



ECUADOR
UNIVERSIDAD
INTERNACIONAL
SEK
SER MEJORES

FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE
MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA”**

Realizado por:

NELY ALEXANDRA GUATEMAL MATANGO

Director del proyecto:

PhD (c) Johanna Medrano Barboza

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 13 septiembre de 2023

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS
CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

DECLARATORIA JURAMENTADA

Yo, NELY ALEXANDRA GUATEMAL MATANGO, con cédula de identidad # 1004840474, declaro bajo juramento que este trabajo es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a 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.



FIRMA

1004840474

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS
CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE
CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE
ORIGEN ACUÍCOLA”**

Realizado por:

NELY ALEXANDRA GUATEMAL MATANGO

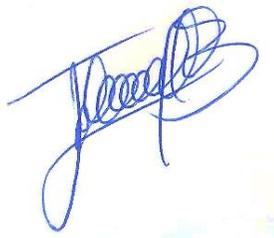
como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por la profesora

JOHANNA LUCÍA MEDRANO BARBOZA

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Medrano Barboza', written over a faint, light-colored rectangular stamp or watermark.

FIRMA

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS
CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

PhD. KATTY CORAL CARRILLO

PhD. JESUS LÓPEZ VILLADA

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



FIRMA



FIRMA

Quito, 13 de septiembre de 2023

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de

Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

Energías, Ambiente y Biotecnología

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre, Rebeca Matango, por creer siempre en mí, por ser un ejemplo de mujer guerrera, porque gracias a su esfuerzo, constancia y amor para cada uno de sus hijos me ha permitido seguir estudiando y no decaer en el camino.

A mi padre, Marco Guatemal, por su fuerza de voluntad para cada día luchar contra su adicción y demostrarme que cualquier objetivo en esta vida, acompañado de amor y voluntad es posible.

A mi hermano mayor, David Guatemal por acompañarme en cada proceso de mi vida, por regalarme su tiempo, escucharme y apoyarme cuando el mundo se me cae encima.

A mis hermanas; Soly y Marilyn Guatemal, por el cariño incondicional y el acompañe en cada una de las travesías de la vida.

A mis hermanos menores; Evo, Amaru y Killary por enseñarme, con su ternura, a ser mejor cada día.

También dedico este proyecto a mi comunidad donde me vieron nacer, me enseñaron la importancia del trabajo colectivo, la conservación de la biodiversidad y el cariño hacia mi identidad.

Y a todas las niñas y jóvenes de las generaciones que me siguen para busquen prepararse constantemente, recorran nuevos espacios de conocimiento, persigan sus sueños y con ello la independencia económica, sentimental y personal. ¡Luchen por sus derechos!

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la profesora Johanna Medrano por su acompañamiento en todo el proceso de la investigación. Gracias por su paciencia y su tiempo, por compartir su conocimiento, por sus consejos y por su personalidad carismática. A los profesores Katty Coral y Jesús López por todo el tiempo invertido para guiarme en este proyecto. A la Universidad por brindarme todas las herramientas para crecer en mi vida profesional.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS
CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Para someter a:

To be submitted:

**Nely Alexandra Guatemal Matango¹, Johanna Medrano Barboza^{1*}, Jesús López
Villada¹, Katty Coral Carrillo¹**

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE
MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA”**

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

13 de septiembre de 2023

*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

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

RESUMEN

El desarrollo acuícola conlleva residuos que presentan restos de alimento no consumido por los peces, heces y orina, y químicos de desinfección, los cuales generan una gama de contaminantes que afectan al medio ambiente; sin embargo, los efluentes de este tipo tienen la capacidad para ser fuente nutritiva para el cultivo de las microalgas, las cuales son capaces de remediar las aguas residuales y además de producir biomasa con un contenido lipídico importante para la producción de biocombustibles, mostrando una capacidad fotosintética mejor que las plantas terrestres. En esta investigación se realizó un cultivo en consorcio de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en agua residual de origen acuícola para determinar sus parámetros fisicoquímicos, crecimiento celular y su rendimiento lipídico. En el crecimiento celular se obtuvo 0,497 g/L de biomasa total con una productividad específica de 0.077 d⁻¹. En el análisis de parámetros fisicoquímicos, durante los 12 días de cultivo se logró un porcentaje de remoción de 90,8% m/m de carbono orgánico total (COT), 68,42% m/m de nitrógeno total (NT) y 58,2% m/m de fósforo total (PT). Se utilizaron cinco tipos de solventes para la extracción de lípidos: cloroformo-metanol (1:2), acetato de etilo, metanol, etanol y metilciclohexano. De los cinco solventes empleados, la mezcla cloroformo:metanol (1:2) obtuvo los valores más altos de extracción de lípidos (23,8% m/m), ácidos grasos libres (AGL) (36,56% m/m) y de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)(75% m/m). De acuerdo a los resultados de este estudio, el cultivo de consorcio con respecto a las especies cultivadas individualmente, no demostró una eficacia considerable con respecto a los análisis de lípidos, AGL y FAME, pero sí presentó un buen porcentaje de remoción, por lo que se puede considerar apto para procesos de biorremediación de aguas residuales.

Palabras claves: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., consorcio, agua residual acuícola, lípidos.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

ABSTRACT

Aquaculture development entails residues that present remains of food not consumed by the fish, feces, and urine, and disinfection chemicals, which generate a range of pollutants that affect the environment; however, effluents of this type have the capacity to be a nutritional source for the cultivation of microalgae, which are capable of remediating wastewater and, in addition to producing biomass with an important lipid content for the production of biofuels, showing a capacity photosynthetic better than terrestrial plants. In this research, a consortium culture of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. in residual water of aquaculture origin to determine its physicochemical parameters, cell growth, and lipid yield. In cell growth, 0.497 g/L of total biomass was obtained with a specific productivity of 0.077 d⁻¹. In the analysis of physicochemical parameters, during the 12 days of cultivation, a removal percentage of 90.8% m/m of total organic carbon (TOC), 68.42% m/m of total nitrogen (NT), and 58 0.2% m/m total phosphorus (TP). Five solvents were used for lipid extraction: chloroform-methanol (1:2), ethyl acetate, methanol, ethanol, and methylcyclohexane. Of the five solvents used, the chloroform: methanol (1:2) mixture obtained the highest values of lipid extraction (23.8% m/m), free fatty acids (FFA) (36.56% m/m) and fatty acid methyl esters (FAME) (75% m/m). In this study, the consortium culture, concerning the species cultivated individually, did not demonstrate considerable efficacy for lipid, FFA, and FAME analyses. However, it did present a good removal percentage, so it can be considered suitable for processing wastewater bioremediation.

Key words: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., consortium, aquaculture wastewater, lipids.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el consumo de combustibles fósiles ha generado que las reservas de petróleo disminuyan y aumenten las emisiones de CO₂. Según Alcocer (2023) La mayor producción energética mundial proviene de recursos como el petróleo. Ante esta realidad, las personas buscan constantemente nuevas formas de obtener energía que, además sea lo más amigable posible con el ambiente.

Los biocombustibles se han convertido en una fuente energética que se obtiene mediante diversas biomásas de origen renovable y que, además demuestran una reducción de un 50% de las emisiones de gases dañinos para el medio, por lo que se reemplazan una parte de los combustibles fósiles utilizados para el transporte o la energía (Millinger et al, 2018).

Los biocombustibles se clasifican según el tipo de biomasa de la que proceden y el método de producción:

- **Biocombustibles de Primera Generación:** A esta clasificación pertenecen todos los biocombustibles que se obtienen a partir de biomasa comestibles como el bioetanol que se produce a partir de la fermentación de azúcares como la caña de azúcar y el suero de leche o los bioaceites y biodiésel obtenidos a partir de cultivos oleaginosos (Mohr & Raman, 2013). La parte negativa de este tipo de biocombustibles según Alalwan et al., (2019) es que aumenta el costo de producción y provoca una utilización ineficiente de los recursos y la energía gastada en el cultivo. En general, este tipo de biocombustibles presentan una baja tasa de retorno energético (Energy Return of Investment o EROI según sus siglas en inglés): para el bioetanol en base a la caña de azúcar el coeficiente es de 1,797, para maíz de 1,040 (Chiriboga et al, 2020). Es decir que, para obtener este tipo de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

biocombustibles además de competir con los cultivos destinados a ser alimento, la energía obtenida es menor a la energía invertida por lo que no tiene sentido su producción.

- Biocombustibles de segunda generación: Estos combustibles son obtenidos, principalmente a partir de biomasa lignocelulósica no comestible como los residuos agrícolas, la madera y los desechos sólidos urbanos. (Alalwan et al., 2019).

Según Mathimani & Pugazhendhi (2019), los biocombustibles de segunda generación presentan una ventaja ya que, al generarse de distintos tipos de materia prima, los cuales no son de consumo humano, no presentan competencia con la industria de alimentos.

- Biocombustibles de tercera generación: la materia prima para este tipo de biocombustibles son las macroalgas, microalgas y cianobacterias. El rendimiento de estos microorganismos es superior al de la biomasa lignocelulósica. Este biocombustible ha llamado la atención por sus beneficios duales, ya que también presenta un alto consumo de dióxido de carbono (Abdullah et al., 2019) y además no compite con la industria de alimentos (Sánchez-Bayo et al., 2020).

Según Zaines y Khanna (2013) la Tasa de Retorno Energético (EROI) para los combustibles de microalgas oscila entre 0,26 y 1,20.

- Biocombustibles de cuarta generación: La materia prima de estos combustibles son microorganismos genéticamente modificados metabólicamente para sintetizar sustancias de valor agregado con un aumento significativo de lípidos o carbohidratos. Dentro de este grupo se encuentran las microalgas, bacterias y cianobacterias. (Abdullah et al., 2019).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Según Shokravi, et al. (2022), las microalgas crecen rápido ya que presentan un ciclo de cosecha más corto que la biomasa de los biocombustibles de primera y segunda generación. Además, estudios indican que el rendimiento de aceite por extensión de tierra es mucho mayor en las microalgas (57000 y 19000 L/acre según la especie) en comparación con otros materiales como aceite de palma (2403,47 L/acre) o aceite de maíz (68,23 L/acre) (Mariadhas et al., 2023).

Para un crecimiento óptimo de las microalgas se debe tener en cuenta algunas condiciones como: los macronutrientes (P, N y C), los micronutrientes, el pH en un rango de 6-8, la temperatura de 20 a 30 °C; además, es muy importante controlar factores como la agitación, el aporte de oxígeno y dióxido de carbono, y la intensidad de luz (Daliry, et al, 2017). Sin embargo, existen investigaciones donde algunas especies han conseguido adaptarse a condiciones elevadas de pH, temperatura y salinidad (Khan et al., 2018). Para obtener mejores rendimientos lipídicos de las microalgas, estas se someten a condiciones de estrés de limitación de nitrógeno y aumento de hierro en el medio (Daliry et al, 2017).

La importancia de la producción de las microalgas radica en su capacidad para generar lípidos, su alta tasa de crecimiento, producción de proteínas antioxidantes y más bioproductos, por lo que son codiciadas para la industria de biocombustibles, suplementos alimenticios, farmacéutica y los cosméticos (Khan et al., 2018).

Las microalgas ideales para la producción de biodiesel deben cumplir ciertas condiciones, tales como: alta tasa de crecimiento, capacidad de adaptación a cambios en el medio o condiciones atmosféricas, y buena capacidad para formar agregados o flóculos para la cosecha por sedimentación (Hernández & Labbé, 2014). Son microalgas oleaginosas porque almacenan energía en forma de lípidos o triglicéridos, y entre las más estudiadas para fines de producción de biocombustibles resaltan especies de microalgas como *Ankistrodesmus* sp., *Kirechneriella* sp.,

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Palmella sp., *Eudorina elegans*, *Volvox* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., etc. otros (Cobos et al. 2012).

