



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:
**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
GENERADOR DE BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus armatus*
PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA LIMONCOCHA”**

Realizado por:
JUAN FRANCISCO GONZÁLEZ LOYO

Director del proyecto:
Dr. José Rubén Ramírez Iglesias, PhD.

Como requisito para la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 08 de marzo de 2021

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

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, JUAN FRANCISCO GONZÁLEZ LOYO, con cédula de identidad #1721945093, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado 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, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



172194509-3

FIRMA Y CÉDULA

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

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

Realizado por:

JUAN FRANCISCO GONZÁLEZ LOYO

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOHANNA LUCÍA MEDRANO BARBOZA

JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 08 de marzo de 2021

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodemus armatus* 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 Ingeniería y Ciencias Aplicadas.

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

DEDICATORIA

Dedicado con todo mi corazón a mis padres, ya que sin ellos no lo habría logrado, su bendición a lo largo de mi vida me protege siempre y me lleva por el camino del bien, por eso les doy mi trabajo como agradecimiento y ofrenda por su paciencia, empuje y amor.

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

AGRADECIMIENTO

A mis padres y hermanos por estar siempre conmigo apoyándome ante todas las
adversidades.

A mis profesores José Rubén Ramírez Iglesia, Johanna Lucía Medrano Barboza y Juan
Carlos Navarro Castro por haberme guiado en mi trayectoria universitaria y apoyarme
en la culminación de mi tesis.

A mis compañeros Paula Encalada y Kevin Herrera por todo su apoyo en estos 5 años
de vida universitaria. Y a mi mejor amigo Martín Cangas por estar siempre en las
buenas y en las malas.

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

Para someter a:

To be submitted:

Juan Francisco González Loyo¹, José Rubén Ramírez Iglesias^{1*},

Johanna Lucía Medrano Barboza¹, Juan Carlos Navarro Castro¹

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

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales

Quito, Ecuador. 08/03/2021

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: PhD José Rubén Ramírez Iglesias,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas Quito, Ecuador.

Teléfono: 0986391273; email: jose.ramirez@uisek.edu.ec

RESUMEN

El uso constante de los combustibles fósiles y el impacto ambiental que estos producen ha despertado el interés en nuevas fuentes de energía renovables. Existe actualmente una fuerte tendencia hacia el desarrollo de biocombustibles a partir de biomasa de tercera generación, como las microalgas. En esta investigación se aisló e identificó la microalga *Desmodesmus armatus* a partir de muestras de agua del centro de la laguna de la Reserva Biológica Limoncocha mediante comparaciones bibliográficas, la identificación molecular se realizó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y construcción de árboles filogenéticos usando las regiones ITS y 18S. Se realizó un cultivo de diez días en fotobiorreactores por lotes de 1L con medio BG11 en el que se obtuvo 2,5 g/L de biomasa microalgal; además, se determinó la remoción de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} y DQO) diariamente. Se evaluó el contenido de lípidos a partir de biomasa húmeda y seca; y ácidos grasos libres (AGL) con biomasa seca, usando los solventes orgánicos cloroformo:metanol (1:2) [CHCl_3 : CH_3OH (1:2)] y acetato de etilo grado HPLC, los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla de solventes CHCl_3 : CH_3OH (1:2), cuyos porcentajes de lípidos a partir de biomasa húmeda y seca fueron 6,48% y 21,50%, respectivamente; mientras que el rendimiento en peso para AGL resultó de 52,80%. Con los estudios realizados y los valores obtenidos no es posible descartar el uso de esta microalga para la potencial producción de biocombustibles y se sugiere realizar más experimentos.

Palabras clave: *Desmodesmus armatus*, biomasa, lípidos, ácidos grasos libres (AGL), biocombustibles

ABSTRACT

The constant use of fossil fuels and the environmental impact they produce has sparked interest in new renewable energy sources. There is currently a strong trend towards the development of biofuels from third generation biomass, such as microalgae. In this investigation, the microalgae *Desmodesmus armatus* was isolated and identified from water samples from the center of the lagoon of the Limoncocha Biological Reserve by means of bibliographic comparisons, molecular identification was carried out by PCR (polymerase chain reaction) and tree construction Phylogenetic using the ITS and 18S regions. A culture of ten days was carried out in photobioreactors in batches of 1L with BG11 medium in which 2.5 g/L of microalgal biomass was obtained; in addition, the elimination of nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} and COD) is determined daily. The lipid content was evaluated from wet and dry biomass; and free fatty acids (FFA) with dry biomass, using the organic solvents chloroform: methanol (1:2) [CHCl_3 : CH_3OH (1:2)] and HPLC grade ethyl acetate, the best results were obtained with the solvent mixture CHCl_3 : CH_3OH (1:2), whose percentages of lipids from wet and dry biomass were 6.48% and 21.50%, respectively; while the yield by weight for AGL was 52.80%. With the studies carried out and the values obtained, it is not possible to rule out the use of this microalgae for the potential production of biofuels and it is suggested to carry out more experiments.

Keywords: *Desmodesmus armatus*, biomass, lipids, free fatty acids (FFA), biofuels

INTRODUCCIÓN

El uso prolongado de combustibles fósiles para la generación de energía y como combustible para el transporte, ha generado altas emisiones de dióxido de carbono (CO₂) a la atmósfera. (Gupta, V. K., & Tuohy, 2013). Más del 80% de la energía utilizada proviene de tres tipos de combustibles fósiles: petróleo, carbón y gas natural. Alrededor del 98% de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂), dióxido de azufre (SO₂), óxido de nitrógeno (NO_x) y monóxido de carbono (CO), son causadas por la combustión de los hidrocarburos anteriormente mencionados (Milano *et al.*, 2016).

Existe una necesidad imperiosa de reducir estas emisiones de gases de efecto invernadero para mitigar el fenómeno del calentamiento global. Desde hace algunos años, se investigan y desarrollan fuentes de energía alternativas, incluidas la energía solar, hidroelectricidad, energía geotérmica, energía eólica, energía oceánica y los biocombustibles (Saifullah *et al.*, 2014). Los biocombustibles como el biodiesel provienen de la biomasa, cuyo origen es a través de procesos biológicos y tienen el potencial de fortalecer la seguridad energética, siendo una fuente de energía ecológica, no tóxica y altamente biodegradable (Tsanaktsidis *et al.*, 2010). La combustión del biodiesel emite menos CO_x, SO_x, hidrocarburos, aromáticos, alquenos, aldehídos, cetonas y material particulado. (Anderson, 2011)

Actualmente existen tres generaciones de diferentes materias primas para la obtención de biodiesel. La primera generación producido a partir de soja, aceite de palma, etc.; segunda generación producido a partir de aceite de salmón, semillas de tabaco, paja, etc. y la tercera generación a partir de biomasa de microorganismos como microalgas, levaduras y hongos (Alam *et al.*, 2012). Las microalgas son microorganismos fotosintéticos autótrofos -heterótrofos, capaces de convertir la energía solar y sintetizar compuestos de carbono mediante la fijación del CO₂. Están presentes en una gran

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

variedad de cuerpos de agua, como lagos, estanques, ríos y mares. También se encuentran en la mayoría de ambientes terrestres incluyendo aquellos con condiciones extremas, ya que cuentan con una gran capacidad de adaptación. (Guamán & Gonzalez, 2015)

La biomasa microalgal produce tres componentes bioquímicos principales que consisten en carbohidratos, proteínas y lípidos. Se conoce que las microalgas sintetizan y acumulan rápidamente cantidades mucho más elevadas de lípidos que las plantas terrestres debido a sus altas tasas de crecimiento (Metting, 1996). Sin embargo, los rendimientos de lípidos y las tasas de crecimiento varían significativamente entre las diferentes especies. (Hu *et al.*, 2008)

Los lípidos de microalgas contienen el doble de energía almacenada por átomos de carbono que los carbohidratos, lo que se traduce directamente en un aumento doble en el contenido de energía del combustible. La biomasa de microalgas ha sido el foco de atención de la comunidad científica durante las últimas décadas para la producción de energía alternativa y sostenible, junto con otras aplicaciones y productos derivados como alimentos, compuestos antioxidantes y su implementación en procesos de biorremediación. (Rawat *et al.*, 2013)

Se sabe que los géneros de microalgas que son capaces de producir mayor contenido de biomasa y producción de lípidos para la elaboración de biocombustibles son: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeocloniu* (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). *Desmodesmus sp.* es muy común en lagos eutrofizados, siendo indicadoras del grado de contaminación de estos sistemas (Bicudo & Menezes, 2006). Para realizar una selección de microalgas para la producción de biodiesel, se deben tomar en cuenta: alta producción de biomasa, rendimiento lipídico,

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

y eficiencia de auto sedimentación (Huang *et al.*, 2012); características comunes en este género de microalgas.

