alcanzada fue de $5,7 \times 10^7$ cel/mL en medio BG11 durante un periodo de 11 días partiendo de un inóculo inicial de $1,1 \times 10^7$ cel/mL. La concentración de biomasa seca y la productividad volumétrica fue de de 2,92 g/L y 1,95 g/L d, respectivamente. Con respecto a la productividad específica, Verduga Vera (2020) reporta un valor de $0,6 \text{ d}^{-1}$, un valor mayor comparado con el presente estudio y el estudio de Vanags *et al.* (2014); esta diferencia se puede atribuir a la diferencia entre las especies. A pesar de que el crecimiento celular y la productividad de biomasa en el presente estudio es menor al del estudio de Verduga Vera (2020), esto no hace una diferencia importante en la concentración final de biomasa entre ambos estudios. Se puede atribuir un menor crecimiento celular a la diferencia de temperatura ambiental entre ambos estudios, ya que el estudio de Verduga Vera (2020) se realizó en la ciudad de Guayaquil, en donde existe en promedio 10°C más que en la ciudad de Quito.

En cuanto a la densidad óptica, parámetro medido para comprobar el crecimiento celular, Jia *et al.* (2015) reportaron que en 14 días de cultivo en medio MSE (modified soil extract) mezclado con diferentes concentraciones de aguas residuales de la industria porcina, *Scenedesmus sp.* alcanzó una densidad óptica de 1,13, un valor menor a comparación con el valor obtenido en el presente estudio; la diferencia entre estos valores puede atribuirse a la mezcla del medio comercial con aguas residuales generando variaciones en la cantidad de las formas de nitrógeno disponible.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

Después del carbono, el nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas, se encuentra como nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) o como amonio (NH_4^+) y es fundamental en la regulación del contenido de lípidos en las microalgas. El fósforo es fundamental para varios procesos celulares como la formación de ácidos nucleicos, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). El análisis de consumo de nutrientes se realiza con el fin de determinar el crecimiento, ya que la asimilación y consumo de los mismos asegura un crecimiento normal en las microalgas, además de brindar otra posible aplicabilidad en el área de la biotecnología (Candela Orduz, 2016).

Los resultados de esta investigación para la microalga aislada *Desmodesmus communis* generaron una remoción de DQO de 75,43%, en el caso del nitrato y del fósforo reactivo generó una remoción del 60,84% y del 13,88%; respectivamente, en un periodo de cultivo de diez días. Especies como *Scenedesmus sp.* y *Chlorella vulgaris*, comúnmente utilizadas en la producción de biodiesel, han demostrado una remoción de DQO de 89% y 91,7% respectivamente, en aguas residuales domésticas al cabo de diez días de cultivo. Además, en un periodo de 36 días, ambas removieron el 100% de nitrato, y en un periodo de 48 días obtuvieron un 100% de remoción de fósforo (Hammouda *et al.*, 1995). Verduga Vera (2020) reportó que *Scenedesmus sp* removió un 75,8% de nitrógeno y 96% de fósforo, en un periodo de cultivo de 11 días en medio BG11. Lau *et al.* (1996) reportaron que, en un cultivo con aguas residuales, la eficiencia de remoción de nitrógeno inorgánico de *Chlorella vulgaris* fue del 86%, mientras que para el fósforo inorgánico fue del 70% en un periodo de 14 días. Según el análisis estadístico, los valores de crecimiento y nutrientes son significativamente diferentes en comparación con los valores iniciales ($p < 0,05$).

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

Se ha demostrado que especies como *Chlorella sp* y *Scenedesmus sp* son efectivas para el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria pesquera o porcina ya que tienen altos porcentajes de remoción de fosfatos, nitratos y materia orgánica (Candela Orduz, 2016). Aunque la remoción de fósforo de *Desmodesmus communis* no fue tan elevada en comparación con otras investigaciones, no se descarta la posibilidad de utilizarla para procesos biotecnológicos como biorremediación de aguas contaminadas. Las microalgas deben cumplir al menos tres condiciones para ser ideales en un proceso de remediación: tener alta tasa de crecimiento, alta tolerancia a variaciones ambientales y una buena capacidad para sedimentarse y poder ser cosechadas por simple gravedad (Park, Craggs & Shilton, 2011b), por lo que es importante tomar en cuenta estas características entre otros análisis y estudios que puedan definir un potencial para biorremediación.