Chlorella vulgaris y *Scenedesmus* sp. son cepas consideradas como un buen potencial para la producción de biocombustibles debido a su alta tasa de crecimiento, su capacidad de producción de bioactivos y de biorremediador por su habilidad de remoción de contaminantes (Zewdie & Ali, 2020)

Con este trabajo se pretende producir ésteres metílicos de ácidos grasos (fatty acid methyl ester o FAME– por sus siglas en inglés) son compuestos de origen orgánico obtenidos a través de una síntesis denominada transesterificación de ácidos grasos en reacción con metanol y en presencia de un catalizador (Vega et al, 2022). FAME es un constituyente del biodiesel y un combustible alternativo prometedor por sus propiedades similares a las del combustible normal. Presenta una longitud de cadena que varía de 12 a 22 átomos de carbono y si el ácido graso es insaturado presenta una configuración cis. (Ibadurrohman et al., 2021).

Se formuló como hipótesis que el agua de origen acuícola presenta los nutrientes necesarios para que la biomasa del consorcio de microalgas obtenido del cultivo presente un porcentaje de lípidos superior al 20% y de ácidos grasos libres superior al 80%, de tal manera que sus ésteres metílicos de ácidos grasos sean óptimos en la producción de biodiésel a partir de la transesterificación de sus lípidos.

Se estableció como objetivo el determinar el rendimiento de lípidos a partir de un consorcio microalgal formado por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual acuícola con fines de producción de biocombustibles líquidos para eso se inició con la caracterización del agua residual mediante análisis fisicoquímicos para determinar su uso potencial como medio de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

cultivo del consorcio de microalgas. Luego se analizó el crecimiento del consorcio en un fotobiorreactor para la producción de biomasa con fines de extracción de lípidos. Se caracterizó la fracción lipídica de la biomasa cultivada mediante procesos de extracción de lípidos totales, ácidos grasos libres y ésteres metílicos de ácidos grasos para la comprobación de su potencial de uso en la producción de biodiésel. Finalmente, se realizó una caracterización cuantitativa mediante la técnica de cromatografía en capa fina para comprobar la conversión de los ácidos grasos a FAME.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitio de estudio

2.1.1. Recolección del agua residual

Pacto es a una de las parroquias del Distrito Metropolitano de Quito. Se encuentra en la provincia de Pichincha – Ecuador, al extremo noroccidente a 70 km de la capital; entre las parroquias de García Moreno, San Miguel de los Bancos, Gualea y Pedro Vicente Maldonado. Forma parte de la Reserva de biosfera del Chocó Andino. Pacto presenta una altitud entre los 500 a 1800 m.s.n.m, con una temperatura que varía entre los 17 °C a 20 °C. Debido a la gran cantidad de piscinas acuícolas (Figura 1), donde se encuentran criaderos de especies como: truchas, tilapias, carpas, etc., se ha elegido este lugar para la recolección del agua residual.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA



Figura 1. Estanque de acuícola en la parroquia de Pacto

2.2. Metodología

Se planteó la siguiente metodología que consta de tres fases: la fase de campo, de laboratorio y la fase estadística como se muestra en la figura 2.

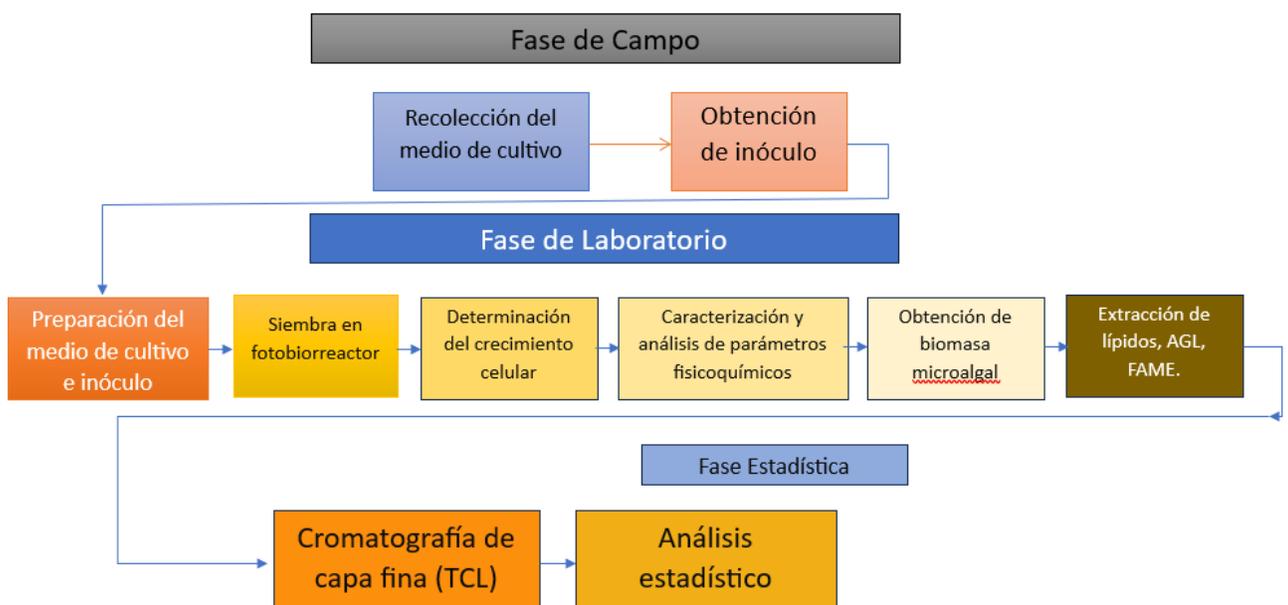


Figura 2. Flujo de trabajo para la metodología de investigación

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

2.2.1. Fase de campo

• Recolección del medio de cultivo

Se recogieron 100 litros de aguas residuales de acuicultura en un tanque de criadero de peces en Pacto. Se utilizó un madero para remover brevemente el agua, de modo que los nutrientes acumulados en la parte inferior de la piscina quedaran flotando en toda la superficie. El agua de acuicultura se colocó en cinco frascos de plástico de 20 L cada uno, se sellaron con envoltura de plástico y se etiquetaron adecuadamente, se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Los análisis y parámetros fisicoquímicos del agua se muestran en la Tabla 1 en la sección 2.1 de Resultados.

• Obtención del inóculo

Se obtuvieron cepas de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. adquiridas del Banco Español de Algas, que se preservaron en la ciudad de Quito, Ecuador en el Laboratorio de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK en medio Bold's Basal Medium (BBM) 1:10 (10 g de NaNO₃, 3 g de MgSO₄·7H₂O, 1 g de NaCl, 3 g de K₂HPO₄, 7 g de KH₂PO₄, 1g de CaCl₂·2H₂O. Como elementos traza en solución: 8.82 g de ZnSO₄·7H₂O, 1.44 g de MnCl₂·4H₂O, 0.71 g de MoO₃, 1.57 g de CuSO₄·5H₂O, 0.49 g de Co(NO₃)₂·6H₂O y 11.42 g de H₃BO₃, 50 g de EDTA, 31 g de KOH, 4.98 g de FeSO₄·7H₂O y 1 mL de H₂SO₄ concentrado). Se mantuvo con luz artificial en fotoperiodos de 12 horas con aireación constante a 4.2 L/min, realizando cambios de medio cada 15 días.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

2.2.2. Fase de Laboratorio

• Caracterización del medio de cultivo

Se recolectaron 150 mL del agua residual en una botella esterilizada mediante UV y se analizó el contenido en mg/L de los principales macronutrientes para un crecimiento óptimo del crecimiento de microalgas: Nitrógeno Total (NT), Fósforo Total (PT) y Carbono Orgánico Total (COT) mediante los protocolos HACH análogos al método 1072 (HACH 2014a), 10127 (HACH 2014c) y 10128 (HACH 2014b), respectivamente.

• Preparación de medio de cultivo

Debido a que el agua de origen acuícola recolectada presenta partículas sólidas que van a irrumpir en el óptimo crecimiento de las microalgas, se removi6 dichas partículas mediante un filtro cilíndrico multicapas. Posteriormente, el agua filtrada se sometió a esterilización en un recipiente de vidrio resistente al calor de 5 galones, en autoclave a 121°C y 15 PSI por 30 minutos y se dejó enfriar para después almacenar hasta su uso en recipientes plásticos de 20 L.

• Preparación del in6culo

Se prepararon 3 fotobiorreactores pequeños con botellas de 1L en los cuales se inocularon 80 mL del consorcio en 720 mL de medio BBM. Se mantuvieron a temperatura ambiente, con luz artificial de focos led de 18 W. (como se observa en la figura 3) en fotoperiodos de 12 horas y una entrada de aire constante junto con un filtro de salida de aire durante 7 días hasta alcanzar

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

una concentración de 10^6 cel/mL, el cual se determinó mediante un conteo celular diario.



Figura 3. Fotobiorreactores con inóculo

• Siembra del inóculo en fotobiorreactor



Figura 4. Fotobiorreactor con cultivo de consorcio microalgal

Una vez que el inóculo llegó a la concentración deseada (10^6 cel/mL) se mezcló 2,5 litros del consorcio con medio BBM en un fotobiorreactor de 71,3 cm de largo * 8,8 cm de ancho * 61 cm de alto (como se presenta en la figura 4) con 25 litros de agua residual previamente tratada y

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

filtrada. El fotobiorreactor se conectó con mangueras de aireación a un compresor que permite un burbujeo constante de 4,2 L/min para que se encuentre removiendo las microalgas por todo el fotobiorreactor evitando su sedimentación. También se colocó una termocupla para controlar la temperatura y mantenerla a $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$. El pH se monitoreó diariamente verificando que se encontrara cerca del pH neutro constante; se utilizó NaOH 1M en el caso de que se encontrara muy ácido y si el pH se encontraba muy alcalino se utilizó HCl 1M. El cultivo se mantuvo en condiciones de laboratorio en Quito durante 12 días (del 08 al 20 de mayo de 2023).

• Determinación de crecimiento de microalgas

Para determinar el crecimiento de microalgas, todos los días, durante los 12 días, se recolectaron 50 mL del agua de cultivo en botellas de plástico etiquetadas y desinfectadas mediante UV. Posterior a su uso se mantuvieron en refrigeración a 4°C .

Se realizó espectrometría, conteo celular y peso seco por triplicado para tener una mejor exactitud estadística.

❖ Para la densidad óptica se utilizó el espectrofotómetro marca HACH 5000. Se siguió el protocolo de Arias (2013), a una longitud de onda de 680 nm. Se agitó el frasco que contenía la muestra de cada día para tener un medio homogéneo, se añadió 1 mL de la muestra a la celda del espectrofotómetro con una micropipeta y se midió la absorbancia.

