FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

"OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL"

Realizado por:

ALISSON GISSELLE GUERRERO REVELO

Director del proyecto:

PhD (c) Johanna Medrano Barboza

Como requisito para la obtención del título de:

Ingeniera en Biotecnología

Quito, 03 de abril de 2024

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

DECLARATORIA JURAMENTADA

Yo, ALISSON GISSELLE GUERRERO REVELO, con cédula de identidad # 1720757432, declaro bajo juramento que este trabajo es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que ha 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

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

"OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus sp.* CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL"

Realizado por:

ALISSON GISSELLE GUERRERO REVELO

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

FIRMA

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

PhD. KATTY VERÓNICA CORAL CARRILLO

PhD. JESÚS LOPEZ VILLADA

Después de revisar el presente trabajo,

Lo han calificado apto para su defensa oral ante

El tribunal examinador

Firmado electrónicamente por:
KATTY VERONICA
CORAL CARRILLO

FIRMA

FIRMA

Quito, 03 de abril de 2024

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

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 Facultado de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de investigación al ser más divino, Dios.

A mis padres, Jorge Guerrero y Amparo Revelo, por su incesante apoyo, comprensión, confianza y amor incondicional, quienes con su esfuerzo y sacrificio me han brindado las herramientas necesarias e indispensables para cumplir mis metas académicas.

A mis hermanos, Anthon y Andy Guerrero, por brindarme su compañía y bondad que ha sido una gran fortaleza e impulso para seguir adelante en mi vida estudiantil y maternal.

A mi hijo, Dashiell Nogales, con sus travesuras y ternura ha sido la fuente de inspiración y motivación más grande en cada momento y su padre, Pavel Nogales, por su paciencia y amor que me ha permitido alcanzar el presente logro profesional.

Finalmente, a los familiares que creyeron en mis capacidades intelectuales.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor de tesis, PhD (c) Johanna Medrano, quien me brindo de manera profesional e intelectual sus conocimientos para llevar a cabo el presente trabajo de investigación. A los docentes Jesús López y Katty Coral por ser parte de mi formación académica. A mis compañeros de tesis, Javier Oleas y Aytana Sales por su apoyo y compañía incondicional. A la Universidad Internacional SEK, que ha sido mi segundo hogar y me ha permitido cumplir una de mis metas profesionales.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

Para someter a:

To be submitted:

Alisson Gisselle Guerrero Revelo[1], Johanna Medrano Barboza[1*],

"OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus sp.* CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL"

[1]Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador

03 de abril de 2024

*AUTOR DE CORRESPONTENCIA: 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 MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

RESUMEN

La industria avícola genera residuos que representan restos de aves de corral como materia orgánica, materia inorgánica, sólidos suspendidos, patógenos, componentes que generan contaminantes que afectan al ambiente: sin embargo, los efluentes de esta industria tienen la capacidad para ser sustrato en cultivo de microalgas, microrganimos que son capaces de remediar aguas residuales y como valor agregado producen biomasa con contenido lipídico alto para la producción de biocombustibles, al realizar el bioproceso de fotosíntesis me manera más eficiente que las plantas terrestres. En la presente investigación se realizó un cultivo en consorcio de microalgas conformado por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en agua residual de origen avícola acondicionado con luz LED blanco como control y luz LED azul para realizar una comparación en parámetros fisicoquímicos, crecimiento celular rendimiento lipídico. En el crecimiento celular se obtuvo 0,232 g/L y 0,188 g/L respectivamente de biomasa total con una productividad especifica de 0,111 d^{-1} para los dos cultivos. En los parámetros fisicoquímicos del cultivo con luz artificial blanca se obtuvo un porcentaje de remoción de 37,5 % m/m de nitrógeno total (NT), 44,66 % m/m de fósforo total (PT), 69,67 % m/m de carbono orgánico total (COT) y en el cultivo con luz LED azul se logró una remoción de 79 % m/m de (NT), 61,67 % m/m de (PT) y 92,06 % m/m de (COT). Se utilizaron seis diferentes solventes para extraer lípidos: cloroformo:metanol (1:2), cloroformo:metanol (2:1), metilciclohexano, etanol, acetato de etilo y metanol. De los seis solventes empleados en la extracción de lípidos los solventes que presentaron un mejor rendimiento para el cultivo con luz LED blanca es el cloroformo:metanol (2:1) con un 54,90 % m/m y para el cultivo con luz LED azul el metanol presentó un porcentaje de 18,90 % m/m, en la producción de ácidos grasos libres (AGL) el cultivo de luz artificial blanca el metanol