Al momento de elegir un medio para cultivar microalgas se debe tomar en cuenta el uso final de la biomasa producida (por ejemplo: biocombustibles, alimentos, pigmentos o bien para un proceso de biorremediación) (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Desarrollar fuentes de energías alternativas como el uso de los biocombustibles se ha investigado y puesto en práctica a partir de una amplia variedad de biomasa (Ramírez *et al.*, 2012). Las microalgas son organismos que se llevan una gran atención como fuentes de producción de energía, pues bajo condiciones normales de cultivo presentan un contenido de lípidos entre el 20 y el 50 % de su peso seco (Khan *et al.*, 2018; Park, Craggs & Shilton, 2011a). Ciertas cepas de microalgas tienen un alto potencial de almacenamiento de lípidos, pueden almacenar hasta un 75% de su peso seco en lípidos; sin embargo, tienen una baja productividad de biomasa (Mata *et al.*, 2010). Para un cultivo con el fin de obtención de biocombustibles, se prefieren las microalgas con un nivel moderado de acumulación de lípidos (20-50%), pero con una mayor productividad de biomasa. Además, el criterio de selección debe basarse en ciertos factores como la tasa de crecimiento, capacidad de

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

adaptación a diferentes condiciones ambientales, rendimiento de aceite en condiciones normales, cantidad y calidad de lípidos, porcentaje de AGL en el contenido de lípidos (Khan *et al.*, 2018; Park, Craggs & Shilton, 2011a; Rawat *et al.*, 2013).

Las limitaciones en el proceso de producción de biocombustibles a partir de biomasa algal incluyen su alto costo de producción y la poca capacidad de algunas especies para almacenar lípidos. Una alternativa para reducir costos de producción es realizar la extracción de lípidos a partir de biomasa húmeda, evitando así los gastos asociados a la remoción de humedad mediante métodos térmicos como el secado y la liofilización; sin embargo, con las extracciones en fase húmeda se obtiene un menor porcentaje de lípidos (Hu *et al.*, 2008).

Sun *et al.* (2019) reportaron que *Desmodesmus sp* cultivada en medio BG11 en un periodo de 35 días con control de temperatura a 25°C obtuvo un porcentaje de lípidos de 26,64% utilizando como solvente una solución cloroformo:metanol:agua (1:2:0,8). La diferencia entre los porcentajes de grasas extraídas de estos estudios está asociada no solo al tiempo de cultivo y temperatura, sino también a la concentración y polaridades de los solventes; las mezclas de cloroformo:metanol son ampliamente usadas para la extracción de lípidos ya que promueven la disrupción de las asociaciones lípidos-proteína mejorando la remoción de lípidos de la célula; sin embargo, solventes como el acetato de etilo también se han empleado ya que resultan menos tóxicos que el cloroformo (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020).

La temperatura influye directamente en la capacidad de las células para remover los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo, afectando directamente el metabolismo y por ende el crecimiento y productividad; mientras que, el tiempo de cultivo afecta en la cantidad de lípidos producidos debido a déficit nutricional de nitrógeno (Ramírez, 2019). Los porcentajes

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

obtenidos en una extracción con acetato de etilo, fueron bajos y menores al 20% (6,46% fase húmeda y 13,14% fase seca) por lo que no se recomienda el uso de este solvente con fines de producción de biocombustibles para esta especie.