❖ Para realizar el conteo celular, se tomaron 2 gotas de la muestra homogenizada y se utilizó la cámara de Neubauer en un microscopio óptico marca Leica

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

con el lente 40X. Se determinó la concentración celular aplicando la Ecuación 1.

$$\text{Concentración celular } \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\# \text{ células } \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) * 100}{\# \text{ de cuadros} * \text{dilución}} \quad \text{Ec 1}$$

❖ Se realizó el peso seco con el uso de filtros de papel filtro para análisis cualitativo. Primero se etiquetaron los filtros de papel, luego se procedió a pesar para obtener el valor inicial. Se colocó 1 mL de la muestra previamente homogenizada en el papel, se colocaron en un vidrio reloj y se sometió a secado en estufa a 60°C durante 24 horas. Pasado el tiempo establecido, se pesó el filtro con la muestra y mediante la Ecuación 2 (utilizada por Vega et al, 2022) se logró obtener el peso final.

$$\text{Peso seco } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Filtro seco} + \text{muestra seca}(\text{g}) - \text{filtro inicial}(\text{g})}{\text{volúmen de la muestra}(\text{mL})} \quad \text{Ec 2}$$

También se utilizaron algunas fórmulas usadas en la investigación de Vega et al (2022) para calcular: la productividad volumétrica (PV) utilizando la Ecuación 3, la productividad específica de la biomasa con la Ecuación 4, el tiempo de duplicación de las microalgas con la Ecuación 5, y la tasa de crecimiento específica con la Ecuación 6 donde N_T representa el número de células al final de la fase exponencial, N_0 es el número de células al comienzo de la fase exponencial, T_T es el día final de la fase exponencial, y T_0 es el día de inicio de la misma fase.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

$$PV \text{ de biomasa } \left(\frac{g}{Ld}\right) = \frac{\text{peso de biomasa seca}(g)}{\text{volúmen de cultivo}(L) * \text{tiempo de cultivo}(d)} \quad Ec 3$$

$$PE \text{ de biomasa} = \frac{PV \text{ de biomasa } \left(\frac{g}{Ld}\right)}{\text{Concentración de biomasa } \left(\frac{g}{L}\right)} (d^{-1}) \quad Ec 4$$

$$\text{Tiempo de duplicación } (t_D) = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu} (\text{días}) \quad Ec 5$$

$$\text{Tasa de crecimiento específica } (\mu) = \frac{\text{Ln}\left(\frac{N_T}{N_0}\right)}{T_T - T_0} (d^{-1}) \quad Ec 6$$

- **Parámetros fisicoquímicos**

Para determinar la remoción de los macronutrientes se centrifugaron las muestras recolectadas diariamente a 4500 RPM durante 5 min. Se utilizó el sobrenadante para analizar la concentración de los macronutrientes Nitrógeno Total (NT), Fósforo Total (PT) y Carbono Orgánico Total (COT) por triplicado, mediante los protocolos HACH. Mediante la Ecuación 7 usada por Vega et al (2022), utilizando la concentración inicial del nutriente (C_I) y la concentración final (C_F) entre la concentración inicial (C_I) por 100% se obtuvo el porcentaje de remoción de nutrientes.

$$\% \text{ Remoción de Nutrientes} = \frac{(C_I - C_F)}{(C_I)} * 100 \quad Ec 7$$

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

- **Cosecha y obtención de biomasa microalgal**

Una vez que el cultivo cumplió los 12 días, se observó que las microalgas llegaron a la fase de lisis por la disminución de los parámetros del crecimiento celular, se procedió a centrifugar el producto del fotobiorreactor a 4500 RPM durante 5 min para eliminar la mayor humedad posible y obtener la biomasa. Esto se realizó en tubos falcon de 50 mL. 4L del sobrenadante resultante de este proceso se recogió en un recipiente y lo demás se desechó. Posteriormente se colocó la biomasa centrifugada en vidrios reloj para llevarlos a secado en la estufa durante 24 horas a 60 °C. Luego, mediante raspado se obtuvo la biomasa seca, se pesó para determinar la biomasa total y se guardó para los análisis posteriores.

- **Extracción de lípidos**

Se extrajeron los lípidos totales mediante el método de Bligh & Dyer modificado por IMARPE (Salazar, 2012) usando cinco solventes: cloroformo- metanol (1:2), metilciclohexano, acetato de etilo, etanol y metanol.

En un falcon de 50 mL se colocaron 0,5 g de la biomasa seca con 20 mL de solvente en cada uno y se dejó reposar por 2 días. Transcurrido los 2 días se sometió a un sonicador por 45 min para lograr la disrupción celular. Luego se dejó incubar a 28 °C durante 24 h. Se sometió nuevamente a un sonicador por 45 min y se centrifugó por 30 min. Se obtuvo el sobrenadante y se colocó en otro recipiente Falcon limpio. Se agregaron 6 mL de NaCl al 0.58% v/v y se homogeneizó mediante centrifugaciones a 4000 RPM

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

para separar la parte orgánica y la acuosa. Se procedió a pesar los frascos vacíos previamente etiquetados y luego los frascos con la parte orgánica seca a 80°C hasta eliminar toda el agua y solvente. Finalmente, se obtuvo el porcentaje lipídico mediante la Ecuación 8 (usado por Vega et al, 2022), donde P_L se refiere al peso del frasco con el contenido lipídico ya extraído y seco, y P_B al peso de la biomasa microalgal donde el porcentaje total será representado en % m/m.

$$\% \text{ Lípidos} = \left(\frac{P_L}{P_B} \right) * 100 \quad \text{Ec 8}$$

También se calculó la productividad volumétrica de los lípidos usando la Ecuación 9 (usada por Vega et al, 2022); donde M_L representa la masa de lípidos, V es el volumen del cultivo y t es el tiempo en días (t).

$$\text{Productividad Total Volumétrica} \left(\frac{g}{Ld} \right) = \left(\frac{M_L}{V * t} \right) \quad \text{Ec 9}$$

Y mediante la Ecuación 10 (usada por Vega et al, 2022) se calculó la productividad específica de biomasa usando el valor de la productividad volumétrica de biomasa por la concentración de biomasa.

$$\text{Productividad específica de biomasa} (d^{-1}) = \frac{\text{Prod. Vol. Biomasa} \left(\frac{g}{Ld} \right)}{\text{Concentración de biomasa} \left(\frac{g}{L} \right)} \quad \text{Ec 10}$$

- **Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL):**

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Para la extracción de Ácidos Grasos Libres totales (AGL) se utilizó el protocolo de Tanzi et al, (2013) que consiste en la saponificación de biomasa seca con los cinco solventes usados en el anterior procedimiento. Se montó un equipo de reflujo como se observa en la figura 5A y se procedió a saponificar 0,5g de biomasa microalgal con una disolución de 20 mL de metanol y 0,1 g de KOH, se mantuvo en reflujo a 60 °C durante 4 horas a 300 RPM. Pasado el tiempo se filtró y se adicionó HCl 1M hasta ajustar el pH a 5. Luego se trasvasó la solución a un embudo de decantación de 50 mL adicionando el mismo volumen de agua, y se eliminaron los gases. A continuación, se procedió a pesar los tubos vacíos previamente etiquetados y adicionar la mezcla del embudo en los frascos para someter a secado a 80°C hasta que su peso se mantenga constante. Finalmente, se pesaron los frascos secos con la muestra de AGL.



Figura 5. A. Equipo de reflujo para saponificación de biomasa de consorcio. B: separación de la fase acuosa y la fase orgánica después del proceso de extracción.

Para calcular el porcentaje de Ácidos grasos libres (AGL) se utilizó la Ecuación 11; donde

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

(T_1) hace referencia al peso del frasco vacío, (T_2) al peso de frasco con la muestra, (W) es la masa inicial utilizada para realizar la extracción.

$$\%AGL = \left(\frac{T_2 - T_1}{W} \right) * 100 \quad Ec 11$$

- **Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME):**

La extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos se determinó mediante tres procesos (como se observa en la figura 6): directo (a partir de la biomasa seca) e indirecto (a partir de lípidos extraídos y a partir de ácidos grasos libres). Se usó un catalizador ácido homogéneo (H_2SO_4) y un catalizador ácido heterogéneo (Resina comercial CT-269DR). En cada reactor de vidrio se colocó catalizador:solvente:biomasa o grasa en una proporción es (1,74:15:1) para el catalizador homogéneo y (1.1:70:1) para el catalizador heterogéneo (Vega et al., 2022). Los reactores se colocaron en baño térmico con agua y piezas de vidrio o espuma Flex para evitar la evaporación rápida. Se mantuvieron las condiciones de reacción de temperatura a 90 °C, agitación a 900 RPM durante 4 horas. Posteriormente se filtró con el equipo Millipore y se adicionó 2 mL de hexano-dietiléter (80:20) para eliminar impurezas. Finalmente, se separó la fase orgánica de la acuosa en un embudo de decantación y se colocó en recipientes previamente etiquetados y pesados para luego poner a secar a 80°C hasta que su peso se mantenga constante.

Se calculó el rendimiento mediante la ecuación 12 (usado por Vega et al, 2022); donde T_2 se refiere a el peso del tubo con la muestra seca, T_1 indica el peso inicial del tubo vacío y W significa la biomasa seca utilizada para la reacción.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

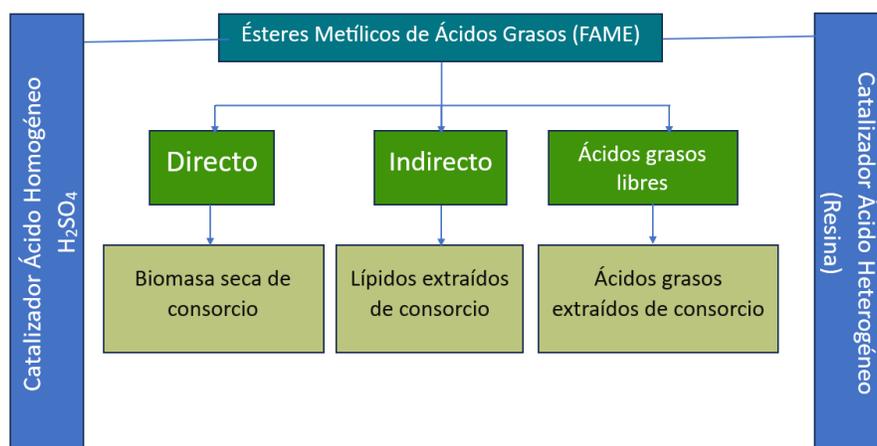


Figura 6. Proceso para la obtención de FAME

$$\%FAME = \left(\frac{T_2 - T_1}{W} \right) * 100 \quad Ec 12$$

- **Cromatografía por capa fina (TLC)**

En la cromatografía en capa fina se utilizó una placa de gel sílice de 40 x 80 mm de 0.2 mm de sílica gel. Se trazó una línea (denominada origen) con lápiz de grafito a 1 cm de la base donde se marcaron tres puntos como se muestra en la figura 15 de la sección 3.7; el primero es el estándar (oleato de colesterol) que se utilizó como control, el segundo es la muestra de los lípidos de AGL y el tercero es la muestra de los lípidos de FAME. También se trazó otra línea de 1 cm al extremo opuesto del origen que se denomina Frente del Disolvente. Una vez graficados los diferentes puntos se colocaron las placas en la estufa a 100°C durante 30 min para activarlos. Pasado el tiempo, se agregó las muestras disueltas con 5 µL de su propio solvente extractor en los puntos descritos anteriormente y se dejó reposar la placa sobre la fase móvil de cloroformo puro en un frasco con tapa por 10 min. Después se reveló la corrida a través de vapores de yodo en un frasco con perlas de yodo por 10 minutos más. Finalmente se determinó el factor de retención (*Rf*) mediante la Ecuación (13); donde Y es la distancia desde el punto de origen hasta el punto

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

de corrida de las muestras y X es la distancia desde el origen hasta el frente del disolvente.

Cabe recalcar que la cromatografía se realizó con el mejor solvente extractor de AGL y FAME

$$R_f = \left(\frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}(Y)}{\text{Distancia recorrida por la muestra}(X)} \quad Ec 13 \right)$$

2.3. Análisis estadísticos de los datos.

Los valores obtenidos de los diferentes parámetros de concentración celular, peso seco, densidad óptica, pH, remoción de nutrientes (NT, PT y COT), porcentaje de lípidos, AGL y FAME, los cuales se hicieron por triplicado fueron réplicas técnicas y se comparó sus medias a través de la prueba Kruskal Wallis con el programa Statgraphics versión 18 y se expresaron con valores de desviación estándar ($X \pm DE$). Las diferencias entre medias significativas se dan cuando ($p < 0,05$). Además, todos los datos obtenidos se compararon con los resultados del cultivo de *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual acuícola de Thaís Flor et al (2023) y *Chlorella vulgaris* de Vega et al (2022) cultivada en la misma agua.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización del medio de cultivo

Se puede observar en la tabla 1, los valores obtenidos de los macronutrientes presentes en el agua residual de origen acuícola y en el medio BBM. Se observa que el carbono orgánico total

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

se encuentra con una mayor concentración en el agua acuícola, mientras que el fósforo y nitrógeno total se presenta en una menor proporción en el agua de origen acuícola respecto al BBM.

Tabla 1. Caracterización del agua de origen acuícola y medio BBM mediante análisis fisicoquímicos.