presentó un 52,84 % m/m, el cultivo de luz artificial azul el etanol logró un 42,58 % m/m y de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) directo los porcentajes más altos son 46,35 % m/m y 78,64 % m/m para el cultivo de luz LED blanca y luz LED azul respectivamente, el procedimiento de FAME indirecto se logró un 59,22 % m/m con luz artificial blanca y 42,13 % m/m con luz artificial azul, en el procedimiento de FAME a partir de AGL se obtuvo un 52,79 % m/m con luz LED blanca y 41,70 % m/m con luz LED azul, cabe recalcar que los mejores porcentajes se logró con el uso de solventes extractores orgánicos en contacto con un catalizador homogéneo (H_2SO_4). En base a los resultados de esta investigación, el consorcio microalgal presenta un porcentaje considerable de remoción de nutrientes, por lo que se puede considerar apto para realizar biorremediación en aguas residuales.

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., consorcio microalgal, agua residual avícola, lípidos, AGL, FAME.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

ABSTRACT

The poultry industry generates waste that represents poultry remains, such as organic matter, inorganic matter, suspended solids, pathogens, and components that generate pollutants that affect the environment: however, the effluents of this industry can be a substrate for microalgae cultivation, microorganisms that are capable of remediating wastewater and as an added value produce biomass with high lipid content for the production of biofuels, by performing the photosynthesis bioprocess more efficiently than terrestrial plants. In the present investigation, a microalgae consortium culture of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. in poultry wastewater conditioned with white LED light as control and blue LED light was carried out to compare physicochemical parameters, cell growth, and lipid yield. In cell growth, 0,232 g/L and 0,188 g/L of total biomass, respectively, were obtained with a specific productivity of 0,111 for the two cultures. In the physicochemical parameters of the culture with white artificial light, a removal percentage of 37,5 % m/m of total nitrogen (TN), 44,66 % m/m of total phosphorus (TP), 69,67 % m/m of total organic carbon (TOC) was obtained. In the culture with blue LED light, the removal of 79 % m/m of TN, 61,67 % m/m of TP, and 92,06 % m/m of TOC was achieved. Six different solvents were used to extract lipids: chloroform: methanol (1:2), chloroform: methanol (2:1), methylcyclohexane, ethanol, ethyl acetate, and methanol. Of the six solvents used in lipid extraction, the solvent that presented the best performance for the white LED light culture is chloroform: methanol (2: 1) with 54,90 % m/m and for blue LED light culture methanol presented a percentage of 18,90 % m/m, in the production of free fatty acids (FFA) white artificial light culture methanol presented 52,84 % m/m, blue artificial light culture ethanol achieved 42,58 % m/m and of fatty acid methyl esters (FAME) direct the highest percentages are 46,35 % m/m and

78,64 % m/m for the cultivation of white LED light and blue LED light respectively, the indirect FAME procedure achieved 59,22 % m/m with white artificial light and 42,13 % m/m with blue artificial light, in the FAME procedure from FFA 52,79 % m/m was obtained with white LED light and 41,70 % m/m with blue LED light, it should be emphasized that the best percentages were achieved with the use of organic extracting solvents in contact with a homogeneous catalyst (H_2SO_4). Based on the results of this research, the microalgal consortium presents a considerable percentage of nutrient removal, so it can be considered suitable for bioremediation in wastewater.