En este estudio se obtuvo 19,7% y 7,46% de lípidos en una extracción con biomasa seca y húmeda, respectivamente con el solvente cloroformo:metanol (1:2) durante diez días de cultivo. Se tomaron en cuenta los datos del mejor resultado obtenido para realizar las comparaciones, con el solvente cloroformo:metanol (1:2) en una extracción con biomasa seca, se obtuvo una productividad volumétrica de lípidos de 0,0473 g/L d y productividad específica de 0,0197 d⁻¹. Chaundhary, Khattar & Singh (2014) reportaron que, *Scenedesmus quadriculada* cultivada en medio BG11 en un periodo de 24 días, obtuvieron una PV Biomasa 0,0916 g/L d y PE Biomasa 0,041 d⁻¹, en cuando a lípidos utilizando el solvente cloroformo:metanol (2:1), obtuvieron un 27%, con una productividad volumétrica de 0,025 g/L d y una productividad específica de 0,011 d⁻¹. Los valores obtenidos en esta investigación son mayores a los mencionados por Chaundhary, Khattar & Singh (2014), lo que hace a *Desmodesmus communis* más productiva en cuanto a biomasa y lípidos se refiere.

Xia *et al.* (2014), estudiaron dos especies del género *Desmodesmus* en un cultivo de 15 días en medio BG11 modificado con urea en lugar de NaNO₃, en la que *Desmodesmus sp* obtuvo una productividad volumétrica y específica de biomasa 0,160 g/L d y 0,0667 d⁻¹, para el caso de los lípidos un 25,5% (extracción con cloroformo:metanol 1:2), una productividad volumétrica y específica de lípidos 0,0409 g/L d y 0,0170 d⁻¹. Mientras que, *Desmodesmus abundans* obtuvo una productividad volumétrica y específica de biomasa 0,172 g/L d y 0,0662 d⁻¹ y 25,1% de lípidos (extracción con cloroformo:metanol 1:2), productividad volumétrica y específica de lípidos 0,0433

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

g/L d y $0,0166 \text{ d}^{-1}$. A pesar de haber obtenido mayores porcentajes de lípidos, la productividad de biomasa y lípidos de *Desmodesmus communis* es mayor, esto se puede atribuir a las diferencias en el modo de cultivo, ya que en el estudio de Xia *et al.* (2014), el cultivo fue realizado al aire libre con luz solar y además utilizaron apenas 0,2 g/L de urea como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo a diferencia del medio BG11 que originalmente tiene 1,5 g/L de NaNO_3 como fuente de nitrógeno.

El biodiesel está compuesto de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES), los cuales son producidos a partir de triacilgliceroles (TAG), diacilgliceroles (DAG), ácidos grasos libres (AGL) y fosfolípidos (PL) (Krohn *et al.*, 2011), que son parte de la composición de los lípidos y, por ende, para una producción de biodiesel, se debe tomar en cuenta no solo el porcentaje de lípidos, sino también, la composición de los mismos y el porcentaje de AGL que contienen los lípidos. Es importante utilizar como materia prima a microalgas que tengan una alta productividad de AGL (Chen *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2001).

Autores como Chen *et al.* (2012), reportaron que después de un cultivo de diez días en medio BG11 *Scenedesmus sp.*, obtuvo un contenido de AGL del 70,3% con el solvente cloroformo:metanol (1:2) luego de almacenar la biomasa a 25°C por 24 horas y liofilizarla a -80°C . En esta investigación para *Desmodesmus communis* se obtuvo un contenido de AGL de 63,46% con cloroformo:metanol (1:2) y 54,17% con acetato de etilo. Aunque los porcentajes de lípidos y AGL en esta investigación no se encuentran en el rango de valores expuestos en las distintas investigaciones mencionadas, se cuenta con muy poca información para descartar el uso de esta especie aislada en la obtención de biocombustibles. Se sugiere realizar más experimentos tomando

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

en consideración los tratamientos aplicados a la biomasa para incrementar el contenido de lípidos y AGL.