PARÁMETRO (mg/L)	AGUA ACUÍCOLA	MEDIO BBM
CARBONO ORGÁNICO TOTAL	188,5	39,5
NITRÓGENO TOTAL	11	67,5
FÓSFORO TOTAL	37,83	125,85

3.2. Determinación del crecimiento celular

3.2.1. Densidad óptica

Los valores obtenidos en la absorbancia a 680 nm realizada durante los 12 días de cultivo del consorcio se graficaron junto con los valores de las especies *Chlorella vulgaris* (Vega et al ,2022), *Scenedesmus* sp. (Flor et al, 2023) cultivadas de manera independiente en agua residual de acuícola durante 12 y 13 días respectivamente (Figura 7). En la curva de absorbancia de *Chlorella vulgaris* se puede observar que inicia con un valor de $0,57 \pm 0,01$, se tarda solo un día para llegar a la fase exponencial con un valor de $1,16 \pm 0,008$. Se puede notar que desde el día 9 sus valores van en descenso hasta terminar el día 12 con $1,33 \pm 0,004$. Por otro lado, la curva de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

absorbancia de *Scenedesmus* sp. muestra un crecimiento exponencial desde el día 2 al día 11 ($1,72 \pm 2,00 \cdot 10^{-3}$) llegando a una fase de lisis celular desde el día 12 hasta del día 13 con un registro de $1,563 \pm 2,08 \cdot 10^{-2}$.

Con respecto al consorcio, en el día 0 se pudo observar que inicia con un valor de $0,140 \pm 0,01$. Su fase exponencial se observa desde el día 4 con una densidad óptica de $0,124 \pm 0,005$ hasta el día 8 en donde muestra su valor más alto de $0,245 \pm 0,005$. Posteriormente se nota una disminución de la curva, terminando el monitoreo en el día 12 con un valor de $0,235 \pm 0,01$.

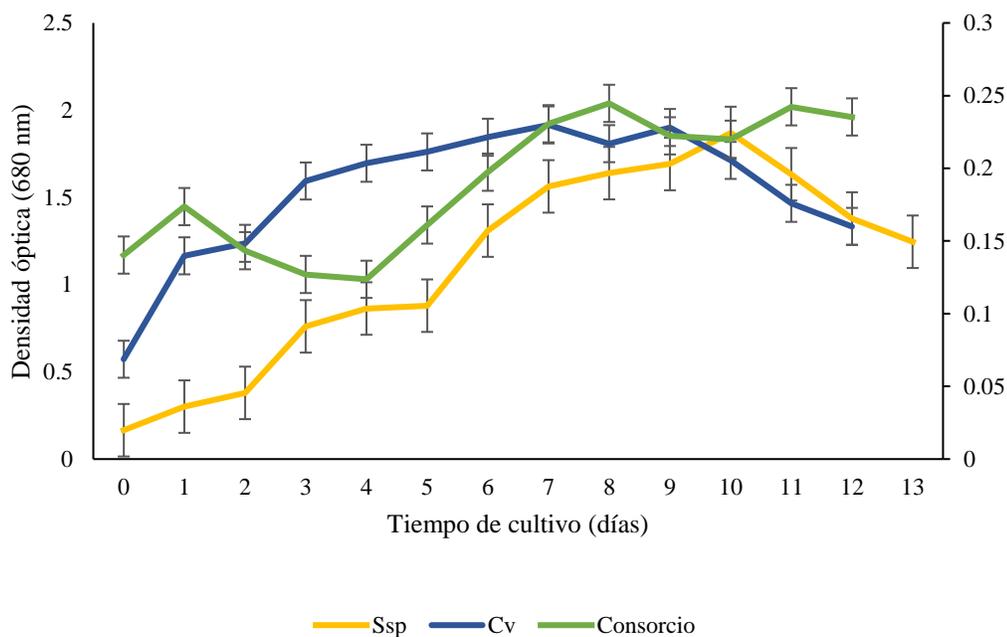


Figura 7. Curvas de densidad óptica de *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus* sp. (Ssp) y su consorcio a una longitud de onda de 680 cultivadas en agua residual de acuícola por 13 y 12 días. En el eje Y izquierdo se muestra la escala para las especies puras y el eje Y derecho para el consorcio. Los valores finales son el resultado del promedio de sus triplicados con su desviación estándar.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

3.2.2. Conteo celular

Se graficaron las curvas de crecimiento celular con los valores obtenidos del conteo celular de las especies *Scenedesmus* sp. (Flor et al, 2023), *Chlorella vulgaris*, (Vega, et al, 2022) y su consorcio cultivadas en agua residual acuícola como se muestra en la figura 8. Con respecto a *C. vulgaris* se observa una fase de adaptación entre el día 0 al día 4 con una concentración celular que va de $1,34 \cdot 10^6 \pm 3,31 \cdot 10^4$ hasta $1,85 \cdot 10^6 \pm 7,73 \cdot 10^4$ cel/mL, la fase exponencial se observa del día 4 al 7 incrementando su concentración hasta $3,13 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^5$ cel/mL y la fase de muerte celular se identificó del día 10 al 12 disminuyendo la concentración celular hasta $3,19 \cdot 10^6 \pm 1,77 \cdot 10^5$ cel/mL.

En la curva de *Scenedesmus* sp. se observa que el cultivo inicia una concentración de $2,32 \cdot 10^4 \pm 3,2 \cdot 10^3$ cel/mL. A partir del día 4 se aprecia una fase exponencial hasta el día 12 donde presentó la mayor concentración con un valor de $2,30 \cdot 10^6 \pm 1,44 \cdot 10^3$ cel/mL y en el día 13 comienza el periodo de muerte celular.

Por otro lado, se observó que le consorcio inicia con un valor de $6,05 \cdot 10^3 \pm 13,8$ cel/mL, presenta una fase de adaptación ascendente, aunque empieza la fase exponencial desde el día 3 hasta el día 11, llegando a su pico más alto con un valor de $4,45 \cdot 10^4 \pm 4,43$ cel/mL, después los valores de conteo celular disminuyen lo que se considera como la fase de muerte celular.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

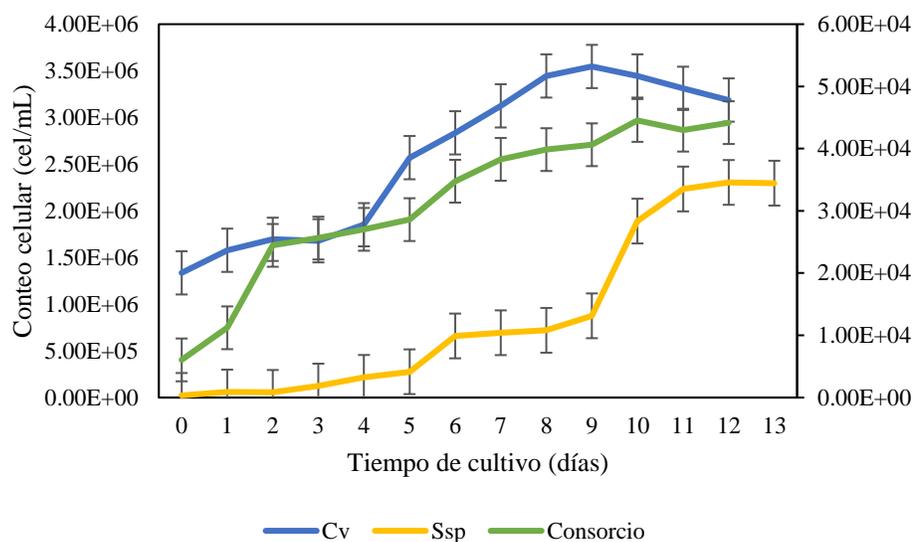


Figura 8. Concentración celular (cel/mL) vs. el tiempo de cultivo (días) de *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus* sp. (Ssp) y su consorcio cultivadas en agua residual de acuícola por 13 y 12 días. En el eje Y izquierdo se muestra la escala para las especies puras y en el eje Y derecho para el consorcio. Los valores finales son el resultado del promedio de sus triplicados con su desviación estándar.

3.2.3. Peso seco

Con referencia al peso seco del consorcio observado en la Figura 9, se puede notar que la curva muestra una diferencia de valores; en el día cero empieza con 0,0339 g/L, del día 0 al día 1 se observa un comportamiento de decrecimiento. A partir del día 1 la microalga crece de forma exponencial hasta el día 4, llegando a una concentración de 0,0299 g/L. Luego de este periodo, empieza a verse afectada su crecimiento y en los días 5 hasta 12 los valores disminuyen terminando con una concentración de 0,0051 g/L.

En la curva de *Chlorella vulgaris* (Vega et al, 2022) se puede observar una fase estacionaria hasta el día 6, a partir de ese día inicia la fase exponencial hasta el día 10 donde se

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

puede observar el pico más alto y en el día 11 y 12 se encuentra en la fase de lisis.

En la curva de *Scenedesmus* sp. (Flor et al, 2023), se aprecia un comportamiento estacionario hasta el día 6, a partir de ese día empieza una leve fase exponencial que continúa hasta el día 13.

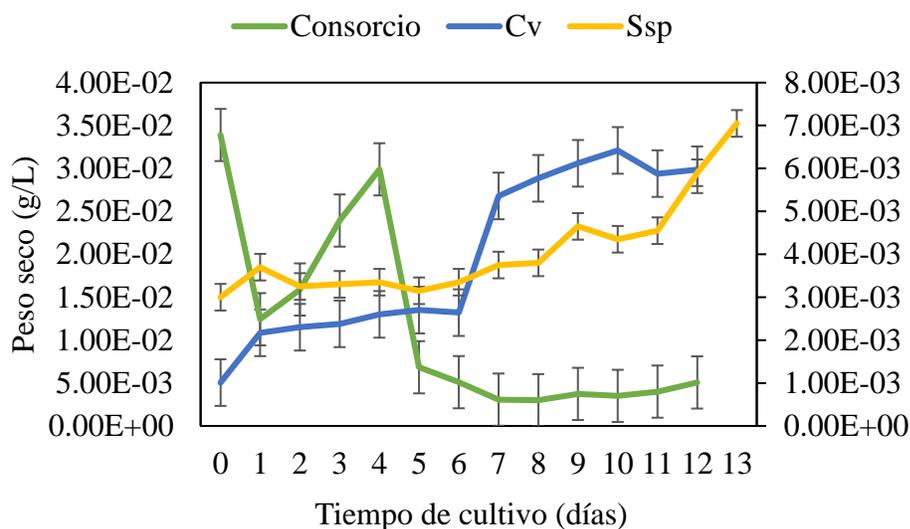


Figura 9. Peso seco de las especies *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus* sp. (Ssp) y su consorcio en agua de acuícola. En el eje x se muestra el tiempo de cultivo y en el eje de las Y se encuentra el peso seco en g/L . El lado Y izquierdo corresponde a la escala de las especies puras, mientras que En el eje Y derecha se presenta la escala del consorcio.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

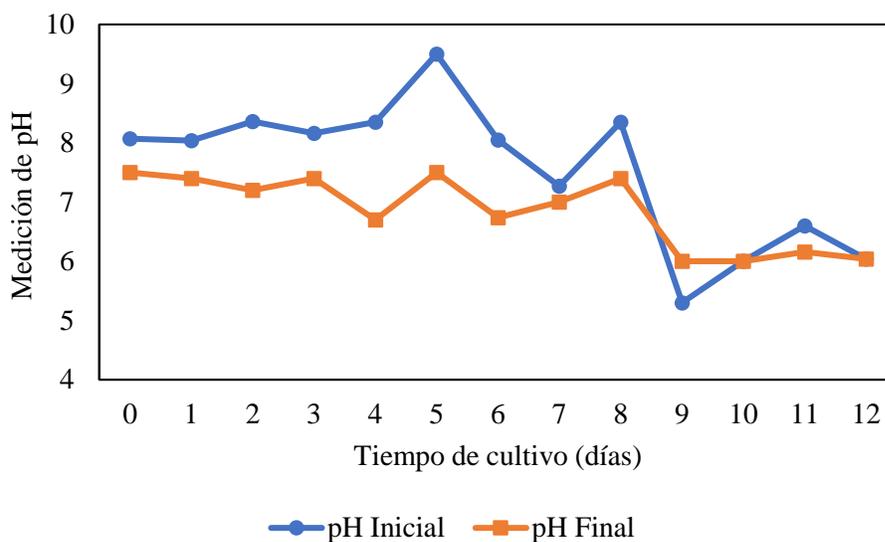


Figura 10. Control de pH en los 12 días de cultivo de consorcio. El pH inicial se refiere al valor antes del control y el pH final indica el valor arrojado después de aplicar las sustancias de control.