A pesar de que el cultivo de microalgas para la generación de biomasa puede ser costoso por los volúmenes de agua potable que se requieren en la escala industrial, la utilización de aguas residuales como fuente de nutrientes constituye una alternativa favorable para la producción de biodiesel con microalgas. Es por ello que el cultivo de microalgas puede representar en el futuro una alternativa que resuelva parcialmente los problemas ambientales y la inestabilidad en los precios de los derivados del petróleo. (R. A. R. Morales, 2013)

En Ecuador no se han realizado muchos estudios sobre el potencial para generar biocombustibles a partir de microalgas, aunque existen catálogos de microalgas y cianobacterias de agua dulce (Guamán & Gonzalez, 2015), (E. Morales *et al.*, 2013), (Reis & Andrade, n.d.), (Vega-quezada *et al.*, 2016). Siendo un país megadiverso y por su variedad climatológica y ubicación geográfica, existen oportunidades para nuevas investigaciones sobre la producción de biocombustibles.

Por lo anteriormente mencionado, en esta investigación se estudió a la microalga *Desmodesmus armatus* autóctona del Ecuador, aislada de la laguna de la Reserva Biológica Limoncocha e identificada mediante herramientas moleculares, para evaluar su potencial generador de biomasa y de lípidos, como materia prima para la obtención de biodiesel.

MÉTODOS

Aislamiento y cultivo

La toma de muestras de agua realizada en la laguna de la Reserva Biológica Limoncocha, Sucumbíos - Ecuador (0°24'S 76°36'O), se efectuó amparado en el convenio MARCO entre el Ministerio de Ambiente y Aguas Ecuatoriano (MAE) y la Universidad

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

Internacional SEK, convenio Nro. MAE-CGJ-2019-0130-O. Para el muestreo se utilizaron tubos cónicos de 50 mL, previamente esterilizados con luz UV-C. Las muestras fueron colectadas del centro de la laguna empleando una botella de Van Dorn (botella de agua vertical), con intervalos de 20 cm hasta una profundidad de 260 cm. Muestras adicionales fueron tomadas de la superficie de la desembocadura del río Pishira. Las muestras de agua se almacenaron a 4°C y fueron transportadas conservando la cadena de frío hasta las instalaciones de la UISEK.

Previo al cultivo, cada muestra se centrifugó a 3500 xg por cuatro minutos para concentrar los microorganismos presentes. Posteriormente, se prepararon los medios sólidos selectivos Blue-Green Medium (BG11) y Bold's basal Médium (BBM) según (Andersen, 2005), con 1,4% de agar y se sembraron 100 µL con asa de Digrafsky (diseminación estéril) en cajas Petri. Cada muestra se sembró en placas con BG11 y otras con BBM. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente (Quito, Ecuador), con ciclos de luz 12:12 e intensidad de luz de 60 µmol m⁻² s⁻¹ aproximadamente. Se hicieron repiques sucesivos de colonias hasta obtener cultivos axénicos verificados por microscopio (Leica DM750). Al cultivo axénico final se le asignó el código L60cmC1B-17519, para su almacenamiento en la institución.

Identificación morfológica

La identificación morfológica se realizó con técnicas microscópicas según Clarke, A., Eberhardt, C., & Eberhardt (2002). Se identificó el género y especie mediante comparación con las descripciones originales de Bicudo & Menezes (2006) y Hentschke & Carvalho (2010), además de la comparación con las especies disponibles en la base de datos de algas de Guiry (2020).

Identificación molecular y análisis filogenéticos

La amplificación de los códigos de barras genómicos se realizó mediante PCR de colonia, usando las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y 18S de ADN ribosomal (ADNr). Para ello, se utilizaron los cebadores ITS1-4 (White *et al.*, 1990, modificados por Haidi *et al* 2016) y el set CHLORO para la región 18S (Moro *et al.*, 2009). La mezcla de reacción se realizó siguiendo las indicaciones de kit MasterMix™ de PROMEGA®, las concentraciones de cebadores y el programa de ciclado fueron las descritas por Hadi *et al.* (2016) y Moro *et al.* (2009) según la región a amplificar. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con Sybr-safe™ (0.1 µL/mL) y sometidos a un campo eléctrico por 1h a 100v constantes. La purificación de los productos de amplificación se realizó siguiendo 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 a partir de los diferentes sets de cebadores fueron ensambladas en una secuencia consenso, usando GeneStudio Professional Edition (disponible en <http://www.genestudio.com>).

Se realizó un BLAST para comparar la secuencia consenso de las regiones 18S e ITS con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente, se realizó un análisis de filogenia mediante el programa MEGA en la construcción del árbol filogenético basado en Máxima Verosimilitud (ML; Maximum Likelihood), encontrando los mejores modelos de ADN para indicar las relaciones evolutivas del organismo (Kumar *et al.*, 2018).

Determinación del crecimiento algal y obtención de biomasa

Se realizaron cultivos líquidos por triplicado en fotobiorreactores de 1 Litro de medio BG11 por diez días, empleando un inóculo inicial de 1.1×10^6 células/mL, con las siguientes condiciones: temperatura ambiente (Quito, Ecuador), ciclos de luz 12:12 e

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

intensidad de luz de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un suministro de aireación constante usando un compresor de aire JAD S-4000B con una tasa de aireación de 4,2 L/min.

Para construir la curva de crecimiento celular, se realizaron conteos diarios empleando una cámara de Neubauer y la fórmula representada en la Ec. (1).

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total de células contadas}}{\text{Total de cuadrantes}} \times 10000 \times \text{Dilución} \quad \text{Ec. (1)}$$

Adicionalmente, se midió la densidad óptica de los cultivos a 680 nm espectrofotómetro (HACH DR5000) (Sun *et al.*, 2019). Finalmente, se realizó la determinación del peso seco siguiendo el método de Voltolina (2015), en el que se tomó 1 mL de cultivo y se colocó un papel filtro previamente pesado, se dejó secar por 12 horas a 60°C y se reportó el peso. Se registró la diferencia en el peso total.

Determinación de la remoción de nutrientes

Un total de 15 mL de cultivo fueron colectados a diario y se centrifugaron a 4500 xg por cinco minutos para extraer el sobrenadante y determinar los parámetros químicos del cultivo. Se emplearon protocolos estandarizados de la Casa Comercial HACH: para determinar fósforo reactivo (PO_4^{3-}) se utilizó el método (Hach 8114), la demanda química de oxígeno (DQO) con el método (Hach 8000) y para medir nitratos (NO_3^-) con el método (Hach Company 8039).

Determinación de porcentaje de lípidos

Se determinó el porcentaje de lípidos (% de grasa total) mediante el protocolo de extracción de lípidos en seco y húmedo de Bligh & Dyer modificado por IMARPE (Salazar Pérez, 2012). Se utilizaron los solventes orgánicos cloroformo:metanol (1:2) [$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2)] y acetato de etilo (Acet. 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 24 h a 4°C protegido de la luz. Posteriormente se realizó una segunda sonicación, se recuperó el extracto, se agregó NaCl 0.58%, se aplicó vortex por un minuto,

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

se centrifugó y finalmente se colocó la fase orgánica en un tubo previamente pesado para secarlo por 12 h a 68°C hasta peso constante.