Según Hu *et al.* (2008), con frecuencia las concentraciones altas de lípidos se obtienen cuando las algas son sometidas a estrés, en especial a condiciones en las que existe una deficiencia de nutrientes en su medio de cultivo. El nitrógeno constituye un factor importante en la regulación del contenido de lípidos en las microalgas; en situaciones normales, las microalgas tienen un contenido de lípidos del 20% aproximadamente; sin embargo, cuando el existe una deficiencia de nitrógeno, la acumulación de lípidos puede aumentar más de 40% optimizando el proceso de obtención de biocombustibles. (Park, Craggs & Shilton, 2011a). Las microalgas del género *Desmodesmus* se encuentran entre las cepas de microalgas de más rápido crecimiento en aguas residuales y producen altos rendimientos de aceite (Komolafe *et al.*, 2014). En cuanto a la especie *Desmodesmus communis*, no se han reportado estudios enfocados en su potencial como generador de biocombustibles; sin embargo, estudios como el de Vanags *et al.* (2014) investigaron su capacidad productora de biomasa y determinó las condiciones ideales para su crecimiento.

Akgül (2019) estudió el efecto en la concentración de nitrógeno en el crecimiento, biomasa y composición bioquímica de la microalga *Desmodesmus communis*, en el que demostró que una limitación de nitrógeno incrementa el contenido de lípidos y proteínas. Después de un cultivo de 30 días en medio BG11 con variaciones de su porcentaje de nitrógeno, hallaron que con un 75% menos de nitrógeno se obtienen 1,855 g/L de biomasa seca, mientras que en medio BG11 sin modificaciones obtuvieron 1,32 g/L de biomasa seca, por lo que representa una buena alternativa para aumentar el contenido de lípidos en esta microalga; sin embargo, la ausencia total de nitrógeno

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

puede reducir el crecimiento y la productividad, ya el nitrógeno es fundamental para la síntesis de proteínas, además de ser de vital importancia en el crecimiento celular (López-Elías *et al.*, 2015).

Es importante mencionar que al tratarse de una microalga autóctona, se necesita más investigación ya que en Ecuador no se encuentran artículos con información acerca del consumo de nutrientes o producción de lípidos para *Desmodesmus communis*. Las especies utilizadas en la producción de biodiesel normalmente son sometidas a estrés de nutrientes y a modificaciones genéticas para aumentar su porcentaje de lípidos, por lo que es importante conocer los géneros autóctonos y estudiar su potencial para ser utilizados en distintas ramas de producción, incluyendo la búsqueda de energías alternativas que sean sustentables.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se aisló, identificó y se evaluó el potencial generador de biomasa y lípidos como materia prima para biocombustibles de la especie L1cmC3B-17519, autóctona del Ecuador. Posterior a un análisis morfológico y molecular, la microalga aislada fue identificada como *Desmodesmus communis*.

Aunque la capacidad de remoción de nutrientes como nitratos, fosfatos y DQO de la microalga aislada no fue superior al de otras especies mencionadas en la bibliografía, no se descarta la posibilidad de utilizarla como herramienta de biorremediación de aguas residuales o la aplicación de esta microalga en otras áreas de interés biotecnológico.

Los porcentajes de lípidos y AGL mostraron un mejor resultado en una extracción con biomasa seca utilizando el solvente cloroformo:metanol (1:2) en comparación con el acetato de

etilo. Los valores de los porcentajes de lípidos fueron inferiores al 20%, por lo que se rechaza la hipótesis planteada en esta investigación.

A pesar de que *Desmodesmus communis*, identificada y utilizada en este estudio, no llegó a los límites requeridos de lípidos y AGL para ser considerada como buen generador de biocombustibles, la productividad de biomasa y de lípidos es comparable con especies que sí se usan para la producción de biodiesel, y considerando que esta investigación no toma en cuenta factores como un pretratamiento de la biomasa y condiciones ambientales controladas de las microalgas, se sugiere realizar más investigaciones con esta especie antes de descartarla.

6. RECOMENDACIONES

Se requiere realizar más estudios con esta especie, tales como alteraciones en medios de cultivo (variaciones en la intensidad lumínica, sometimiento a estrés de nutrientes, reposición de nutrientes, control de temperatura, agitación y/o suministro de CO₂), un perfil lipídico para determinar los tipos y porcentaje de ácidos grasos, para posteriormente realizar una comparación con especies utilizadas en el área de biocombustibles con normas estandarizadas nacionales e internacionales.