Durante los 12 días que duró el cultivo se realizó la medición y control pH, siendo el valor inicial de 8,07 por lo que se utilizó HCl (1M) y NaOH (1M) para estabilizarlo a un rango entre 6.5 y 7.5 como se muestra en la figura 10. Se puede notar que día tras día el pH tiende a subir por lo que el mayor número de veces se tuvo que bajar el pH con HCl, utilizando NaOH una sola vez en el día 9 que presentó un valor muy bajo de 5,3.

Tabla 2. Biomasa total y productividad de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y su consorcio cultivadas en agua residual acuícola.

Parámetro	Consorcio	<i>C. vulgaris</i>	<i>Scenedesmus</i> sp.
Biomasa total			
(g/L)	0,216	0,47	0,497
Productividad			
volumétrica (g/L d)	0,018	0,039	0,038

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Parámetro	<i>Consortio</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>Scenedesmus</i> sp.
Productividad			
específica (d⁻¹)	0,083	0,083	0,077
Tasa de crecimiento			
específica (μ)	0,079	0,103	0,296
Tiempo de duplicación			
	8,78	6,7	2,344

En la tabla 2 se muestra la biomasa total, productividad volumétrica, productividad específica, tasa de crecimiento específica y tiempo de duplicación de las especies *Chlorella vulgaris* (Vega et al., 2022), *Scenedesmus* sp. (Flor et al., 2023) y su consorcio obtenidas de agua residual acuícola como medio de cultivo. Se puede notar que en todos estos parámetros los valores del consorcio son menores a los valores del cultivo independiente de las especies. Aunque se puede recalcar que la productividad específica del cultivo en consorcio y *C. vulgaris* son iguales.

3.3. Análisis de parámetros fisicoquímicos y remoción de nutrientes

Los análisis realizados de la concentración de nitrógeno total (NT), fósforo total (PT) y carbono orgánico total (COT), en un período de cultivo de 12 para el consorcio y *C. vulgaris* (Vega et al., 2022) y 13 días para *Scenedesmus* sp. (Flor et al., 2023) se puede observar en la figura 11. En la sección A se observa que con la especie *Chlorella vulgaris* se aprecia una remoción considerable desde el día 1 hasta llegar a un 96,5% de remoción en el día 12, terminando con una concentración final de nitrógeno total de 11.47 ± 0.70 mg/L N. Respecto a *Scenedesmus* sp. empieza con una concentración inicial de 168 ± 1.41 mg/L N, y termina con un

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

valor de 4 ± 4.24 mg/L N, obteniendo un porcentaje de remoción total del 97,62% y, finalmente para el consorcio se puede observar una remoción considerable desde el día 1 con una concentración inicial de $12,67 \pm 1,1$ mg/L N, y una concentración final de $4 \pm$ mg/L de N, logrando un porcentaje total de remoción del 68,4%, siendo el que menos remoción presentó en comparación con las especies cultivadas individualmente.

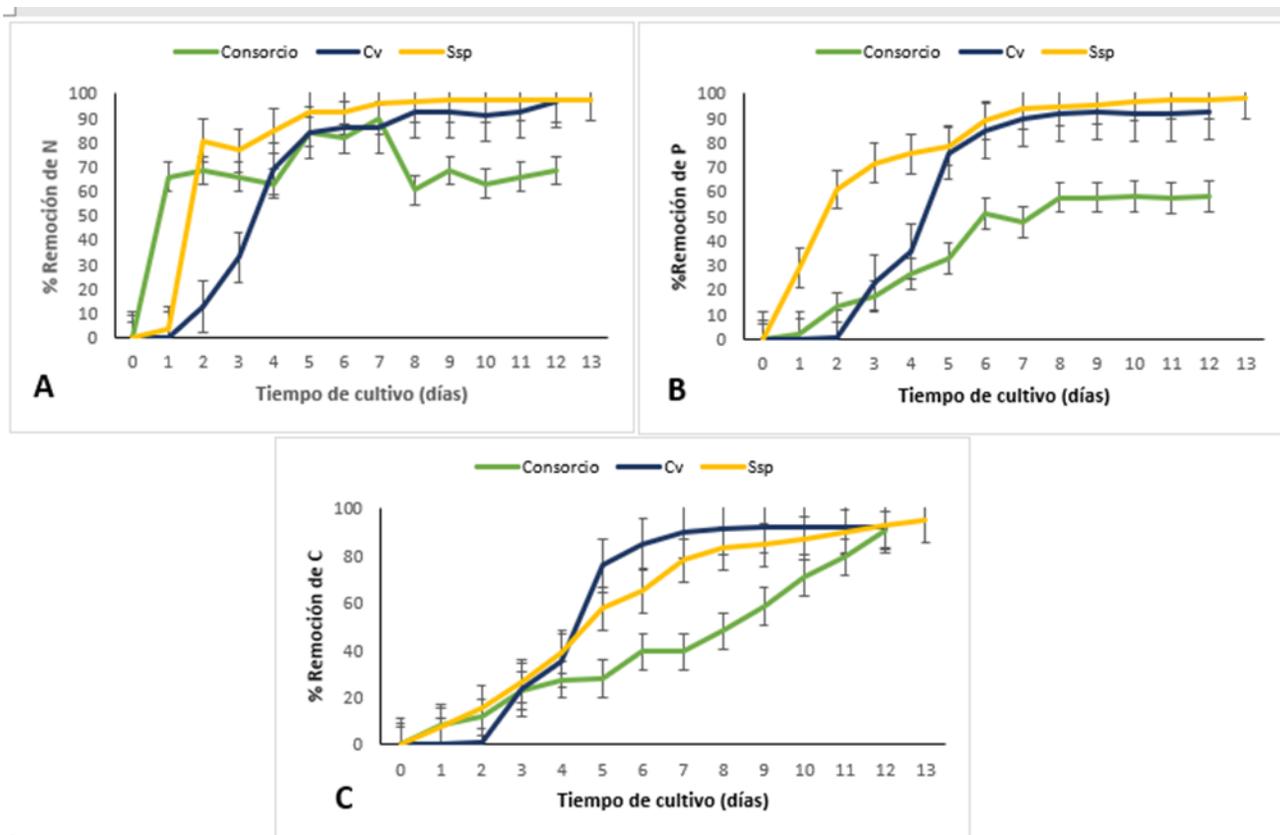


Figura 11. Porcentaje de remoción de macronutrientes en el cultivo de *Chlorella vulgaris* (Cv),

Scenedesmus sp. (Ssp) y su consorcio cultivado en agua residual de origen acuícola. En el eje X se presenta el tiempo de cultivo en días y en el eje Y se coloca el porcentaje de remoción de nutrientes; sección A: % de remoción de nitrógeno total, B: % de remoción de fósforo total y C: % de remoción de carbono total. Los valores finales son el resultado del promedio de sus triplicados con su desviación estándar.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

En la sección B se representa el porcentaje de remoción del fósforo total (PT). Con respecto a la especie *Chlorella vulgaris*, inicialmente tuvo una concentración de 35.85 ± 0.35 mg/L PO_4^{-3} y su remoción empezó exponencialmente desde el día 2 hasta llegar a un porcentaje de 92.19% en el día final. En el caso del cultivo de *Scenedesmus* sp. se puede observar que la remoción empieza desde el primer día, llega a la fase estacionaria en el día 8 con una concentración de 7.45 ± 0.21 mg/L hasta el día 13 con una concentración igual a 1.6 ± 0.42 mg/L y un porcentaje de remoción de 97.88%. Por otro lado, en el consorcio se puede observar que desde el primer día ya se ve una remoción exponencial hasta el día 14 en donde se mantiene de forma estacionaria hasta terminar el día 12 con una remoción del 58.2% de remoción, con una concentración de 23.27 ± 0.1 mg/L. Se puede notar que al igual que el macronutriente anterior, en el consorcio se ve menor cantidad de remoción de P.

Con respecto al porcentaje de remoción de carbono orgánico total (COT) se puede apreciar que, al igual que los anteriores nutrientes, el mejor removedor fue el cultivo de *Scenedesmus* sp. Este cultivo inicia con una concentración de 726.5 ± 12.02 mg/L, llega a una concentración de 158.5 ± 24.75 mg/L en el día 7 con un porcentaje de remoción de 78.18% y finaliza en el día 13 con concentración de 37 mg/L con un porcentaje final de 94.91%. Con respecto al cultivo de *C. vulgaris*, se puede observar que en el día 2 empieza removiendo el 1.89%, a partir del día 6 al 12 presentó una remoción final del 93.43%. Y finalmente, en el consorcio la remoción empieza con un porcentaje de 7.8% con una concentración de 827.67 ± 52.79 mg/L C, la remoción permanece constante hasta el día donde termina con una concentración de 75.5 ± 0.7 con un porcentaje total de remoción del 90.88%.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Tabla 3. Porcentaje de remoción de Nitrógeno, Fósforo y Carbono total por el consorcio cultivadas en agua residual de origen acuícola

Parámetros	Concentración	Concentración	Remoción
Fisicoquímicos	inicial	final	Total (%)
<hr/>			
Nitrógeno			
Total (mg/L N)	$12,67 \pm 1,5$	4 ± 0	68,42
<hr/>			
Fósforo Total			
(mg/L PO_4^{-3})	$55,67 \pm 6,9$	$23,27 \pm 0,15$	58,2
<hr/>			
Carbono			
orgánico Total (mg/L			
C)	$827,67 \pm 52,79$	$75,5 \pm 0,71$	90,8
<hr/>			

El porcentaje de remoción de nitrógeno total (NT), fósforo total (PT) y carbono orgánico total (COT) del consorcio cultivado en agua residual de origen acuícola se observa en la tabla 3. Se puede observar que el consorcio tuvo mayor afinidad de remoción del COT, seguido por la remoción de N con un 68,42% y con respecto al fósforo se puede apreciar que se removió casi la mitad de la concentración inicial. Así mismo, se puede notar que en los micronutrientes y metales pesados también hubo remoción (tabla 4); se observa que existe una remoción considerable en cobre, hierro y nitrógeno amoniacal con un porcentaje del 81,43%, 90,06% y 80,06% en peso, respectivamente; además de una remoción del 32,32% en sodio. Cabe recalcar que la turbidez ha disminuido totalmente, aunque su valor inicial solo era del 0.1 NTU.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Tabla 4. Porcentaje de remoción de nutrientes en agua residual de acuícola por las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio.

Parámetros fisicoquímicos	Concentración inicial	Concentración final	Remoción Total (%)
Calcio (mg/L)	31,44 ± 1,89	32,49 ± 1,95	-
Cobre (mg/L)	0,28 ± 0,1	0,052 ± 0,003	81,43
Cromo (mg/L)	<0,02 LD	< 0,05 LC	*
Hierro (mg/L)	1,61 ± 0,10	0,16 ± 0,01	90,06
Molibdeno (mg/L)	0,02 ± 0,001	0,030 ± 0,002	-
Nitrógeno Amoniacal			
(mg/L)	6,17	1,23	80,06
Níquel (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05 LC	*
Plomo (mg/L)	< 0,004 LD	< 0,05 LC	*
Potasio (mg/L)	11,76 ± 0,81	92,85 ± 6,77	-
Sodio (mg/L)	196 ± 14,29	132,65 ± 9,67	32,32
Turbidez (NTU)	0,1	0	100
Demanda Química de			
Oxígeno DQO (mg/L)	341,72 ± 12,78	160,9 ± 6,02	52,91

Nota.- LD: Limite de Detección, LC: Límite de cuantificación * Valores fuera de rango. - Sin remoción

La Demanda Química de Oxígeno ha disminuido un poco más de la mitad (52,91%) del valor inicial.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

También se puede denotar que en el caso de calcio, molibdeno y potasio no se ha removido, sino que aumentó en la concentración debido a que estos compuestos se encuentran en las microalgas por bioabsorción en la superficie celular y acumulación intracelular siendo expulsados como residuo de los procesos metabólicos de las microalgas.

Y, con respecto al cromo, níquel y plomo no fue posible obtener un porcentaje de remoción debido que las concentraciones estuvieron fuera de rango de medición.