Determinación de ácidos grasos libres (AGL)

Se determinaron los AGL mediante el protocolo de extracción de ácidos grasos libres (AGL) de Tanzi *et al.* (2013). Los experimentos se realizaron por triplicado, utilizando los solventes orgánicos CHCl₃:CH₃OH (1:2) y Acet. de etilo, con 0,5 g de biomasa seca con 0,1 g de KOH. Se llevó a reflujo a 60°C durante 5 h a 300 rpm. La mezcla obtenida se filtró, se añadieron 5 mL de solvente 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 por 12 h a 68°C hasta peso constante.

Análisis estadístico

Los parámetros asociados a densidad celular, densidad óptica, biomasa seca y remoción 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 $p < 0,05$.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación morfológica de *Desmodesmus armatus*

A partir de los muestreos efectuados en la laguna de la Reserva Biológica de Limoncocha, se logró obtener un cultivo axénico a partir de muestras de agua del centro de la laguna a una profundidad de 60 centímetros, comprobado mediante observación al microscopio. En la figura 1 A, B y C se observan las imágenes obtenidas de la especie L60cmC1B-17519. En la figura 1A se muestran las colonias axénicas en placas de medio

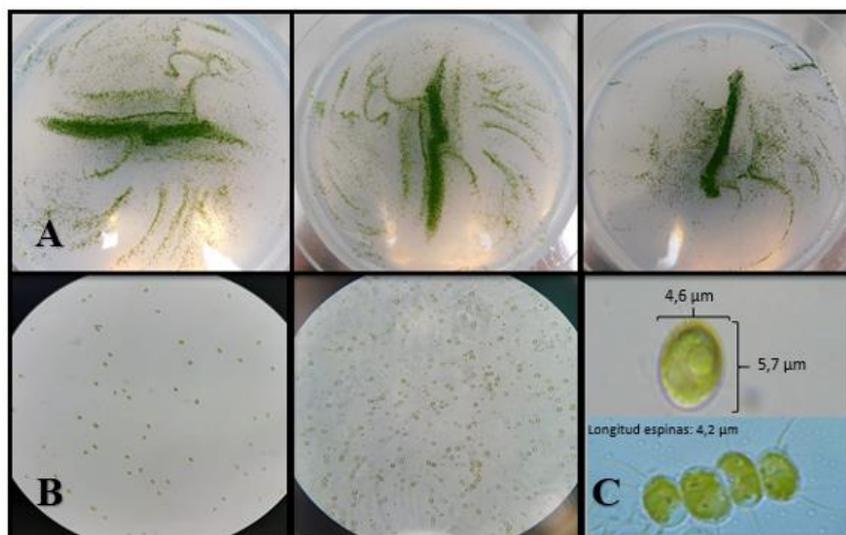
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCOMBUSTIBLES DE *Desmodesmus armatus* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

BG11 del cultivo L60cmC1B-17519. En la figura 1B Se muestra un aumento de 40X de las células algales, las cuales tienden a presentarse en forma de células aisladas y conformando cenobios de cuatro células. En la figura 1C, con un aumento de 100X, se puede observar un cenobio plano, con cuatro células dispuestas linealmente, así como la célula individual. Las células externas están compuestas por tres espinos cortos, ligeramente curvos. Las células internas tienen espinos cortos dispuestos en forma lineal, un cloroplasto parietal, un pirenoide, largo 5,7 μm , ancho 4,6 μm y la longitud de las espinas 4,2 μm . Esta descripción obtenida a partir de cultivos *in vitro* de la especie axénica permitió clasificarla taxonómicamente como *Desmodesmus armatus*.

Especie: *Desmodesmus armatus* (Hegewald, 2000)

Obra: Descripción original de Bicudo & Menezes, (2006) y Hentschke & Carvalho, (2010).

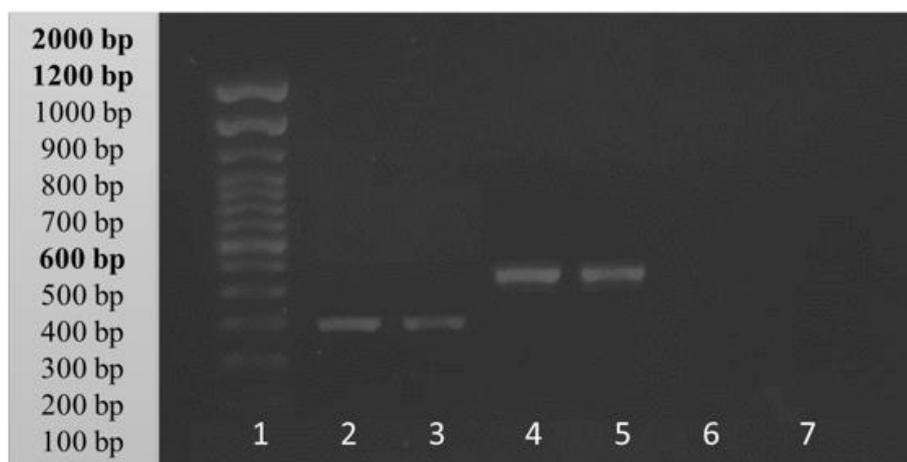
Figura 1. Cultivo axénico L60cmC1B-17519: (A) Colonias axénicas en medio BG11, (B) Aumento en el microscopio 40X, (C) Aumento en el microscopio 100X y medidas de la microalga



Identificación molecular y análisis filogenético

En la figura 2 se muestran los amplicones por duplicado, de los productos de PCR de colonia, empleando los diferentes cebadores para obtener regiones de códigos de barras de ADN de la especie aislada. Los cebadores para la región ITS1-5.8S-ITS2 generaron amplicones definidos de aproximadamente 300 bp, mientras los cebadores para la región 18s mostraron de igual forma amplicones intensos, de aproximadamente 500bp. En las amplificaciones generadas no se observaron bandas adicionales.

Figura 2. PCR de colonia y productos de amplificación obtenidos a partir de los códigos de barras empleados para la identificación molecular: (1) Marcador molecular de 100bp, (2) y (3) amplicones de la región ITS, (4) y (5) amplicones de la región 18s, (6) control H₂O de cebadores ITS y (7) control H₂O de cebadores 18s



A partir de los productos de PCR se realizó una purificación de amplicones, los cuales se secuenciaron. Las secuencias consenso obtenidas fueron de 256 bp para ITS y 452 bp para 18s. En las figuras 3 y 4 se muestra la construcción de los árboles filogenéticos para estimar una filogenia que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio. Se realizaron los árboles con el programa MEGA mediante el método de construcción Maximum Likelihood basado en el modelo (K2+G) para ITS y (K2) para 18S. El árbol filogenético basado el marcador ITS, muestra que la especie aislada L60cmC1B-17519 tiene una similitud con MN759323.1 *Desmodemus armatus*

JYCA 041 (Figura 3). Sin embargo, en el árbol con el marcador molecular 18S no hubo un resultado concreto ya que no se alineó con las secuencias de referencia (Figura 4).