7. RECONOCIMIENTOS

Los reactivos y materiales de este trabajo fueron financiados por la DII proyecto P101617_2.2 de la Universidad Internacional SEK, Ecuador; otros materiales y equipos fueron donados por la Corporación para la Investigación Energética del Ecuador.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akgül, F. (2020). Effects of nitrogen concentration on growth, biomass, and biochemical composition of *Desmodemus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 50(1), 98-105.
- Álvarez, N., Fernando, L., Esther, C. P., Elías, L., Antonio, J., López, V., Manuel, J., Rodríguez, N. & Antonio, J. (2016). GROWTH KINETIC OF THE MICROALGAE *Chaetoceros muelleri* IN A PHOTOBIOREACTOR. *Biotecnia*, 19(3), 14–18.
- Andersen, R. A. (2005). Algal culturing techniques. *Elsevier*.
- Arias Peñaranda, M. T., Martínez Roldán, A. D. J., & Cañizares Villanueva, R. O. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biologica Colombiana*, 18(1), 43–70.
- Armas, M. F., & Lasso, S. (2011). Plan de manejo de la reserva biológica Limoncocha. *Quito: Ministerio Del Ambiente*.
- Arredondo-Vega, B. O. & Voltolina, D. (2007). Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal, January 2007*, 23–26.
- Bastidas, O. (2011). Conteo celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*. 1–6.
- Bica, A., Barbu-Tudoran, B., Drugă, B., Coman, C., Nicoară, A., Szöke-Nagy, T., & Dragoș, N. (2012). *Desmodemus Communis* (Chlorophyta) From Romanian Freshwaters: Coenobial Morphology And Molecular Taxonomy Based On The ITS2 Of New Isolates. *ResearchGate*, 17(1).
- Bicudo, C. D. M., & Menezes, M. (2006). Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. São Carlos, Rima.

- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Candela Orduz, R. D. (2016). Las microalgas y el tratamiento de aguas residuales: conceptos y aplicaciones. Una revisión bibliográfica. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bucaramanga
- Castro-Martínez, C., Beltrán-Arredondo, L. I., & Ortiz-Ojeda, J. C. (2012). Producción de biodiesel y bioetanol: ¿una alternativa sustentable a la crisis energética? *Ra Ximhai*, 8, 93–100. <https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.09.cc>
- Chaudhary, R., Khattar, J. I. S., & Singh, D. P. (2014). Microalgae as feedstock for biofuel: Biomass yield, lipid content and fatty acid composition as selection criteria. *Intl J Pow Renew Energ Sys*, 1, 62-71.
- Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., & Wang, J. (2012). Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresource Technology*, 111, 208-214.
- Clarke, A., & Eberhardt, C. (2002). Microscopy techniques for materials science. *Woodhead Publishing*.
- Costa, J. A., Souza, J. P. De, Teixeira, A. P., Nabout, J. C., Carneiro, F. M., Estadual, U., Ueg, D. G., Jardim, B., & Horizonte, N. (2018). Review article Eutrophication in aquatic ecosystems : a scientometric study Eutrofização em ecossistemas aquáticos : um estudo cienciométrico. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 30(2).
- Edenhofer, O., Pichis-Madruga, P. M., & Sokona, Y. (2011). Fuentes de energía renovables y mitigación del cambio climático. In *Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático*. <https://doi.org/ISBN 978-92-9169-331-3>
- Eliás, J. (2018). Efecto del consumo de nitrógeno de la microalga *Desmodesmus communis* sobre la composición bioquímica, productividad de la biomasa, comunidad bacteriana y longitud

ASLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

de los telómeros. Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste, S.C., 1–16.
<http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1732>

Guamán, M., & González, N. (2016). Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador. *Laboratorio de Biotecnología Energética, Corporación*, 1–8.