3.4. Extracción de lípidos totales

En la figura 12 se puede observar los porcentajes de lípidos extraídos a partir de biomasa seca de *C. vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y su consorcio expuestos a cinco solventes extractores de carácter orgánico. Se puede observar que, de manera individual, la especie *Scenedesmus* sp. Es en la que mayor porcentaje de lípidos se obtiene con todos los solventes, aunque presenta una mayor extracción con cloroformo-metanol (1:2) con un porcentaje de 32,16% y metanol con 30,26%. Con respecto a la especie *C. vulgaris*, también se aprecia que el solvente con el que se extrae la mayor cantidad de lípidos es con cloroformo-metanol 1:2 (23,01%), seguido por acetato de etilo y metilciclohexano con los cuales se extrajeron el 11,85% y 10,67% de los lípidos totales de esta especie respectivamente. Finalmente, es notorio que el cloroformo-metanol (1:2) también es el mejor solvente para el consorcio obteniendo un porcentaje (23,80%) parecido al de *Chlorella vulgaris*, le sigue metanol con una extracción del 18,37% y metilciclohexano con 15,22%.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

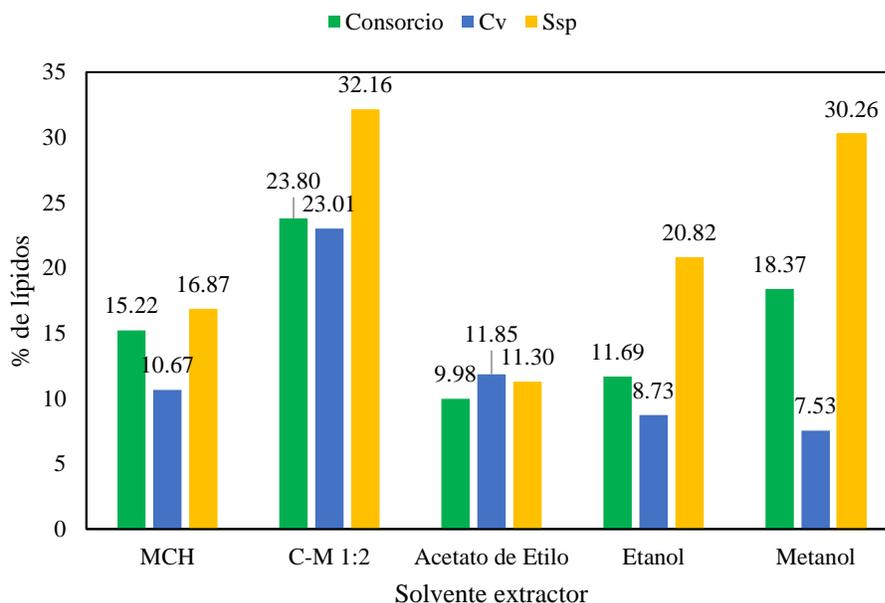


Figura 12. Porcentaje de lípidos extraído de las especies *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y el consorcio cultivadas en agua residual de origen acuícola con cinco solventes extractores: Metilciclohexano (MCH), acetato de etilo, cloroformo-metanol (1:2) (C-M), etanol y metanol. Los valores finales son el resultado del promedio de sus triplicados con su desviación estándar.

3.5. Extracción de ácidos grasos libres

Con respecto a la extracción de ácidos grasos libres (AGL), se puede apreciar en la figura 13 que las mejores extracciones de lípidos se presentan con la especie *Chlorella vulgaris* con los solventes: acetato de etilo con un porcentaje de 46,41%, seguido con cloroformo:metanol (1:2) con 43,34% de AGL y finalmente con metilciclohexano (29,83%). Con el cultivo de *Scenedesmus* sp, se puede notar que la extracción de AGL es considerable con todos los solventes, aunque el porcentaje es menor el de *C. vulgaris*, en este caso el mejor solvente se presenta con metanol (40,18%), seguido por acetato de etilo (38,63%), etanol (35,71%), cloroformo:metanol (1:2) (35,67%) y metilciclohexano con un porcentaje de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

28,06% de AGL. En el consorcio, los porcentajes son menores a las anteriores; sin embargo, se puede notar que las mayores extracciones se pueden ver con cloroformo:metanol (1:2) con un porcentaje de 36,56% y etanol con 20,15%.

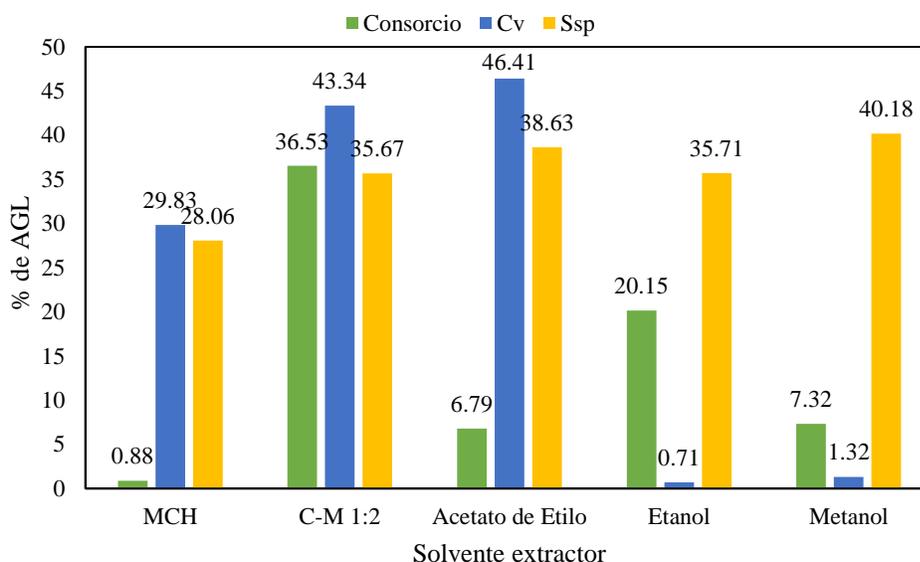


Figura 13. Porcentaje de extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL) de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y su consorcio cultivadas en agua residual acuícola con cinco solventes: Metilciclohexano (MCH), acetato de etilo (AE), cloroformo-metanol (1:2) (CM), etanol y metanol. Los valores finales son el resultado del promedio de sus triplicados.

3.6. Extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos

Para la extracción de FAME directo con biomasa seca se obtuvo un $62,38 \pm 3,08$ % con el uso del catalizador ácido mientras que con el catalizador con resina se obtuvo un $3,21 \pm 1,75$ %. Para la extracción de FAME indirecto se observó que el ácido sulfúrico obtuvo mayor cantidad de porcentaje con todos los solventes a comparación de la resina comercial (Figura 14). En general, la mezcla cloroformo: metanol (1:2) fue el mejor solvente tanto en el

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

proceso de FAMES indirecto como en los FAMES de AGL, aunque se puede notar que en el primer proceso se encuentra a la par con Acetato de Etilo y cloroformo metanol (1:2) que extrajeron un $70,95 \pm 3,32\%$ y $70,3 \pm 8,5\%$ respectivamente, seguido de etanol con $48 \pm 2,55\%$ y como tercer mejor solvente el metanol con $36,1 \pm 5,7\%$. En cambio, en los FAMES de AGL, el mejor solvente se mantiene el cloroformo metanol (1:2) ($75 \pm 4,24\%$), seguido de metanol ($48,95 \pm 9,04\%$) y acetato de etilo ($37,35 \pm 7,14\%$). Referente a la resina como catalizador, el cloroformo: metanol (1:2) fue el solvente con mayor porcentaje de extracción llegando hasta $47,35 \pm 2,3\%$. Cabe recalcar que no se consideró para la extracción de FAMES solvente metilciclohexano porque no hubo suficiente muestra de lípidos para analizar.

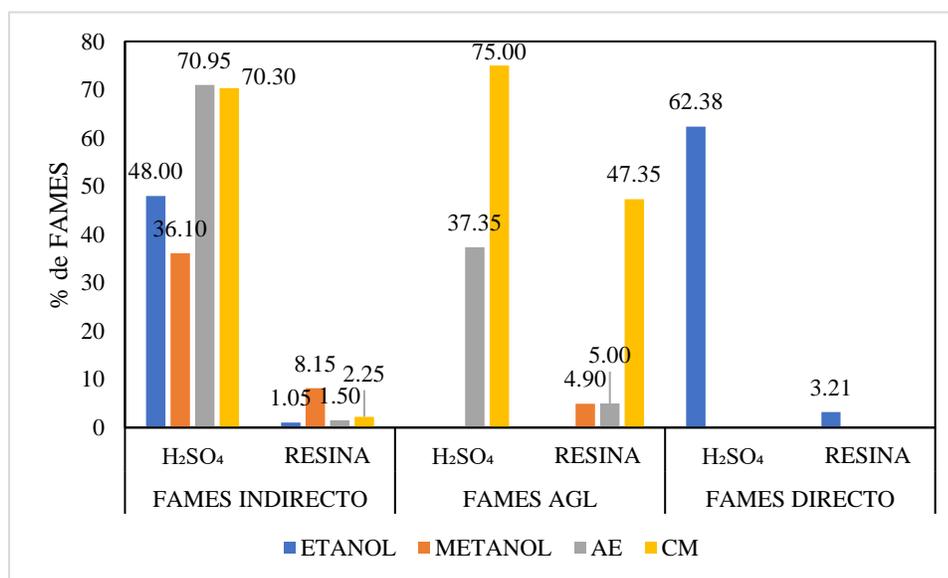


Figura 14. Porcentaje de extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio en agua residual acuícola. Los valores finales son el resultado del promedio de sus triplicados con su desviación estándar.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

3.7. Cromatografía de capa fina (Thin layer chromatography-TLC)

En la placa de gel de sílice con cloroformo puro como fase móvil (Figura 15) se observó que, de las muestras colocadas recorrieron diferentes distancias en la línea del estándar y AGL. En la línea de los FAMEs no se reportaron ninguna huella. Todos los valores que se obtuvieron se especifican en la Tabla 5 y para su identificación se realizó una comparación a través de bibliografía con el factor de retención (R_F) de cada muestra.

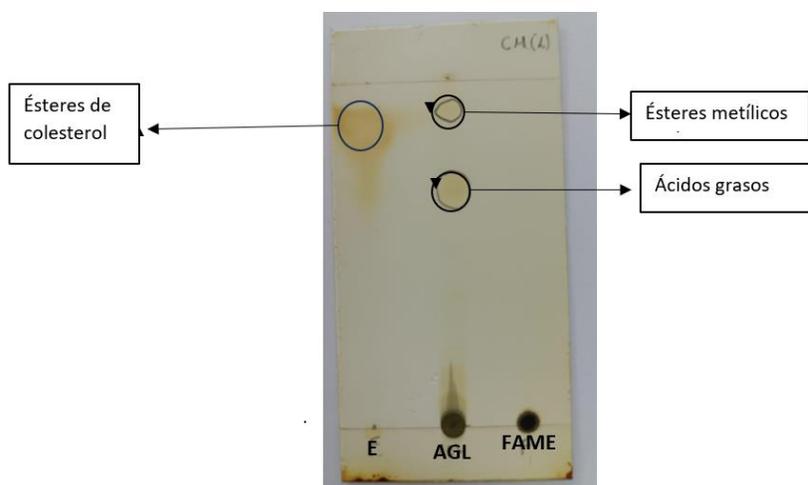


Figura 15. Cromatografía de capa fina de AGL y FAME obtenidos a partir del consorcio entre *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual acuícola. E: Estándar (Oleato de colesterol), AGL: Ácidos Grasos Libres, FAME: Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos.

Muestra	Y (cm)	X (cm)	R_F
Estándar	4,8	6	0,8
AGL (A)	5,1	6	0,85

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

AGL (B)	4	6	0,67
FAME	ND	ND	ND

Tabla 5. Factor de Retención de AGL y FAME obtenido con *C. vulgaris* en agua residual acuícola

Nota. Rf: Factor de retención. Y: distancia total. X: distancia recorrida por la muestra, ND: No definido

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para un crecimiento óptimo de las microalgas se necesitan, en general, luz, CO₂, nutrientes y agua. En cuanto a los nutrientes, en la tabla 1 se pueden observar los valores de macronutrientes del agua residual acuícola utilizada para el crecimiento del consorcio obtenido a partir de análisis fisicoquímicos y los valores del BBM, el cual presenta las condiciones de nutrientes óptimos para el crecimiento de microalgas. Se puede notar que el valor de Carbono Orgánico Total es considerablemente mayor en la muestra de agua que en el medio BBM, aunque los valores de Nitrógeno y Fósforo son menores, según Sharma (2018) se podría considerar como un medio donde el consorcio pueda crecer óptimamente.