Figura 3. Árbol filogenético basado en la Máxima Verosimilitud (ML; Maximum Likelihood) – Región ITS

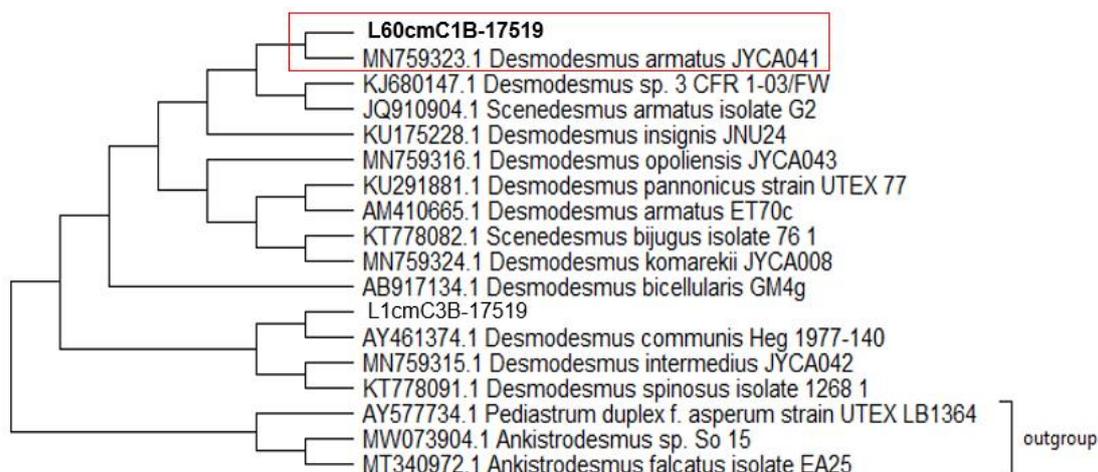
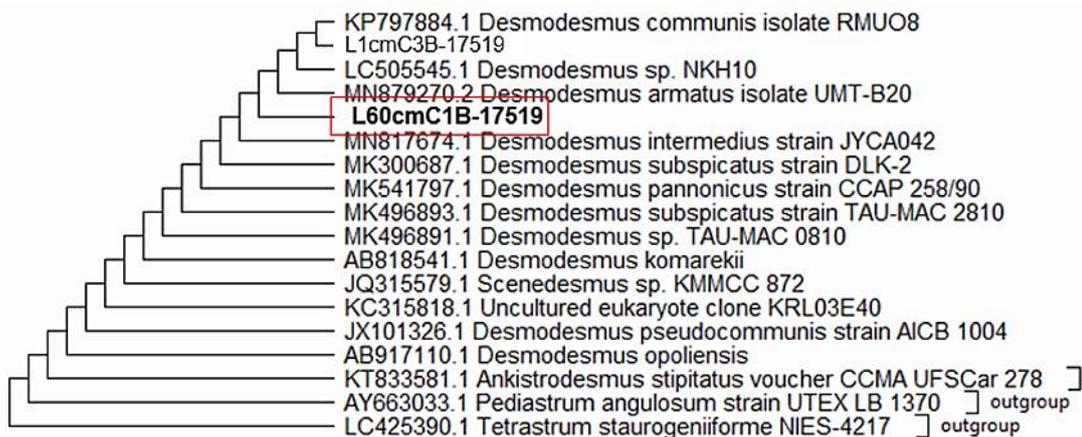


Figura 4. Árbol filogenético basado en la Máxima Verosimilitud (ML; Maximum Likelihood) – Región 18S



Crecimiento algal

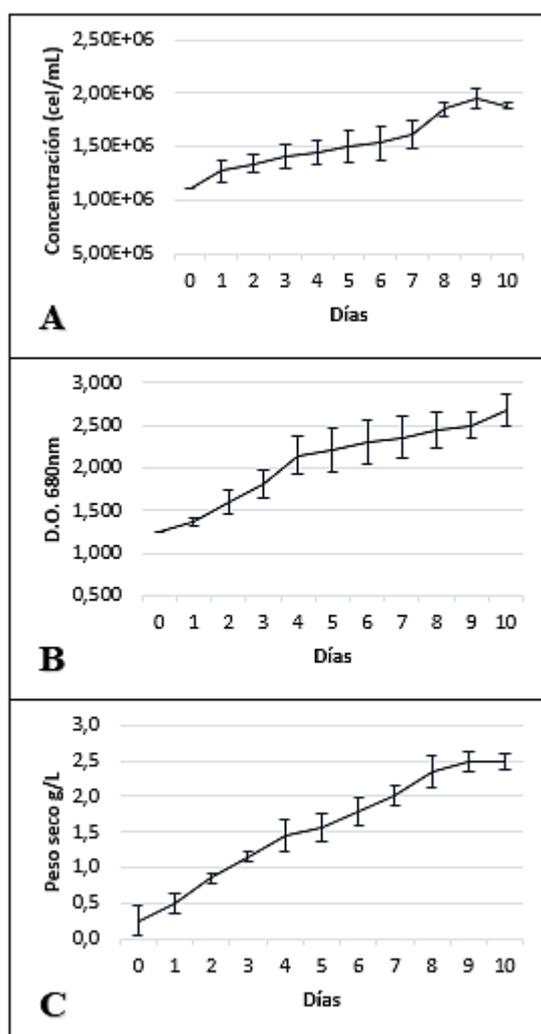
En la figura 5A, B y C se observan las curvas de densidad celular, D.O. y biomasa seca de *Desmodesmus armatus* durante 10 días, con una concentración inicial de $1,1 \pm 0,00 \times 10^6$ células/mL, λ_{680} $1,24 \pm 0,00$ y $0,3 \pm 0,3$ g/L, respectivamente. Se observa un crecimiento de la microalga durante los primeros siete días de cultivo, hasta alcanzar una fase estacionaria a partir del día ocho. Los valores finales de densidad celular, D.O. y biomasa seca fueron $1,88 \pm 0,028 \times 10^6$, λ_{680} $2,67 \pm 0,18$ y $2,5 \pm 0,11$ g/L, respectivamente.

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

Estos valores son estadísticamente diferentes en comparación con los valores iniciales ($p < 0.05$). La productividad de la biomasa para esta especie fue de 0,25 g/L*día, calculada con la Ec. (2):

$$\text{Productividad de biomasa} = \frac{\text{peso biomasa seca (g)}}{\text{volúmen de cultivo (L) x tiempo de cultivo (d)}} \quad \text{Ec. (2)}$$

Figura 5: Curvas de crecimiento y generación biomasa de L60cmC1B-17519: (A) concentración celular, (B) D.O._{680 nm} y (C) peso seco



Remoción de nutrientes

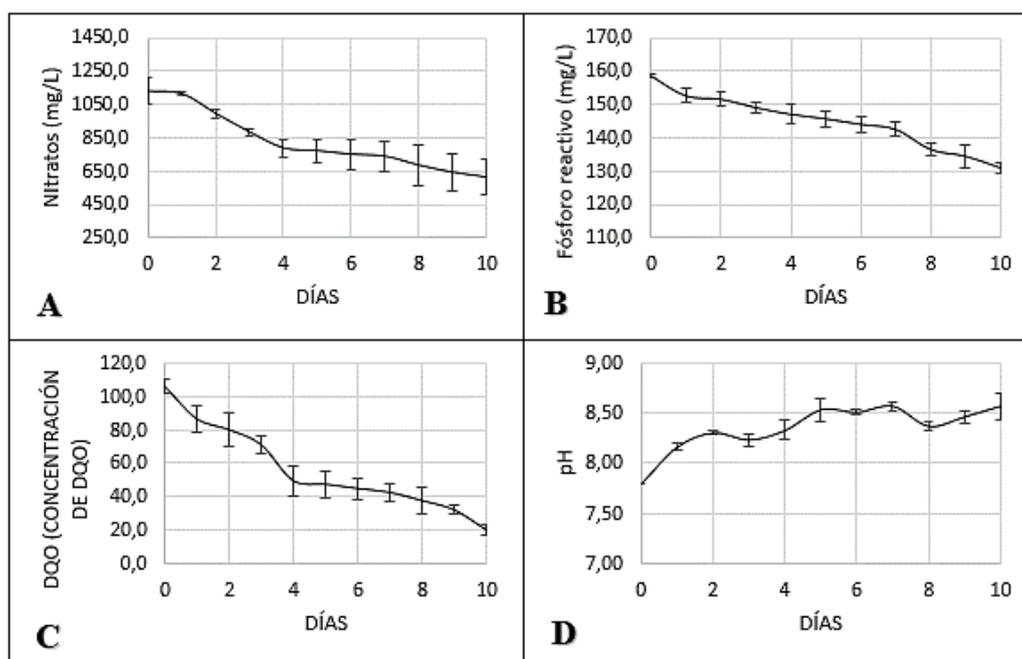
Para la remoción de nutrientes se usaron medidas indirectas de nitrógeno en forma de nitratos (NO_3^-), fósforo en forma de fósforo reactivo (PO_4^{3-}) y carbono en forma de DQO. La figura 6A-C muestra una disminución gradual de nitratos, fósforo reactivo y DQO respectivamente, durante los 10 días del cultivo celular. Se realizó un control diario

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

manteniendo de pH en un rango de 7.8 hasta 8.57 con la adición de HCl 0,5M como se muestra en la figura 6D.