Guiry, M. (2020). AlgaeBase. *Worldwide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway*. www.algaebase.org

Guldhe, A., Kumari, S., Ramanna, L., Ramsundar, P., Singh, P., Rawat, I., & Bux, F. (2017). Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. *Journal of Environmental Management*, 203, 299-315.

HACH Company. *Nitrate: Cadmium reduction method-Powder Pillow or AccuVac® Ampuls - Method 8039*.

HACH Company. *Oxygen Demand, Chemical: USEPA Reactor Digestion Method. Method 8000*.
DOC316.53.01099

HACH Company. *Phosphorus, Reactive (Orthophosphate): Molybdovanadate method-Reagent Solution or AccuVac® Ampuls - Method 10127*.

Hadi, S. I. I. A., Santana, H., Brunale, P. P. M., Gomes, T. G., Oliveira, M. D., Matthiensen, A., Oliveira, M. E. C., Silva, F. C. P., & Brasil, B. S. A. F. (2016). DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS ONE*, 11(2), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149284>

Hammouda, O., Gaber, A., & Abdelraouf, N. (1995). Microalgae and wastewater treatment. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 31(3), 205-210.

Hegewald, E. (2000). New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). *Algological Studies* 96: 1-18.

Hentschke, G. S., & Torgan, L. C. (2010). *Desmodesmus* e *Scenedesmus* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales, Chlorophyceae) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 61(4), 585–601.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4), 621-639.
- Jia, Q., Xiang, W., Yang, F., Hu, Q., Tang, M., Chen, C., ... & Wu, H. (2015). Low-cost cultivation of *Scenedesmus* sp. with filtered anaerobically digested piggery wastewater: biofuel production and pollutant remediation. *Journal of applied phycology*, 28(2), 727-736.
- Jones, C. S., & Mayfield, S. P. (2012). Algae biofuels: Versatility for the future of bioenergy. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.013>
- Kaur, M. A., Barrow, C. J., Hodgson, P., & Adholeya, A. (2020). Microalga *Scenedesmus bijugus*: Biomass, lipid profile, and carotenoids production in vitro. *Biomass and Bioenergy*, 142, 105749.
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipski, and Sudhir Kumar (2016) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.
- Komolafe, O., Velasquez Orta, S. B., Monje-Ramirez, I., Noguez, I. Y., Harvey, A. P., & Orta Ledesma, M. T. (2014). Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresource Technology*, 154, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.048>
- Krohn, B. J., McNeff, C. V., Yan, B., & Nowlan, D. (2011). Production of algae-based biodiesel using the continuous catalytic Mcgyan® process. *Bioresource technology*, 102(1), 94-100.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

- Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J. P., & Bernard, O. (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science and Technology*, 43(17), 6475–6481. <https://doi.org/10.1021/es900705j>
- Lau, P. S., Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1996). Wastewater nutrients removal by *Chlorella vulgaris*: optimization through acclimation. *Environmental Technology*, 17(2), 183-189.
- López-Elías, J. A., González-Vega, R., Márquez-Ríos, E., & Torres-Arreola, W. (2015). Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muelleri*. *Phyton (Buenos Aires)*, 84(2), 331-337.
- Lortou, U., & Gkelis, S. (2019). Polyphasic taxonomy of green algae strains isolated from Mediterranean freshwaters. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 26(1), 1-12.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
- Morales, E. D., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A., & Arévalo, A. (2013). Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*, 34(1), 129-149.
- Moro, C. V., Crouzet, O., Rasconi, S., Thouvenot, A., Coffe, G., Batisson, I., & Bohatier, J. (2009). New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5729–5733. <https://doi.org/10.1128/AEM.00509-09>
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011a). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water research*, 45(20), 6637-6649.
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011b). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource technology*, 102(1), 35-42.
- Ramírez, M. R. H. (2019). Efecto de la temperatura en el crecimiento de microalgas y la remoción de nutrientes en agua de invernaderos.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
LIMONCOCHA