Crecimiento celular

Entre las pruebas realizadas para la determinación del crecimiento celular, tanto por densidad óptica (figura 7) como por conteo (figura 8), se observó que la concentración microalgal del consorcio entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en el agua residual acuícola fue menor que la concentración de las especies cultivadas individualmente. Esto se explica en la tabla 2 donde se comparan algunos parámetros de crecimiento celular. Se puede notar que la biomasa total, la productividad volumétrica y la tasa de crecimiento específica obtenida en los cultivos de *Chlorella*

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

vulgaris y *Scenedesmus* sp. es el doble en comparación con el cultivo del consorcio. Por lo tanto, es lógico que el tiempo de duplicación sea mayor en el consorcio, llegando a duplicarse en el día 8, en comparación de las especies cultivadas individualmente que solo se tardan entre 2 y 6 días.

Uno de los factores para esto puede deberse al comportamiento competitivo de *C. vulgaris* por los nutrientes presentes en el agua (Camargo A, 2023). Además, considerando que el fósforo se encuentra en una concentración mucho menor al del medio BBM, podría estar afectando al crecimiento del consorcio, ya que Hernández (2022) menciona que el fósforo juega un papel importante en la mayoría de procesos celulares, su deficiencia produce una limitación de la síntesis de ácidos nucleicos, la cual puede darse a nivel de la replicación del genoma o al nivel de la síntesis de RNA, además puede afectar la conversión de energía fotosintética reduciendo la tasa de síntesis de proteínas en el aparato fotosintético, resultando en un efecto negativo en el proceso de fotosíntesis; es decir, que este nutriente está implicado en la generación y transformación de energía metabólica, por lo que es indispensable para el crecimiento y reproducción de las microalgas.

En la parte de peso seco (figura 9), se puede notar que la curva del consorcio cambia totalmente los valores por lo que su forma y tendencia también cambia. Se puede decir que los valores obtenidos por este método no son confiables, ya que según Rajendran S., (2013) esta metodología presenta mucho error de medición, además se debe considerar que la cantidad de biomasa del consorcio fue mínima, por lo que, es complicado pesar con precisión menos de 1 mg en una balanza de laboratorio estándar.

Como se había mencionado anteriormente, uno de los factores de crecimiento es el pH. En el caso del consorcio, se debe considerar que el medio acuícola que se utilizó se encontraba con

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

un pH muy alcalino. En esta investigación se realizaron varias siembras; ya que, en la primera y segunda siembra, se observó una disminución del color verde característico de las microalgas y su cambio de tonalidad amarillenta, así también en la concentración celular; en estas primeras siembras no se controló el pH para seguir la misma metodología de las especies individuales. Fue en la tercera siembra que se comenzó a controlar el pH manteniendo su valor entre 6,5 y 7,5, como se muestra en la figura 9. Se puede notar que el pH tendía a aumentar considerablemente día tras día. Este comportamiento es normal ya que, Según (Beltrán-Rocha et al., 2017), una característica relevante durante la captación de nutrientes y fijación fotosintética de CO_2 en el cultivo de microalgas, es que el proceso tiende a inducir un aumento en el pH del medio debido al consumo de iones HCO_3^- , cuya disociación a CO_2 proporcionan el carbono necesario para el crecimiento de las microalgas, a la par de propicia la acumulación de OH^- .

Remoción de nutrientes

En la figura 11 A y B se presentan los porcentajes de remoción de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT) a lo largo del periodo de cultivo, teniendo que *Chlorella vulgaris* (reportado por Vega et al, 2022) y *Scenedesmus* sp. (reportado por Flor et al, 2023) tienen un porcentaje de remoción más alto en los primeros días llegando a un total de remoción de 97,61% para N y 97,8% para P con *Scenedesmus* sp., y 97,14 % para N y 92,2 % para p con *C. vulgaris*. En comparación con el consorcio que obtuvo una remoción más alta de 89,7% de N y 58,2% de P. En primera instancia, estos porcentajes de remoción son lógicos ya que la concentración celular de microalgas cultivadas por separado es mayor que el consorcio, es decir que el avance de los cultivos estuvo acompañado de la disminución del contenido de nitrógeno en el medio de cultivo. Se entiende que *Scenedesmus* sp. (reportado por Flor et al, 2023) es el mejor removedor de Nitrógeno, ya que en

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

estudios donde se evaluaron la capacidad de remoción de algunos nutrientes, esta especie llegó a remover el 94,44% del nitrógeno presente en el cultivo y hasta el 100% de P (Díaz et al., 2022).

Con respecto a la eliminación de COT, se puede observar en la figura 10C que tanto en el caso del cultivo independiente de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. como el consorcio llegan a un punto de remoción de alrededor del 90% al 94%. Esto es normal, debido a que, considerando que el cultivo fue de clase fotoautótrofo, el C es el principal nutriente utilizado por microalgas ya que usan la luz como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono para obtener energía química a través de la fotosíntesis, además de su replicación. (Arias, et al, 2013).

Cabe recalcar que también se hizo un análisis físico químico del agua de origen acuícola para determinar la remoción de metales pesados como se puede apreciar en la tabla 4. Se puede ver que hubo una remoción considerable de un 81,43% de cobre (Cu), en estudios como el de Ajayan et al., (2015) también se reportó un porcentaje de remoción de este elemento de 73,2-98% con *Scenedesmus* sp y 98,61-99,9 % con *C. vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*. (Yousefi, et al, 2023). Esto debido a la capacidad de bioacumulación de las células vivas y biosorción de las células muertas o productos de la biomasa (Vela-García et al., 2019).

Otro elemento que disminuyó su concentración fue el hierro (Fe) con una remoción del 90,06% parecido al reporte de 93,42% con *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Ankistrodesmus* sp. el cual analiza que se puede atribuir a la afinidad de las algas con el metal combinado a la precipitación del hierro insoluble. Otro nutriente que disminuyó fue el nitrógeno amoniacal, el cual tuvo una remoción del 80,06%. Se puede comparar los resultados obtenidos por García, et al (2023), en el que se disminuye del 80 al 100% del nitrógeno amoniacal del agua de cultivo con

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Scenedesmus sp. El sodio (Na) también mostró un porcentaje de remoción, aunque en comparación a los otros elementos, fue mínima (32,32%) considerando que la concentración fue muy alta (196 mg/L). Este elemento actúa como un activador de enzimas (Calle, 2023).

La turbidez se eliminó en un 100%, aunque no es muy relevante porque el valor inicial fue de 0,1 NTU.

En la Demanda Química de Oxígeno se puede apreciar que disminuyó más de la mitad del valor inicial, esto nos explica que las microalgas del consorcio utilizaban diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono, además del CO₂ (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

Se comparó todos valores finales de remoción del agua residual acuícola y el consorcio con los valores de los Límites de Descarga a un Cuerpo de Agua Dulce (Anexo 1) de La Norma de Calidad Ambiental Y De Descarga De Efluentes: Recurso Agua. Se observó que el DQO superaba con una concentración de 60 mg/L al valor límite permisible de la normativa (100 mg/L). Así también, se observó que el valor límite permisible del fósforo total es de 10 mg/L, pero la concentración final del cultivo de consorcio muestra un valor de 23,27 mg/L.

Con respecto a los metales pesados, se puede observar que los valores después de la remoción son mucho menores a los valores de la normativa.

Extracción de lípidos

Según Días y Gamica (2023), para que una biomasa de microalgas sea atractiva para la producción de biocombustibles debe tener altas productividades de lípidos y tener porcentajes mayores al 30% debido a los costosos procesos de extracción. En la figura 12 se puede observar el porcentaje de lípidos totales extraídos con el uso de cinco solventes (Metilciclohexano (MCH),

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

acetato de etilo, cloroformo-metanol (1:2), etanol y metanol.). Se puede ver que el mejor extractor, tanto para el cultivo en consorcio como para los cultivos individuales, fue el cloroformo:metanol (1:2) (o método de Bligh & Dyer). Este método ha obtenido muy buenos resultados en la extracción de aceite de microalgas y se utiliza con frecuencia como complemento de métodos de destrucción mecánica o de autoclavado, aunque posee la desventaja de ser poco amigable con el ambiente debido a la toxicidad de los solventes utilizados (Pérez, 2014).

Mediante este método se obtuvo 23,8% de lípidos totales del consorcio, el cual se encuentra dentro del rango en los valores reportados por estudios de Subía y Rubio (2018) donde realizaron la extracción con el solvente mencionado se extrajo los siguientes porcentajes con diferentes consorcios: *Vischeria/Scenedesmus sp* de 16% y *Chlorella/ Monoraphidium Contortum sp* de 42%.

Con respecto a la extracción de ácidos grasos libres (AGL), aunque para las especies cultivadas individualmente el mejor extractor fue el acetato de etilo, para el consorcio se presentó un mejor porcentaje de extracción con el solvente cloroformo-metanol (1:2) con 36,53%, aunque en la investigación de Arroyo (2023) donde se cultivó el mismo consorcio, pero en agua residual de cerveza reportó que los mejores solventes de AGL fueron etanol, seguido del metilciclohexano.

Extracción de esteres metílicos

En los resultados obtenidos acerca de la extracción de los ésteres metílicos producidos por el consorcio se determinó que presentaron una mejor extracción con H_2SO_4 a comparación de la resina CT-269DR. Según Vega et al (2022) menciona que “el ácido no se ve afectado negativamente por la presencia de ácidos grasos libres, a comparación de los catalizadores

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

heterogéneos”. En efecto, con el ácido sulfúrico se puede catalizar la reacción de esterificación y transesterificación simultáneamente en el proceso en el cual se obtiene el biodiesel.

En esta investigación se determinó que el mejor solvente para obtener un buen porcentaje de producción de FAME fue el cloroformo:metanol (1:2) con un valor máximo de 75%, asimismo en las investigaciones de Vega et al (2022) con *Chlorella vulgaris* y Flor et al (2023) con *Scenedesmus* sp. muestran que su mejor rendimiento en FAMES (88,9 y 79,9 % respectivamente) fueron con este solvente. Incluso podemos ver que el porcentaje entre estos tres casos con considerables y se mantienen en el mismo rango.

Con respecto a los resultados obtenidos después del proceso de Cromatografía de Capa Fina (Thin Layer Chromatography o TLC por sus siglas en inglés), se aprecia que en la línea de FAMES, no se presentó ninguna señal. Sin embargo, esto no quiere decir que realmente no hay presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos. Algunos factores de la metodología usada en el proceso de TLC puede estar afectando a una buena lectura de los componentes presentes en las muestras lipídicas; por ejemplo, en el presente trabajo se utilizó una cámara con el medio de corrido de cloroformo puro; sin embargo, en un estudio realizado por Thangam et al.,(2021) se reportó que como fase móvil se utilizó n-hexano: éter dietílico: ácido acético (70:30:1) para determinar el perfil de ácidos grasos de los lípidos transesterificados de *Scenedesmus* sp. mediante la técnica de TLC.

Por otro lado, al medir los espacios recorridos por la línea de AGL, se obtuvo un valor de factor de retención de 0,85 y 0,67. Con los valores de Rf obtenidos, se puede concluir que hubo la formación de ésteres metílicos de ácidos grasos porque los valores experimentales son similares

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

a los de Flor et al (2023) y Arroyo (2023), que encontraron valores de Rf para el ácido graso y FAMES de 0,53 y 0,63 y 0,47 y 0,58, respectivamente.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

5. CONCLUSIONES

En este estudio se logró comprobar que el consorcio de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. pueden adaptarse y crecer en agua residual de origen acuícola controlando el pH.