La curva de nitratos inició en el día 0 con una concentración de $1130,5 \pm 75,66$ mg/L NO_3^- , llegando al día diez con una concentración de $611 \pm 106,07$ mg/L NO_3^- (Figura 6A). En la curva de fósforo reactivo se observa una disminución leve pero significativa, tuvo como valor inicial en el día 0 de $158,5 \pm 0,71$ mg/L PO_4^{3-} y un valor final en el día 10 de $131 \pm 1,41$ mg/L PO_4^{3-} (Figura 6B). En la curva de Demanda Química de Oxígeno (DQO) en el día 0 señaló un valor de $106 \pm 4,24$ mg/L y en el día 10 un valor de $20 \pm 2,83$ mg/L (Figura 6C). En los valores iniciales y finales de nitratos, fósforo reactivo y DQO se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Figura 6. Remoción de nutrientes y control pH: (A) Nitratos, (B) Fósforo reactivo, (C) DQO y (D) pH



Lípidos y AGL

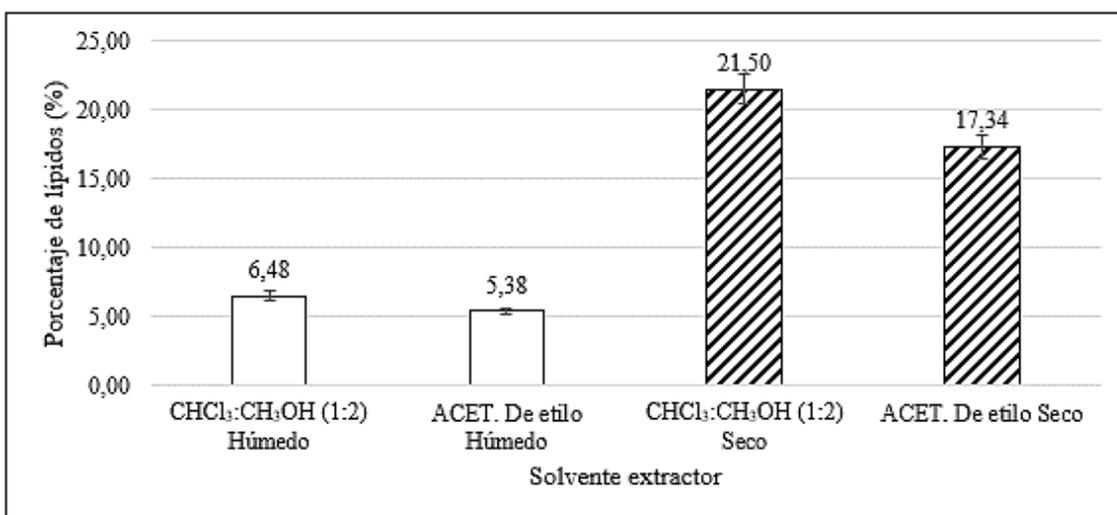
Se calculó el porcentaje de lípidos mediante la Ec. (3):

$$\%G = \left(\frac{T_2 - T_1}{W} \right) \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

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

Donde, %G es el porcentaje de grasa en la muestra, T₂ representa el peso de un tubo falcon en (g) que contiene la grasa seca, T₁ es el peso de un tubo falcon vacío previamente pesado y W es el peso de la muestra en (g). En la figura 7 se muestra el porcentaje de lípidos usando biomasa húmeda y seca; se utilizaron dos solventes orgánicos CHCl₃:CH₃OH (1:2) y Act. de etilo, el experimento se realizó por triplicado, el resultado final fue el promedio de los triplicados. En la extracción húmeda con CHCl₃:CH₃OH (1:2) se obtuvo 5,38% y en Act. de etilo 6,48%. En la extracción seca con CHCl₃:CH₃OH (1:2) el porcentaje fue de 21,50% y en Act. de etilo de 17,34%.

Figura 7: Determinación de la grasa total (lípidos)



La productividad de lípidos con biomasa húmeda, usando los solventes CHCl₃:CH₃OH (1:2) y Act. de etilo fue de 0,0162 g/L*d y 0,0134 g/L*d, respectivamente. La productividad de lípidos usando biomasa seca, con el solvente CHCl₃:CH₃OH (1:2) fue de 0,0538 g/L*d y con Act. de etilo 0,0434 g/L*d; ambos resultados se obtuvieron a partir de la Ec. (4):

$$\text{Productividad de Lípidos} = \frac{\text{peso biomasa seca (g)}}{\text{volumen de cultivo (L) x tiempo de cultivo (d)}} \quad \text{Ec. (4)}$$

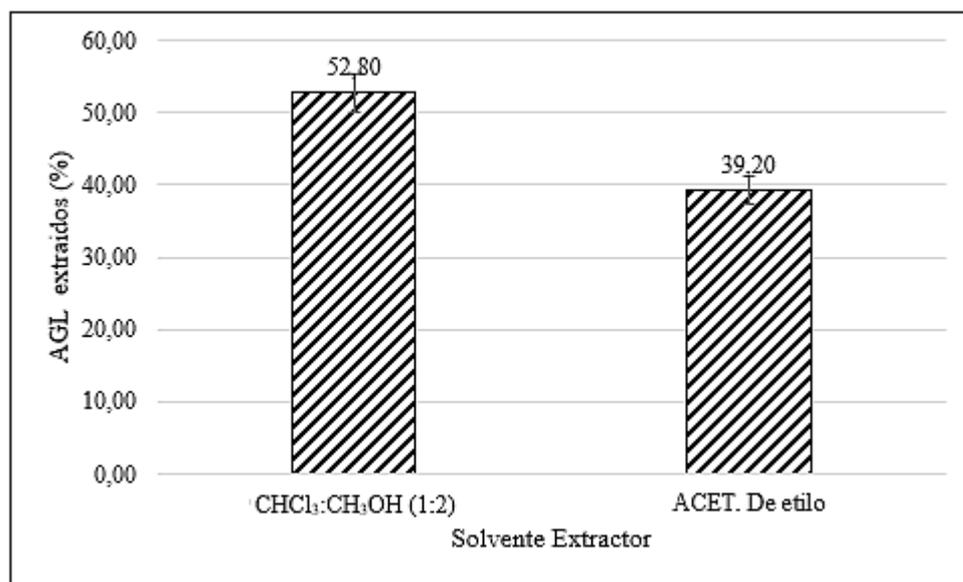
Se calculó el porcentaje de ácidos grasos libres mediante la Ec. (5):

$$\% \text{AGL} = \left(\frac{T_2 - T_1}{W} \right) \times 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

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

Donde, %AGL es el porcentaje de ácidos grasos libres en la biomasa, T_2 representa el peso de un tubo falcon en (g) que contiene los AGL, T_1 es el peso de un tubo falcon vacío previamente pesado y W es el peso de la muestra en (g). En la figura 8 se muestra el porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) usando biomasa seca, utilizando los solventes orgánicos $CHCl_3:CH_3OH$ (1:2) y Act. de etilo; el experimento se realizó por triplicado, el resultado final fue el promedio de los triplicados. En la extracción con $CHCl_3:CH_3OH$ (1:2) el porcentaje fue de 39,20% y en Act. de etilo de 52,80%.