- Ramírez, I. E., Vela, N. A. C., & Rincón, J. J. (2012). Biodiesel, un combustible renovable. *Investigación y ciencia. Investigación y Ciencia*, 20(55), 62–70.
- Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied energy*, 103, 444-467.
- Romero Salvador, A. (2010). Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 104(2), 331–345. <http://www.rac.es/ficheros/doc/00979.pdf>
- Salazar Pérez, L. E. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. *Universidad de Piura*, 145.
- Sánchez-Bayo, A., López-Chicharro, D., Morales, V., Espada, J. J., Puyol, D., Martínez, F., ... & Rodríguez, R. (2020). Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. *Renewable Energy*, 146, 188-195.
- Sánchez, D. M., Hernández, M. D. R. T., Duhalt, R. V., & Jiménez, A. M. (2001). PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE MICROALGAS. *Researchgate*
- Saltos Rosero, N. (2012). Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino *Lulwarthia grandispora* (*Bachelor's thesis*).
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). A Look Back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program — Biodiesel from Algae Office of Fuels Development. *Program*, July, 1–4.
- Suárez Londoño, M. F. (2019). Perspectivas del biodiésel y las energías renovables a base de biomasa. *Fedepalma*, 40(2), 95–99.
- Sun, X., Li, P., Liu, Y., Turaib, A., & Cheng, Z. (2019). Strategies for enhanced lipid production of *Desmodesmus sp.* mutated by atmospheric and room temperature plasma with a new efficient screening method. *Journal of Cleaner Production*, 119509, 250.
- Tanzi, C. D., Vian, M. A., & Chemat, F. (2013). New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Biosource Technology*, 134, 271–275.

AI SLAMI ENTO, IDENTIFICACI3N Y EVALUACI3N DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus communis* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOL3GICA
LIMONCOCHA

- Vanags, J., Kunga, L., Dubencovs, K., Galvanauskas, V., Balode, M., & Grigs, O. (2014). The effect of shaking, CO₂ concentration and light intensity on biomass growth of green microalgae *Desmodesmus communis*. *Environmental Research, Engineering and Management*, 70(4), 73-79.
- Vega-Quezada, C., Blanco, M., & Romero, H. (2017). Synergies between agriculture and bioenergy in Latin American countries: A circular economy strategy for bioenergy production in Ecuador. *New Biotechnology*, 39, 81–89.
- Verduga Vera, M. E. (2020). Cultivo en batch de *Scenedesmus spp.*, en aguas residuales de industrias l3cticas: Crecimiento, Productividad y Composici3n bioqu3mica. *Universidad de Guayaquil*
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications*,. 18(1), 315–322.
- Wu, J. T., Chiang, Y. R., Huang, W. Y., & Jane, W. N. (2006). Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquatic Toxicology*, 80(4), 338-345.
- Xia, L., Song, S., He, Q., Yang, H., & Hu, C. (2014). Selection of microalgae for biodiesel production in a scalable outdoor photobioreactor in north China. *Bioresource technology*, 174, 274-280.

9. ANEXOS

ANEXO A

Tabla 2: Valores de crecimiento celular, densidad óptica y peso seco

DÍAS	0	1	2	3	4	5
CC	$8,36 \pm 0 E^5$	$1,27 \pm 0,10 E^6$	$1,38 \pm 0,11 E^6$	$1,63 \pm 0,15 E^6$	$1,72 \pm 0,10 E^6$	$2,03 \pm 0,16 E^6$
DO	$1,10 \pm 0,0$	$1,21 \pm 0,13$	$1,36 \pm 0,13$	$1,50 \pm 0,14$	$1,70 \pm 0,14$	$2,08 \pm 0,12$
PS	$0,73 \pm 0,11$	$0,92 \pm 0,12$	$1,20 \pm 0,14$	$1,30 \pm 0,14$	$1,51 \pm 0,16$	$1,74 \pm 0,09$
DÍAS	6	7	8	9	10	
CC	$2,20 \pm 0,17 E^6$	$2,39 \pm 0,19 E^6$	$2,54 \pm 0,23 E^6$	$2,62 \pm 0,24 E^6$	$2,56 \pm 0,22 E^6$	
DO	$2,18 \pm 0,11$	$2,35 \pm 0,07$	$2,50 \pm 0,14$	$2,53 \pm 0,11$	$2,53 \pm 0,11$	
PS	$1,80 \pm 0,09$	$2,05 \pm 0,20$	$2,21 \pm 0,15$	$2,40 \pm 0,15$	$2,37 \pm 0,12$	