Key words: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., microalgal consortium, poultry wastewater, lipids, AGL, FAME.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

1.INTRODUCCIÓN

Actualmente, el consumo de combustibles fósiles reduce las reservas de petróleo y aumenta las emisiones de CO_2. Citando a Li & Haneklaus, (2021), la mayor parte de la producción energética global proviene de recursos como el petróleo. Ante la presente realidad, las personas y entidades industriales buscan constantemente métodos innovadores para obtener energía de manera responsable y no causar afecciones al ambiente.

Los biocombustibles se han transformado en la principal fuente de energía derivada de diversas biomasas renovables, ya que tienen la capacidad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero hasta un 50 %, reemplazando así algunos combustibles fósiles para transporte, industria, o producción de energía (Millinger et al., 2018).

Los biocombustibles se clasifican dependiendo del origen de obtención de biomasa y el método de producción:

- Biocombustibles de primera generación: esta clasificación incluye todos los biocombustibles que se derivan de fuentes como: almidón, azúcar, grasa animal o aceite vegetal y se produce mediante bioprocesos de fermentación, esterificación o digestión (Foteinis et al., 2020). Las limitaciones de este tipo de biocombustible, según Alalwan et al., (2019), es que aumentan los costes de producción y requiere un uso ineficiente de los crecientes recursos y energía. En términos generales, el retorno energético (retorno energético de la inversión o TRE) de los biocombustibles de primera generación es relativamente bajo: 1,797 para el bioetanol de caña de azúcar, 1,040 para el maíz y 0,739 para la madera

(Chiriboga et al., 2020). Es decir, para producir tales biocombustibles, además de competir con los cultivos alimenticios, la producción de energía es menor a la entrada de energía, por tal motivo la producción a menor escala no tiene sentido de producción (Zhao et al., 2023).

- Biocombustibles de segunda generación: este combustible se produce a partir de biomasa lignocelulósica no comestible, como residuos agrícolas, madera o sólidos urbanos (Alalwan et al., 2019).

Según Mathimani & Pugazhendhi, (2019), los biocombustibles de segunda generación tienen el beneficio de producción a partir de diferentes tipos de materias primas y no están destinados al consumo alimentario y, por tanto, no presentan una competencia ante la industria alimenticia.

- Biocombustibles de tercera generación: la materia prima para este tipo de biocombustible incluye macroalgas, microalgas y cianobacterias. El rendimiento de estos microorganismos es superior al de la biomasa lignocelulósica. Este biocombustible se caracteriza por su doble ventaja de requerir un alto consumo de CO_2 (Abdullah et al., 2019), y no compite con la industria alimentaria (Sánchez-Bayo et al., 2020).

- Biocombustibles de cuarta generación: la materia prima de estos combustibles parte de microorganismos genéticamente modificados que han sido diseñados metabólicamente para sintetizar sustancias de valor agregado con un alto contenido de lípidos o carbohidratos. Este grupo incluye microalgas, bacterias y cianobacterias (Abdullah et al., 2019).

Según Shokravi et al., (2022), las microalgas presentan un tiempo de duplicación elevado, ya que su ciclo de cosecha es más corto que el de la biomasa para biocombustibles de primera y segunda generación. Además, los estudios han demostrado

que las microalgas generan más aceite por unidad de superficie terrestre (57.000 y 19.000 litros/acre, según la especie) que el aceite de palma (2,403,47 litros/acre) u otros materiales como el aceite de palma. (68,23 litros/acre) (Mariadhas et al., 2023).

Para el crecimiento óptimo de microalgas se deben considerar ciertas condiciones como: macronutrientes (P, N y C), micronutrientes, rango estable de pH 6-8, temperatura entre 20 y 30° C, también control de agitación, oxígeno y dióxido de carbono. Suministro e intensidad lumínica (Daliry S et al., 2017). Sin embargo, existen estudios que demuestran que algunas especies se han adaptado con éxito a condiciones de pH aleatorio, temperatura y salinidad (Khan et al., 2018). Para obtener un mejor rendimiento de lípidos a partir de microalgas, se someten a condiciones de estrés lumínico, limitación de nitrógeno o aumento del contenido de hierro en el sustrato (Daliry S et al., 2017).