Figura 8: Determinación del porcentaje de ácidos grasos libres (AGL)



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la presente investigación, se llevó a cabo el aislamiento y caracterización morfológica y molecular de la microalga L60cmC1B-17519 procedente de la laguna de la Reserva Biológica Limoncocha, para evaluar el potencial en la obtención de biocombustibles. La fase de búsqueda de cepas de microalgas para ser incluidas en colecciones o banco de algas constituye la primera fase de exploración de aquellos ambientes naturales que pueden contener una gran biodiversidad o simplemente permite la detección de estos microorganismos en sitios únicos de carácter endémico, los cuales

también representan un potencial para investigación desde el punto de vista ecológico, taxonómico, biotecnológico y ambiental (E. Morales *et al.*, 2013).

La selección del medio de cultivo para el crecimiento celular es un factor importante tanto para densidad celular, biomasa y lípidos (Chankhong *et al.*, 2018). Kaur *et al.* (2020) reportó que el uso del medio BG11 generó mejor crecimiento celular en comparación con el medio BBM en *Scenedesmus bijugus*; esto se confirmó con el crecimiento celular de este estudio, en el cual se probaron inicialmente los dos medios de cultivo en agar para el aislamiento mediante repiques sucesivos, observando crecimiento de las colonias con el medio BG11, mientras que en el medio BMM no se observó a simple vista el crecimiento de colonias de la especie L60cmC1B-17519 (resultados no mostrados).

Para la identificación morfológica de la cepa L60cmC1B-17519 se realizaron comparaciones con especies descritas en las investigaciones de Bicudo & Menezes, (2006); Hegewald, (2000) y Hentschke & Carvalho, (2010), encontrando semejanzas morfológicas con *Desmodesmus armatus*. En la identificación molecular se utilizó PCR de colonia, secuenciación y construcción de árboles filogenéticos mediante herramientas bioinformáticas (MEGA). El resultado generado con el marcador ITS fue *Desmodesmus armatus*, teniendo coherencia con la identificación morfológica. Sin embargo, con el marcador 18S no hubo un resultado concluyente (Figura 4). Es posible que este resultado este asociado al nivel de conservación de la de la región 18S, la cual podría ser muy conservada para este grupo taxonómico, incapaz de diferenciar *Desmodesmus armatus* y *Desmodesmus intermedius*. Por otra parte, la región ITS puede ser lo suficientemente variable como para diferenciar las especies del presente estudio, lo cual permitió establecer la identificación molecular y confirmarla con la herramienta de identificación morfológica.

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

El género *Desmodesmus* tuvo su origen en *Scenedesmus*, y se diferencian morfológicamente de estas últimas por las espinas que presentan en los extremos e intermedios de la célula (Bicudo & Menezes, 2006). *Desmodesmus sp.* son muy comunes en cualquier cuerpo de agua, ya sea oligo, meso o eutrófica, pero principalmente en este último ambiente, siendo indicadoras del grado de contaminación de estos sistemas que influencia su uso actual (Bicudo & Menezes, 2006). En este caso, la cepa de esta investigación catalogada como *Desmodesmus armatus* fue aislada en la Laguna de Limoncocha, la cual representa un hábitat apto para esta microalga debido a las características climatológicas de la zona y las actividades antropogénicas que se realizan a sus alrededores (Alves *et al.*, 2018). Es importante la adecuada identificación de microalgas y microorganismos en general para hacer pruebas de potencial biotecnológico, con la finalidad de llevar un registro de las especies presentes en el Ecuador y para hacer una comparación adecuada del rendimiento a nivel diferentes indicadores, como remoción de nutrientes y generación de lípidos, con otras algas de similar o diferente género y/o especie.

El crecimiento de microalgas es uno de los factores a considerar dentro de su evaluación del potencial biotecnológico y está determinado por la disponibilidad de nutrientes del medio, sus condiciones (luz, temperatura, pH, etc.) y la densidad celular inicial (Guldhe *et al.*, 2017). En el crecimiento celular de la microalga aislada en este estudio, se alcanzaron valores finales de densidad celular y biomasa iguales a $1,88 \pm 0,028 \times 10^6$ células/mL y de $2,67 \pm 0,18$ y $2,5 \pm 0,11$ g/L, respectivamente. En general, la especie L60cmC1B-17519 muestra un comportamiento de generación de biomasa similar al de otros estudios con microalgas de igual y diferentes géneros. Trabajos como el descrito por Singh, (2014) reportan que en un cultivo de 30 días en medio BG11 con un control de temperatura a 28°C, intensidad de luz $44,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 14:10

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

h, la especie de *Desmodesmus armatus* generó una concentración de biomasa de 2,58 g/L. Adicionalmente, Otsima *et al.* (2019) reportó que en un cultivo de 14 días en medio BBM la especie de *Desmodesmus armatus* generó una concentración de biomasa de 0,28 g/L. Es importante destacar que modificaciones adicionales en el medio de cultivo, como la aplicación de una fuente de CO₂, pueden influenciar positivamente al crecimiento y generación de biomasa de la microalga. Investigaciones en cultivos de *Scenedesmus sp.* en medio BG11, añadiendo pulsos de CO₂ (96:4) como fuente de carbono, mostraron una máxima densidad celular y biomasa seca de $5,7 \pm 0,9 \times 10^7$ células/mL y $2,92 \pm 0,45$ g/L respectivamente (Verduga Vera, 2020). Por otra parte, la productividad de biomasa de este estudio fue de 0,25 g/L*día. Otsima *et al.* (2019) reportó una productividad de biomasa de 0,02143 g/L*día en la especie *Desmodesmus armatus*. en medio BBM a 30°C por 14días. Verduga Vera, (2020) reportó una productividad de 1,95 g/L*día a 25° por 11 días, añadiendo pulsaciones de CO₂. La productividad de biomasa varía de acuerdo a la cepa microalgal y las características del medio en que se desarrolla (Choi, 2016).

El cultivo de microalgas tiene aplicaciones significativas a corto plazo, porque permite eliminar nutrientes (nitrógeno, fósforo y carbono) en cuerpos de aguas de manera eficiente y por lo tanto se pueden usar en procesos como biorremediación (García-gozalbes, 2015). En el presente estudio se generó una remoción de DQO de 81,13% en diez días, en el caso de nitrato y fósforo reactivo hubo una remoción de 45,95% y 17,35%, respectivamente. Hammouda *et al.* (1995) investigaron las especies de *Scenedesmus sp.* y *Chlorella vulgaris* en diez días de cultivos empleando aguas residuales domésticas, encontrando una remoción de DQO del 89 y 91,7%, respectivamente. Mientras que, Lau *et al.* (1996) investigaron el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en aguas residuales municipales durante 14 días; la eficiencia de remoción de nitrógeno inorgánico reportado fue del 86%, mientras que en el fósforo inorgánico se obtuvo una remoción del 70%.

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

Aunque la remoción de fósforo del presente estudio no fue tan elevada en comparación con otras investigaciones, no se descarta la implementación de esta microalga para procesos biotecnológicos como biorremediación de aguas contaminadas.

Cabe destacar que el estudio de evaluación del potencial generador de biocombustibles de *Desmodesmus armatus* de la presente investigación, es el primero en el Ecuador en cuanto a la aplicabilidad Biotecnológica. Las microalgas tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de lípidos en sus células por lo que son de mucho interés como fuentes alternativas de energía renovable (Ruiz *et al.*, 2015). En esta investigación se obtuvo 6,48% de lípidos con el solvente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2) y 5,38% con el solvente Acet. de etilo empleando en los dos casos biomasa húmeda. En el caso de la biomasa seca se obtuvo 21,50% y 17,34% para los solventes $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2) y Acet. de etilo, respectivamente. Una alternativa para disminuir costes es el uso de biomasa húmeda, ya que es una forma de reducir gastos energéticos asociado a la remoción de humedad, tales como los procesos de secado o liofilización tradicionalmente empleados en el uso de biomasa microalgal (Hu *et al.*, 2008).