CC: concentración celular (cel/mL)

DO: densidad óptica (680nm)

PS: peso seco (g/L)

ANEXO B

Tabla 3: Valores de nitratos, fósforo reactivo, demanda química de oxígeno y pH

DÍAS	0	1	2	3	4	5
NO₃⁻	$1125,5 \pm 58,69$	$1042,5 \pm 43,13$	$967 \pm 42,43$	$894,5 \pm 26,16$	$832,5 \pm 91,22$	$774,5 \pm 107,22$
PO₄³⁻	$158,2 \pm 0,71$	$149,5 \pm 0,71$	$146 \pm 1,41$	$145 \pm 1,41$	$144 \pm 1,41$	$143,3 \pm 0,99$
DQO	$116 \pm 5,66$	$97,5 \pm 3,54$	$82,5 \pm 3,54$	$72 \pm 4,24$	$65,5 \pm 3,54$	$55,5 \pm 4,95$
pH	$7,85 \pm 0$	$7,94 \pm 0,01$	$7,92 \pm 0,01$	$7,90 \pm 0,01$	$7,94 \pm 0,01$	$7,94 \pm 0,01$
DÍAS	6	7	8	9	10	
NO₃⁻	$652,5 \pm 117,66$	$604,9 \pm 133,08$	$508 \pm 72,12$	$474,1 \pm 88,95$	$440,7 \pm 55,65$	
PO₄³⁻	$141,7 \pm 0,49$	$140,5 \pm 0,71$	$139,5 \pm 2,12$	$138,5 \pm 0,71$	$136,5 \pm 0,71$	
DQO	$50 \pm 7,07$	$44 \pm 7,07$	$36,5 \pm 7,78$	$32,5 \pm 10,61$	$28,5 \pm 10,61$	
pH	$7,89 \pm 0,03$	$7,92 \pm 0,03$	$7,94 \pm 0,01$	$7,92 \pm 0,02$	$7,93 \pm 0,03$	

NO₃⁻: concentración nitratos (mg/L)

PO₄³⁻: concentración fósforo reactivo (mg/L)

DQO: demanda química de oxígeno (mg/L)

ANEXO C

Tabla 4: Porcentajes de lípidos en extracción con biomasa húmeda y seca

Lípidos húmedo	%	Lípidos seco	%
Cloroformo:Metanol (1:2)	7,46	Cloroformo:Metanol (1:2)	19,70
Acetato de etilo	6,46	Acetato de etilo	13,14

ANEXO D

Tabla 5: Porcentajes de ácidos grasos libres en extracción con biomasa seca

AGL	%
Cloroformo:Metanol (1:2)	63,46
Acetato de etilo	54,17

ANEXO E

Tabla 6: Productividad volumétrica y productividad específica de la biomasa

BIOMASA	Productividad volumétrica	Productividad específica
Seca	0,24 g/L d	0,1 d ⁻¹

ANEXO F

Tabla 7: Porcentajes de ácidos grasos libres en extracción con biomasa seca

LÍPIDOS		Productividad volumétrica	Productividad específica
Húmedo	Cloroformo:Metanol (1:2)	0,0155 g/L d	0,0065 d ⁻¹
	Acetato de etilo	0,0179 g/L d	0,0075 d ⁻¹
Seco	Cloroformo:Metanol (1:2)	0,0473 g/L d	0,0197 d ⁻¹
	Acetato de etilo	0,0315 g/L d	0,0131 d ⁻¹