La importancia de la producción de microalgas radica en la capacidad para producir lípidos, a altas tasas de crecimiento, en la producción de proteínas antioxidantes y diversos productos biológicos, por lo que son populares en las industrias de biocombustibles, suplementos nutricionales, farmacéutica y cosmética (Khan et al., 2018).

Las microalgas ideales para la producción de biodiesel deben cumplir ciertas condiciones, tales como: alta tasa de crecimiento, capacidad de adaptarse a cambios en las condiciones ambientales o atmosféricas y buena capacidad para formar bandadas para su cosecha por sedimentación (Carneiro et al., 2018). Son microalgas oleaginosas porque almacenan energía en forma de lípidos o triglicéridos y entre las microalgas más estudiadas para la producción de biocombustibles se encuentra a *Ankistrodesmus sp*., *Kirechneriella sp*., *Palmella sp*., *Eudorina elegans*, *Volvox sp*., *Chlorella*, *Scenedesmus*, entre otras (Ali et al., 2022).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

Las microalgas ideales para la producción de biodiesel deben cumplir ciertas condiciones, tales como: alta tasa de crecimiento, capacidad de adaptarse a cambios en las condiciones ambientales o atmosféricas y buena capacidad para formar agregados o bandadas para su cosecha por sedimentación (Carneiro et al., 2018). Son microalgas oleaginosas porque almacenan energía en forma de lípidos o triglicéridos y se encuentran entre las microalgas más estudiadas para la producción de biocombustibles, como *Ankistrodesmus sp*., *Kirechneriella sp*., *Palmella sp*., *Eudorina elegans*, *Volvox sp*., *Chlorella*, *Scenedesmus*, entre otras (Ali et al., 2022).

Los factores importantes para un crecimiento eficiente de las microalgas se basan en la concentración adecuada de nutrientes, temperatura, luz, pH, técnica de cultivo; son variables que pueden afectar o promover el cultivo de biomasa y la acumulación de compuestos que brindan un valor agregado a las microalgas (Gebremedhin et al., 2018). Se debe tomar en cuenta que la variable más importante es la luz ya que las microalgas son fotoautótrofas y requieren la presencia de la misma para convertir la energía lumínica en energía química (Parveen et al., 2023). Según Zhang et al., (2021), la incorporación de luz LED (diodo emisor de luz) promueve una eficiencia fotosintética de las microalgas ya que la intensidad de las luces frías distribuidas de manera equitativa en el fotobiorreactor mejora la eliminación de la demanda química del oxígeno presente en el agua (DQO), nitrógeno total (TN), fósforo total (TP) y el dióxido de carbono (CO_2) (Sobolewska et al., 2023).

Los cultivos en aguas residuales como medio de crecimiento microalgal garantizan una producción y obtención de biomasa de tercera generación gracias a su adaptabilidad ambiental (Marchão et al., 2021). Las microalgas promueven la transición

de plataformas energéticas sostenibles en forma de energía renovable, garantizando una producción de biocombustible con un rendimiento aproximado de 0,1533 kg/L al utilizar cepas con un alto rendimiento en lípidos y, al aplicar parámetros optimizados en aguas residuales, con una captación alta de carbono para lograr una reducción aproximada de 273,75 g/L de dióxido de carbono (CO_2) (Rame et al., 2023).

El vertido de aguas residuales contiene micro contaminantes, hidrocarburos, metales tóxicos, tensoactivos, biocidas, principales contaminantes de agua dulce, también se caracterizan por la presencia de nutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S), potasio (K), zinc (Zn) entre otros (Priya et al., 2022). Las microalgas se caracterizan por sus componentes celulares como membranas plasmáticas, nucléolos, mitocondrias, vacuolas, cloroplasto, los cuales requieren nutrientes esenciales para dar lugar al bioproceso de fotosíntesis (Hasan et al., 2023). Las aguas residuales presentan una composición adecuada para cultivar microalgas ya que capturan nutrientes como nitrógeno, fósforo y compuestos como dióxido de carbono logrando una producción exponencial de las mismas y biorremediación en efluentes residuales (You et al., 2022).