Singh, (2014) reportó para *Desmodesmus armatus* un 29% de lípidos usando el solvente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1:0.8). Por otra parte, Sun *et al.* (2019) reportó que *Desmodesmus sp.* cultivada en medio BG11 durante 35 días con un control de temperatura de 25°C, obtuvo 26,64% de lípidos extraídos usando $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0.8). A pesar de que Singh, (2014) usa *Desmodesmus armatus* y Sun *et al.* (2019) usan una especie similar a la de este estudio, el porcentaje de lípidos es mayor, esto puede atribuirse a que realizaron un control de temperatura y el tiempo de cultivo de la microalga fue mayor. En el estudio de Hasan *et al.* (2014), *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas porcinas obtuvo 15,2% de lípidos extraídos a partir de biomasa seca con el solvente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1), el cual muestra un porcentaje menor en comparación al de este

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

estudio; esto puede ser por el uso de un sustrato diferente el cual pudo proveer una menor cantidad de nutrientes para la microalga.

La productividad de lípidos de este estudio con biomasa seca, con el solvente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2) fue de 0,0538 g/L*d. La productividad de lípidos reportado por Singh, (2014) en la especie *Desmodesmus armatus* fue de 0,758 g/L*día, usando como solvente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1:0.8). Ma *et al.* (2017) reportó una productividad de 0,125 g/L*día de la especie *Scenedesmus sp.* en medio BG11 y aguas residuales con melaza, usando $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1) a 25°C durante 7 días. El valor obtenido en el presente estudio no se encuentra en el rango que reportan otros autores; Singh, (2014) usó la misma especie de microalga pero tuvo más tiempo de crecimiento; en cambio Ma *et al.* (2017) se le puede atribuir a que usaron melaza residual, para proporcionar la fuente de carbono y nutrientes para el crecimiento de microalgas y la acumulación de lípidos.

Chen *et al.* (2012) reportó que *Scenedesmus sp.* cultivada en medio BG11 con aireación comprimida (1% CO_2) durante diez días; generó un valor de AGL de 70,3% con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2), luego de almacenar la biomasa por un día a 25°C y liofilizarla a -80°C. La presente investigación obtuvo 52,80% de AGL extraídos con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2) y 39,20% de AGL extraído con Acet. de etilo; ambos porcentajes difieren considerablemente del valor presentado por Chen *et al.* (2012); sin embargo, no es posible descartar el uso de *Desmodesmus armatus* en la producción de biocombustibles sin tomar en cuenta los posibles tratamientos que se pueden aplicar a la biomasa y las condiciones del medio de cultivo, para lo cual se necesitan más estudios sobre esta microalga.

CONCLUSIONES

En este estudio se aisló la especie catalogada como L60cmC1B-17519, procedente de la laguna de la Reserva Biológica Limoncocha para evaluar el potencial generador de biomasa y lípidos como materia prima para la obtención de biocombustible. La

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

identificación morfológica y molecular arrojó como resultado que se trataba de la especie *Desmodesmus armatus*. La concentración de biomasa obtenida fue de 2,5 g/L con una productividad de 0,25 g/L*día, bajo las siguientes condiciones: temperatura ambiente (Quito, Ecuador), con ciclos de luz 12:12 e intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En cuanto a la capacidad de remoción de nutrientes (nitratos, fósforo reactivo y DQO), los valores indican que puede utilizarse en procesos de biorremediación. La extracción de lípidos con biomasa seca y la extracción de AGL presentó un mejor rendimiento con el solvente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2) en comparación con el solvente acetato de etilo. Aunque la microalga *Desmodesmus armatus* superó el valor requerido de lípidos, el porcentaje de AGL está por debajo del valor requerido para ser considerada como microalga de fuente para biocombustibles. Sin embargo, no es posible descartar el uso de esta microalga para esta aplicación biotecnológica, por lo que se sugiere realizar más experimentos. De este modo, para incrementar la biomasa y su contenido lipídico, se puede someter a estrés nutritivo a la microalga mediante deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, carbono), cambios en la salinidad y el pH del medio de cultivo y con estímulos físicos que pueden ser la temperatura y la intensidad luminosa.

RECONOCIMIENTOS

Los reactivos y materiales de esta investigación 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Alam, F., Date, A., Rasjidin, R., Mobin, S., Moria, H., & Baqui, A. (2012). Biofuel from algae-Is it a viable alternative? *Procedia Engineering*, 49, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.10.131>
- Alves, J., Souza, J. P. De, Teixeira, A. P., Nabout, J. C., Carneiro, F. M., Estadual, U., Ueg, D. G., Jardim, B., & Horizonte, N. (2018). *Eutrophication in aquatic ecosystems: a scientometric study*. 30.
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*.
- Anderson, L. G. (2011). Effects of Biodiesel Fuel Use on Vehicle Emissions. *Proceedings of the World Renewable Energy Congress – Sweden, 8–13 May, 2011, Linköping, Sweden*, 57(March), 3645–3652. <https://doi.org/10.3384/ecp110573645>
- Bicudo, C. D. ., & Menezes, M. (2006). *Scenedesmaceae (Chlorophyceae – Scenedesmaceae (Chlorophyceae – Chlorococcales) de um lago Chlorococcales) de um lago artificial urbano: Desmodesmus e Scenedesmus*.
- Chankhong, K., Chotigeat, W., & Iewkittayakorn, J. (2018). *Effects of culture medium on growth kinetics and fatty acid composition of Chlorella sp . T12*. 40(10), 1098–1104.
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.033>
- Choi, H. (2016). *Dairy wastewater treatment using microalgae for potential biodiesel application*. 21(4), 393–400.
- Clarke, A., Eberhardt, C., & Eberhardt, C. N. (2002). *Microscopy techniques for materials science*. Woodhead Publishing.
- García-gozalbes, C. C. (2015). *Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento*. VI, 49–68.
- Guamán, M., & Gonzalez, N. (2015). *CATÁLOGO DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS DE AGUA DULCE DEL ECUADOR*.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.012>

- Gupta, V. K., & Tuohy, M. G. (2013). Biofuel Technologies. *Biofuel Technologies*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-34519-7>
- Hach Company. (n.d.-a). *Nitrate: Cadmium reduction method—Powder Pillow or AccuVac® Ampuls—Method 8039*.
- Hach Company. (n.d.-b). *Oxygen Demand, Chemical: USEPA Reactor Digestion Method. Method 8000*. DOC316.53.01099
- Hach Company. (n.d.-c). *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. (2016). *DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters*. 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*.
- Hasan, R., Zhang, B., Wang, L., & Shahbazi, A. (2014). *Bioremediation of Swine Wastewater and Biofuel Potential by using Chlorella vulgaris , Chlamydomonas reinhardtii , and Chlamydomonas debaryana*. 1–20.
<https://doi.org/10.13140/2.1.3348.4168>
- Hegewald, E. (2000). *New combinations in the genus Desmodesmus (Chlorophyceae , Scenedesmaceae)*. *October*. <https://doi.org/10.1127/algol>
- Hentschke, G. S., & Carvalho, T. L. (2010). *Desmodesmus e Scenedesmus (Scenedesmaceae , Sphaeropleales , Chlorophyceae) em ambientes Resumo densidade (ind . mL -1) de Desmodesmus e Scenedesmus na primavera foi significativamente maior que a média This study on the Desmodesmus An , Friedl & Heg. 61(4), 585–601*.
- 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>
- 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. *Plant Journal*, 54(4), 621–639.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Huang, C. C., Hung, J. J., Peng, S. H., & Chen, C. N. N. (2012). Cultivation of a thermo-tolerant microalga in an outdoor photobioreactor: Influences of CO₂ and nitrogen sources on the accelerated growth. *Bioresource Technology*, 112, 228–233.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.078>