El consorcio presentó un porcentaje de remoción de nutrientes alto durante los 12 días cultivo respecto de las especies cultivadas individualmente, por lo que se ha demostrado que el consorcio tiene un buen potencial para el tratamiento de aguas residuales.

Se identificó que, tanto por los resultados obtenidos como por bibliografía, el solvente con mejores resultados fue el cloroformo:metanol (1:2) para la extracción de lípidos de microalgas.

Aunque no se cumplió con la obtención de más de 80% de AGL, no se descarta que los lípidos de las especies en consorcio cultivadas en el agua residual acuícola tengan potencial para la obtención de biocombustibles.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

6. RECOMENDACIONES

Es recomendable experimentar nuevas fuentes de aguas residuales que contengan los nutrientes y condiciones ideales para el buen crecimiento de las algas y además crear nuevas propuestas de biorremediación de aguas residuales.

Se recomienda realizar diferentes tratamientos en el cultivo, como disponer de periodos con luz y sin luz, pero manteniendo una fuente de aireación constante y control de pH ya que esto contribuiría en la producción mayor de biomasa.

Con base en la bibliografía, se recomienda someter a condiciones de estrés al disminuir el contenido de N y aumentar Hierro en el medio para obtener un mejor rendimiento lipídico.

Es recomendable realizar estudios con solventes ecológicos para determinar el rendimiento de extracción de lípidos para disminuir la contaminación ambiental producida por los solventes utilizados en esta investigación.

Es recomendable realizar el perfil lipídico de los lípidos extraídos para corroborar cuantitativamente la conversión a ésteres metílicos de ácidos grasos y poder indicar si este consorcio tiene potencial para la producción de biocombustibles líquidos como el biodiesel.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

7. RECONOCIMIENTO

Para la realización de esta investigación la DII proyecto P101617_2.2 de la Universidad Internacional SEK, Ecuador financió los reactivos y materiales de trabajo y la Corporación para la Investigación Energética del Ecuador hizo la donación de otros materiales y equipos.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de los límites permisibles de descarga a un cuerpo de agua dulce

*REVISIÓN DEL ANEXO 1 DEL LIBRO VI DEL TEXTO UNIFICADO DE LEGISLACIÓN SECUNDARIA DEL MINISTERIO
DEL AMBIENTE: NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES AL RECURSO AGUA*

TABLA 10. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce			
Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aceites y Grasas.	Sust. solubles en hexano	mg/l	30,0
Alkil mercurio		mg/l	No detectable
Aluminio	Al	mg/l	5,0
Arsénico total	As	mg/l	0,1
Bario	Ba	mg/l	2,0
Boro Total	B	mg/l	2,0
Cadmio	Cd	mg/l	0,02
Cianuro total	CN ⁻	mg/l	0,1
Cinc	Zn	mg/l	5,0
Cloro Activo	Cl	mg/l	0,5
Cloroformo	Ext. carbón cloro formo ECC	mg/l	0,1
Cloruros	Cl ⁻	mg/l	1 000
Cobre	Cu	mg/l	1,0
Cobalto	Co	mg/l	0,5
Coliformes Fecales	NMP	NMP/100 ml	Remoción > al 99,9 %
Color real	Color real	unidades de color	* Inapreciable en dilución: 1/20
Compuestos fenólicos	Fenol	mg/l	0,2
Cromo hexavalente	Cr ⁺⁶	mg/l	0,5
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DBO ₅	mg/l	50,0
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/l	100,0
Estaño	Sn	mg/l	5,0
Fluoruros	F	mg/l	5,0
Fósforo Total	P	mg/l	10,0
Hierro total	Fe	mg/l	10,0
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg/l	20,0
Manganeso total	Mn	mg/l	2,0
Materia flotante	Visibles		Ausencia
Mercurio total	Hg	mg/l	0,005
Níquel	Ni	mg/l	2,0
Nitrógeno amoniacal	N	mg/l	30,0
Nitrógeno Total Kjeldahl	N	mg/l	50,0
Compuestos Organoclorados	Organoclorados totales	mg/l	0,05
Compuestos Organofosforados	Organofosforados totales	mg/l	0,1
Plata	Ag	mg/l	0,1
Plomo	Pb	mg/l	0,2
Potencial de hidrógeno	pH		5-9
Selenio	Se	mg/l	0,1
Sólidos Suspendidos Totales	SST	mg/l	80,0
Sólidos totales	ST	mg/l	1 600
Sulfatos	SO ₄ ⁻²	mg/l	1000
Sulfuros	S ⁻²	mg/l	0,5
Temperatura	°C		< 35
Tensoactivos	Activas al azul de metileno	mg/l	0,5
Tetracloruro de carbono	Tetracloruro de carbono	mg/l	1,0

* La apreciación del color se estima sobre 10 cm de muestra diluida

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

BIBLIOGRAFIA

Abdullah, B., Syed Muhammad, S. A. F. ad, Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N., & Aziz, M. M. A. (2019). Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107(February), 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.018>

Ajayan, K. V., Selvaraju, M., Unnikannan, P., & Sruthi, P. (2015). Phycoremediation of Tannery Wastewater Using Microalgae *Scenedesmus* Species. *International journal of phytoremediation*, 17(10), 907–916. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.989313>

Alalwan, H. A., Alminshid, A. H., & Aljaafari, H. A. S. (2019). Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus*, 28(00), 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.ref.2018.12.006>

Alcocer, D. A. Z. (2023). Energías Renovables en la Agroindustria Queretana como Factor de Competitividad.

ARIAS M., MARTÍNEZ A., & CAÑIZARES R. (2013). PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS: PARÁMETROS DEL CULTIVO QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 43-68. Retrieved July 23, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2013000100004&lng=en&tlng=es.

Arias, M., Martínez, A., & Cañizares, R. (2013). Biodiesel production from microalgae. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 43–68. <https://doi.org/10.1201/9781315152547-3>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Beltrán-Rocha, Julio C, Guajardo-Barbosa, Claudio, Barceló-Quintal, Icela D, & López-Chuken, Ulrico J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(3), 417-427. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>

Beltrán-Rocha, Julio C, Guajardo-Barbosa, Claudio, Barceló-Quintal, Icela D, & López-Chuken, Ulrico J. (2017). Biotreatment of secondary municipal effluents using microalgae: Effect of pH, nutrients (C, N and P) and CO₂ enrichment. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(3), 417-427. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>

Calle Vegas, C. M. (2023). Microalgas en el proceso de potabilización de agua en la planta de tratamiento “PTAP” de la Universidad Nacional de Piura.

Camargo A, (2023). Evaluación de métodos y secuencia de recolección y rompimiento celular en un cultivo microalgal de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*.

Chiriboga, G., De La Rosa, A., Molina, C., Velarde, S., & Carvajal C, G. (2020). Energy Return on Investment (EROI) and Life Cycle Analysis (LCA) of biofuels in Ecuador. *Heliyon*, 6(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04213>

Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi Roshandeh, J., Nouri, H., & Golzary, A. (2017, March 1). Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *Global Journal of Environmental Science and Management*. Iran Solid Waste Association. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2017.03.02.010>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Díaz González, Y. K., & Garnica Barragán, K. D. (2023). Análisis sistemático de literatura sobre el aprovechamiento de los procesos naturales y bioquímicos en algas o plantas en la recuperación de aguas residuales y generación de energía eléctrica.

Díaz, V., Leyva-Díaz, J. C., Almécija, M. C., Poyatos, J. M., del Mar Muñío, M., & Martín-Pascual, J. (2022). Microalgae bioreactor for nutrient removal and resource recovery from wastewater in the paradigm of circular economy. *Bioresource Technology*, 127968. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127968>

Flor Mejía. T.C. (2023). Obtención de lípidos a partir de biomasa microalgal de *scenedesmus sp.* cultivada en agua residual de origen acuícola.

García Acevedo, S. L., & Ortiz Fajardo, M. F. (2023). Bioabsorción de nitratos y fosfatos mediante *Chlorella vulgaris* a partir de aguas residuales domésticas del Parque Ambiental Cantarrana-Bogotá.

Hernández, N. (2022). *EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE LÍPIDOS DE Chlorella vulgaris Y Nannochloropsis oculata EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO* [Trabajo de grado, Universidad Autónoma de Sn Luis Potosí]. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/7505/TesisM.FCQ.2022.Evaluaci%C3%B3n.Hern%C3%A1ndez%28Versi%C3%B3n%20p%C3%ABblica%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572014000200001>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Ibadurrohman, I. A., Hamidi, N., & Yuliati, L. (2021). The role of the unsaturation degree on the droplet combustion characteristics of fatty acid methyl ester. *Alexandria Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2021.07.038>

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>

Mariadhas, A., Sathish Kumar, B., Kabilan, K., Jayaraman, J., Alagu, K., Joy, N., Arun, J., Dawn, S. S., & Nirmala, N. (2023). Technical insights of microalgae derived bio-diesel on its performance and emission characteristics, techno-economics and practicability huddles. *Fuel*, 349, 128744. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.128744>

Mathimani, T., & Pugazhendhi, A. (2019). Utilization of algae for biofuel, bio-products and bio-remediation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 326–330. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.007>

Millinger, M., Meisel, K., Budzinski, M. y Thrän, D. (2018). Competitividad relativa de los costos de reducción de gases de efecto invernadero de los biocombustibles en Alemania. *Energías*, 11 (3). <https://doi.org/10.3390/es11030615>

Mohr, A., & Raman, S. (2013). Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy*, 63, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.08.033>

Pérez, M. J. (2014). VALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL DE MICROALGAS DE LAGUNAS DE TRATAMIENTO DE AGUA

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

RESIDUAL [Trabajo de grado, Universidad de Cuenca]. <https://docplayer.es/9880867-Universidad-de-cuenca-facultad-de-ingenieria-escuela-de-ingenieria-civil.html>.

Rajendran, S. (2013). Técnica de medida del crecimiento de microalgas. *Revista científica actual*, 7, 52–54.

Salazar, 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, D., Morales, V., Espada, J. J., Puyol, D., Martínez, F., Astals, S., Vicente, G., Bautista, L. 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. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.148>

Sharma, J., Kumar, S. S., Bishnoi, N. R., & Pugazhendhi, A. (2018). Enhancement of lipid production from algal biomass through various growth parameters. *Journal of Molecular Liquids*, 269, 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.103>

Shokravi, H. et al. (2022) ‘Fourth generation biofuel from genetically modified algal biomass for bioeconomic development’, *Journal of Biotechnology*, 360, pp. 23–36. [doi:10.1016/j.jbiotec.2022.10.010](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.10.010)

Tanzi, C. D., Abert, M., Chemat, F., & Vian, M. A. (2013). New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.168>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Thangam, K. R., Santhiya, A., Sri, S. R. A., MubarakAli, D., Karthikumar, S., Kumar, R. S., Thajuddin, N., Soosai, M. R., Varalakshmi, P., Moorthy, I. G., & Pugazhendhi, A. (2021). Bio-refinery approaches based concomitant microalgal biofuel production and wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 785, 147267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147267>

Vega Ayala, A. S. (2022). Obtención de lípidos a partir de biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de origen acuícola.

Vela-García, Nicolás, Guamán-Burneo, María Cristina, & González-Romero, Nory Paola. (2019). BIORREMEDIACIÓN EFICIENTE DE EFLUENTES METALÚRGICOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS DE LA AMAZONÍA Y LOS ANDES DEL ECUADOR. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 35(4), 917-929. Epub 22 de diciembre de 2020. <https://doi.org/10.20937/rica.2019.35.04.11>

Yousefi, Y., Hanachi, P., Samadi, M., & Khoshnamvand, M. (2023). Heavy metals (copper and iron) and nutrients (nitrate and phosphate) removal from aqueous medium by microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*, and their biofilms. *Marine Environmental Research*, 105989. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105989>

Zaimes, G. G., & Khanna, V. (2013). Environmental sustainability of emerging algal biofuels: A comparative life cycle evaluation of algal biodiesel and renewable diesel. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 32(4), 926–936. <https://doi.org/10.1002/ep.11810>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO DE MICROALGAS CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Zewdie, D. T., & Ali, A. Y. (2020). Cultivation of microalgae for biofuel production: coupling with sugarcane-processing factories. *Energy, Sustainability and Society*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13705-020-00262-5>