La adición de luces LED es considerada una fuente lumínica adecuada para el crecimiento óptimo de microalgas ya que el consumo energético es de bajo coste al controlar la longitud de onda de intensidad (380 nm hasta 750 nm) (Yan et al., 2016). La energía lumínica al igual que las luces LED promueven la producción de cambios químicos en las moléculas absorbentes; es decir, los pigmentos, los mismos que son indispensables para que las microalgas realicen el bioproceso de fotosíntesis (Faife E et al., 2021). También aumentan la eficiencia eléctrica, disminuyen la disipación de calor no deseado, garantizan alta durabilidad y adaptabilidad al fotobiorreactor para una obtención de biomasa microalgal que puede ser utilizada como materia prima para la formación de bioproductos por el alto de contenido de lípidos (Hasson & Wishkerman, 2022).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

La adición de luz LED azul, verde o roja en cultivos de cianobacterias como microalgas es una técnica de optimización del sustrato ya que la longitud de onda de los diodos emisores de luz presenta una compatibilidad con la necesidad fotosintética del microorganismo cultivado, dando como resultado una alta productividad volumétrica de biomasa, producción y acumulación de lípidos, rendimiento de compuestos bioactivos, captación de luz, captura de carbono, tasa de crecimiento celular y menor tiempo de duplicación (Song et al., 2024).

Las aguas residuales industriales son efluentes que requieren un tratamiento físico, químico y biológico para reducir la carga orgánica, sólidos suspendidos, patógenos y metales pesados, por tal motivo requieren una biorremediación para ser descargados en diferentes cuerpos de agua y así evitar generar daños al ambiente y garantizar una sostenibilidad (Purba et al., 2024). La industria avícola es uno de los generadores de efluentes contaminados, se caracterizan por su alta demanda química o bioquímica de oxígeno, patógenos, sólidos suspendidos y materia orgánica e inorgánica (Viegas et al., 2021). En la actualidad se está implementando técnicas de biorremediación con microalgas puesto que garantizan una reducción de energía, uso de productos químicos y emisión de gases de efecto invernadero al hacer uso de componentes como fósforo, carbono, nitrógeno para asegurar una tasa de duplicación eficiente de microalgas cultivadas (Viegas et al., 2021).

Los esteres metílicos entre C16-C18 son el componente principal del biodiesel, es un combustible alternativo prometedor debido a sus propiedades similares a las de los combustibles convencionales (Ibadurrohman et al., 2022). Estos ésteres metílicos de ácidos grasos (o FAME por sus siglas en inglés – Fatty acid Methyl Esthers), pueden

obtenerse a partir de la reacción de transesterificación de ácidos grasos con metanol y la presencia de un catalizador (Vega A, 2022).

Se formuló como hipótesis de este trabajo, que el agua de faenamiento avícola contiene los nutrientes necesarios para que la biomasa de la comunidad microalgal obtenida del cultivo tenga un porcentaje de lípidos superior al 30 % y un contenido de ácidos grasos libres superior al 60 %, de modo que sus ésteres metílicos de ácidos grasos sean permeables para ésteres lipídicos. Por ello, en la presente investigación se estableció como objetivo determinar la composición lipídica de microalgas formadas por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp*. cultivadas en aguas residuales de faenamiento avícola con luz artificial para analizar el potencial hacia la producción de biocombustibles líquidos como el biodiésel. Para ello, primero se caracterizaron las aguas residuales mediante análisis fisicoquímicos para determinar su posible uso como medio de cultivo del consorcio de microalgas. A continuación, se analizó el crecimiento del consorcio en un fotobiorreactor para la producción de biomasa con fines de extracción de lípidos en luz LED blanca y azul. Se realizó la caracterización de la fracción lipídica de la biomasa cultivada en términos de lípidos totales, ácidos grasos libres y ésteres metílicos de ácidos grasos para probar su potencial para la producción de biodiésel de biomasa microalgal. Finalmente, se realizó una caracterización cuantitativa mediante técnicas de cromatografía de capa fina para examinar la conversión de ácidos grasos en FAME. Los resultados de los procedimientos experimentales se compararon en función de la luz LED empleada para el cultivo.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