- Kaur, A., Barrow, C. J., Hodgson, P., & Adholeya, A. (2020). Biomass and Bioenergy Microalga *Scenedesmus bijugus*: Biomass, lipid profile, and carotenoids production in vitro. *Biomass and Bioenergy*, 142(September), 105749. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105749>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*. 35(June), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lau, P. S., Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1996). *Wastewater nutrients removal by *Chlorella vulgaris*: optimization through acclimation*.
- Ma, C., Wen, H., Xing, D., Pei, X., Zhu, J., Ren, N., & Liu, B. (2017). Molasses wastewater treatment and lipid production at low temperature conditions by a microalgal mutant *Scenedesmus*. *Biotechnology for Biofuels*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0797-x>
- Metting, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 17(5–6), 477–489. <https://doi.org/10.1007/bf01574779>
- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K., Loh, P. K., & Vellayan, V. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 180–197. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.150>
- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., & Gordillo, A. (2013). *Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos*.
- Morales, R. A. R. (2013). *Determinación De Aceites En Algas Marinas Como Potencial Materia Prima Para La Producción De Biodiesel*.
- Moro, C. V., Crouzet, O., Thouvenot, A., Batisson, I., & Bohatier, J. (2009). *New Design Strategy for Development of Specific Primer Sets for PCR-Based Detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in*. 75(17), 5729–5733. <https://doi.org/10.1128/AEM.00509-09>
- Otsima, O., Okonkwo, I., Ikwebe, J., & Chukwuma, J. (2019). Bioresource Technology Reports Phycoremediation of cassava wastewater by *Desmodesmus armatus* and the concomitant accumulation of lipids for biodiesel production. *Bioresource Technology Reports*, 7(May), 100255. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100255>

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

- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, *103*, 444–467. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>
- Reis, A., & Andrade, I. (n.d.). *Evaluación del potencial energético de la microalga Chlorella protothecoides en el Ecuador para la obtención de biocombustibles*.
- Ruiz, M. C., Diana, J., Rodríguez, P., Carlos, J., & Gómez, C. (2015). MICROALGAS SOMETIDAS A ESTRÉS NUTRITIVO Induction of Total Lipids Production in Microalgae Under Nutritional Stress. *21*(1), 17–26.
- Saifullah, A. Z. A., Karim, A., & Ahmad-yazid, A. (2014). Microalgae : An Alternative Source of Renewable Energy. *American Journal of Engineering Research*, *03*(03), 330–338.
- Salazar Pérez, L. E. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. *Universidad de Piura*, 145.
- Singh, D. P. (2014). *Microalgae as Feedstock for Biofuel : Biomass Yield , Lipid Content and Fatty Acid Composition as Selection Criteria*. January.
- Sun, X., Li, P., Liu, X., Wang, X., Liu, Y., & Turaib, A. (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*, *xxxx*, 119509. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119509>
- Tanzi, C. D., Vian, M. A., & Chemat, F. (2013). Bioresource Technology New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass : A green clean and scalable process. *Bioresource Technology*, *134*, 271–275. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.168>
- Tsanaktsidis, C. G., Christidis, S. G., & Tzilantonis, G. T. (2010). Study about Effect of Processed Biodiesel in Physicochemical Properties of Mixtures with Diesel Fuel in order to Increase their Antifouling Action. *International Journal of Environmental Science and Development*, *1*(2), 205–207. <https://doi.org/10.7763/ijesd.2010.v1.38>
- Vega-quezada, C., Blanco, M., & Romero, H. (2016). Synergies between agriculture and bioenergy in Latin American countries : A circular economy strategy for bioenergy production in Ecuador. *New BIOTECHNOLOGY*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.730>
- Verduga Vera, M. E. (2020). *UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL CARRERA DE BIOLOGÍA Trabajo de titulación previo a obtener el grado académico de Bióloga*.
- Voltolina, D. (2015). *Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico*.

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

January 2007, 22–26.

White, T. J., Lee, S. B., Bruns, T. D., & Taylor, J. W. (1990). *Newsletter of the
Mycological Society of America*. 64(February), 1–10.

ANEXOS

ANEXO A

**Tabla 1. Determinación de concentración celular, densidad óptica y peso seco
 de *Desmodesmus armatus***

Parámetros	Concentración celular	Densidad óptica	Peso seco
0	1,10 x10 ⁶ ± 0,00	1,240 ± 0,00	0,3 ± 0,21
1	1,27 x10 ⁶ ± 9,9 x10 ⁴	1,370 ± 0,04	0,5 ± 0,14
2	1,34 x10 ⁶ ± 8,49 x10 ⁴	1,60 ± 0,14	0,9 ± 0,07
3	1,40 x10 ⁶ ± 1,13 x10 ⁴	1,810 ± 0,16	1,2 ± 0,07
4	1,45 x10 ⁶ ± 1,20 x10 ⁴	2,145 ± 0,22	1,5 ± 0,21
5	1,50 x10 ⁶ ± 1,48 x10 ⁴	2,215 ± 0,26	1,6 ± 0,19
6	1,54 x10 ⁶ ± 1,63 x10 ⁴	2.305 ± 0,26	1,8 ± 0,19
7	1,61 x10 ⁶ ± 1,27 x10 ⁴	2,355 ± 0,25	2,0 ± 0,14
8	1,85 x10 ⁶ ± 7,07 x10 ⁴	2,450 ± 0,21	2,4 ± 0,21
9	1,95 x10 ⁶ ± 8,49 x10 ⁴	2,495 ± 0,15	2,5 ± 0,14
10	1,88 x10 ⁶ ± 2,83 x10 ⁴	2,670 ± 0,18	2,5 ± 0,11

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENERADOR DE
 BIOCMBUSTIBLES DE *Desmodosmus armatus* PROCEDENTE DE LA RESERVA BIOLÓGICA
 LIMONCOCHA

ANEXO B

Tabla 2. Remoción de nutrientes (NO₃⁻, PO₄³⁻ y DQO)

Parámetros	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	DQO
0	1130,5 ± 75,66	158,5 ± 0,71	106,0 ± 4,24
1	1114,0 ± 14,14	152,5 ± 2,12	86,5 ± 7,78
2	994,5 ± 27,58	151,5 ± 2,12	80,0 ± 9,90
3	883,0 ± 19,80	149,0 ± 1,41	71,0 ± 5,66
4	786,5 ± 53,03	147,0 ± 2,83	49,5 ± 9,19
5	770,0 ± 66,47	145,7 ± 2,35	47,4 ± 7,99
6	748,5 ± 86,97	144,0 ± 2,40	44,8 ± 6,36
7	737,0 ± 93,34	142,5 ± 2,12	42,5 ± 4,95
8	683,0 ± 120,21	136,5 ± 2,12	37,5 ± 7,78
9	640,0 ± 108,89	134,5 ± 3,54	32,0 ± 2,83
10	611,0 ± 106,07	131,0 ± 1,41	20,0 ± 2,83

NO₃⁻: concentración nitratos (mg/L)

PO₄³⁻: concentración fósforo reactivo (mg/L)

DQO: demanda química de oxígeno (mg/L)

ANEXO C

Tabla 3. Determinación del porcentaje de lípidos extraídos con biomasa húmeda y seca con los solventes orgánicos CHCl₃:CH₃OH (1:2) y acetato de Etilo

Lípidos húmedo	%	Lípidos seco	%
CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	6,48	CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	21,50
Acetato de Etilo	5,38	Acetato de Etilo	17,34

ANEXO D

Tabla 4. Determinación del porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) con los solventes orgánicos CHCl₃:CH₃OH (1:2) y acetato de Etilo

AGL	%
CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	52,80
Acetato de Etilo	39,20

ANEXO E

Tabla 5. Productividad de lípidos

Lípidos seco	Productividad
CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	0,0538 g/L*d
Acetato de Etilo	0,0434 g/L*d
Lípidos húmedo	Productividad
CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	0,0162 g/L*d
Acetato de Etilo	0,0134 g/L*d