2.MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitio de recolección

2.1.1.1.Recolección de agua residual

Puerto Limón es una parroquia rural de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, en el centro este a 104 km de la capital del Ecuador; entre las parroquias San José de Alluriquín, Luz de América y San Jacinto del Búa. Puerto Limón presenta una altitud aproximada de 244 m.s.n.s, con una temperatura de 28° C. Debido a la gran cantidad de fincas aledañas donde se realiza faenamiento avícola, se seleccionó este lugar para la recolección del agua residual.

Imagen 1: agua residual avícola de la parroquia Puerto Limón

2.2 Metodología

Se propuso el siguiente método de trabajo, el cual constó de tres fases: etapa de campo, etapa de laboratorio y etapa estadística, como se muestra en la imagen 2.

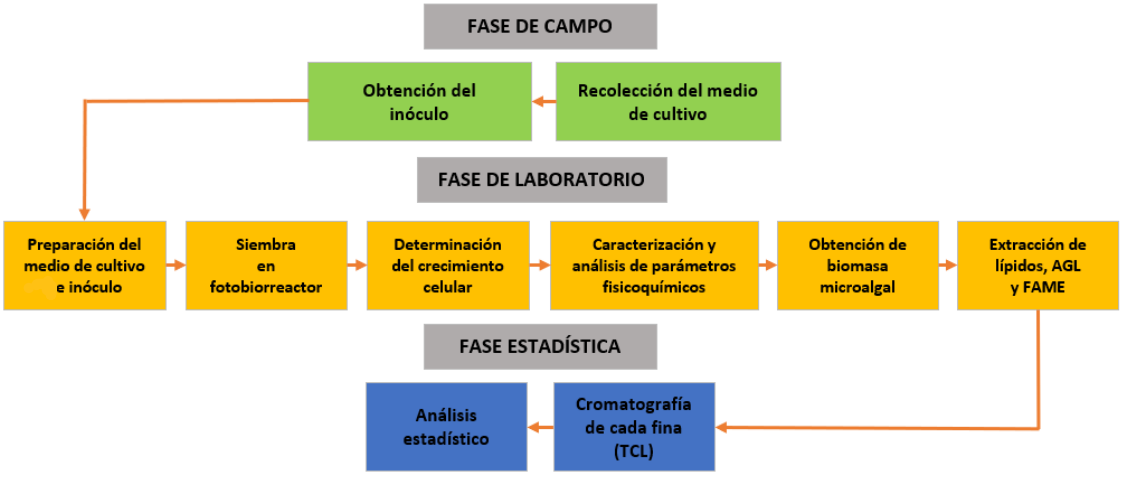


Imagen 2: Flujo de trabajo para la metodología de la presente investigación

2.2.1 Fase de campo

- **Recolección del medio de cultivo**

Se recolectaron 100 L de agua de faenamiento, de los que se emplearon 45 L para realizar el control con luz blanca y 45 litros realizar una comparación con luz azul en un tanque de faenamiento avícola en Santo Domingo. Se utilizó un trozo de madera para agitar el agua brevemente para que los nutrientes acumulados en el fondo del tanque se distribuyan por la superficie. Se procedió a verter el agua de cultivo en cuatro frascos de plástico de 20 L cada uno, sellados con una envoltura de plástico y etiquetados adecuadamente. Finalmente se guardó los envases a 4 °C para su uso posterior.

- **Obtención del inóculo**

Se obtuvo 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 UISEK 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, 1 g de CaCl2 ·2H2O. Como sustancias 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 LED de color blanco y aireación constante a 4.2 L/min, realizando cambios de medio cada 15 días.

2.2.2 Fase de laboratorio

- **Caracterización del medio de cultivo**

Diariamente se recolectaron 150 mL de agua de faenamiento avícola en una botella previamente desinfectada bajo luz UV y se analizó el contenido de los macronutrientes más importantes (mg/L) para un crecimiento óptimo de las microalgas utilizando los siguientes métodos: nitrógeno total (TN), fósforo total (TP) y carbono orgánico total. (COT) Los protocolos HACH son similares al método 1072 (HACH 2014a), 10127 (HACH 2014c) y 10128 (HACH 2014b), respectivamente.

- **Preparación del medio de cultivo**

Se observó la presencia de partículas sólidas en el agua de faenamiento avícola recolectada que interfieren con el crecimiento óptimo de las microalgas, por ello se utilizaron filtros cilíndricos multicapa para eliminar estas partículas. Luego, el agua filtrada se esterilizó en recipientes Pyrex de 15 L, en autoclave a 121° C y 15 PSI durante 30 minutos, se enfrió y se almacenó en recipientes de plástico de 20 L hasta su uso.

Imagen 3: medio de cultivo

- **Preparación del inóculo**

Se prepararon dos fotobiorreactores uno para ser utilizado en el cultivo principal como control en luz LED blanca y otro para comparar con luz LED azul, utilizando botellas de plástico de 5 L en los que se inoculó 3,600 mL de agua de faenamiento y 400 mL de consorcio microalgal para tener una concentración en relación 1:10. Se mantuvo los fotobiorreactores a temperatura ambiente y se utilizó luz natural. (Imagen 4) durante 7 días con un fotoperiodo de 12 h y filtros de 0,22 µm en la entrada y salida de aire para reducir la contaminación de estos. Los cultivos se mantuvieron hasta que se alcanzó una concentración de $1 \cdot 10^6$ células/mL determinado por el recuento celular diario.

Imagen 4: Fotobiorreactor con inóculo

- **Siembra del inóculo en el fotobiorreactor**

Imagen 5: Fotobiorreactor con cultivo de consorcio microalgal

Cuando el inóculo alcanzó la concentración deseada ($1 \cdot 10^6$ células/mL), se colocaron 5 L de inóculo en un fotobiorreactor plano de vidrio templado con dimensiones de 68 cm de alto · 61 cm de ancho y 18 cm de profundidad (Imagen 5), y adicionando 40 L de agua de faenamiento avícola pre-tratadas y filtradas, respectivamente. El fotobiorreactor se conectó a un compresor a través de una manguera de ventilación que proporciona un burbujeo continuo a una velocidad de 4,2 L/min, eliminando así la sedimentación de las microalgas en el fotobiorreactor. También se colocaron termopares para controlar la temperatura y mantenerla a 24 ± 3° C. El cultivo se mantuvo en condiciones de laboratorio en Quito durante 14 días entre los meses de septiembre y octubre del año 2023.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

- **Determinación de crecimiento de microalgas**

Para determinar el crecimiento microalgal, todos los días, durante los 14 días, se recolectaron 50 mL del agua de cultivo en tubos falcon etiquetados y desinfectados mediante esterilización. Posterior a su uso se mantuvieron en refrigeración a 4° C. Se realizó conteo celular en una cámara de Neubauer en peso seco por triplicado para lograr una mejor precisión estadística.

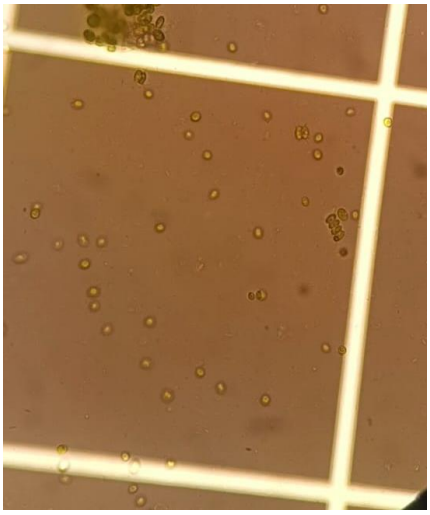


Imagen 6: conteo celular en cámara de Neubauer

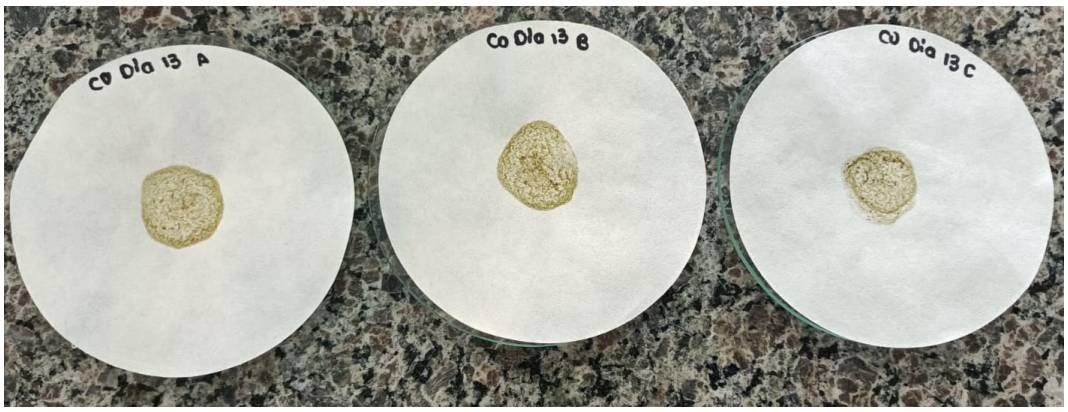


Imagen 7: peso seco

Para realizar el conteo celular, se tomaron 10 µL de la muestra homogenizada y se utilizó la cámara de Neubauer en un microscopio óptico marca Leica con el lente 40X. Se determinó la concentración celular aplicando la Ecuación 1.

$$Concentración\ celular\ \left(\frac{cel}{mL}\right) = \frac{\#\ células\left(\frac{cel}{mL}\right) \cdot 10000}{\#\ de\ cuadros \cdot dilución}$$

Ecuación 1: Concentración celular

Se realizó el peso seco utilizando 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 colocó 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 otros investigadores (Guatemal Nely, 2023), se logró obtener el peso final.

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

Ecuación 2: Peso seco

También se determinó la productividad volumétrica de la biomasa (PV) con 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 específico con la Ecuación 6 donde N_T representa el número de células al final de la fase exponencial, N_O es el número de células al comienzo de la fase exponencial, T_T es el día final de la fase exponencial, y T_O es el día de inicio de la misma fase.

$$PV\ de\ biomasa\left(\frac{g}{Ld}\right) = \frac{peso\ de\ biomasa\ seca(g)}{volúmen\ de\ cultivo(L) \cdot tiempo\ de\ cultivo(d)}$$

Ecuación 3: productividad volumétrica

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

Ecuación 4: productividad específica de biomasa

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

Ecuación 5: tiempo de duplicación de microalgas

$$Tasa\ de\ crecimiento\ específica\ (\mu) = \frac{Ln(N_T/N_0)}{T_T - T_0}(d^{-1})$$

Ecuación 6: tasa de crecimiento específico

- **Parámetros fisicoquímicos**

Para determinar la eliminación de micronutrientes, las muestras recolectadas diariamente se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes se utilizaron para analizar las concentraciones de nitrógeno total (TN), fósforo total (TP) y carbono orgánico total (TOC) por triplicado utilizando el protocolo HACH. Utilizando la Ecuación 7 utilizada por Guatemal Nely, (2023), donde la concentración inicial de nutrientes es representada como (C_I) y la concentración final como (C_F) se multiplican por 100 para obtener el porcentaje de eliminación de nutrientes. También se analizaron los sobrenadantes en términos de metales pesados en un laboratorio externo certificado para realizar análisis de aguas mediante protocolos estandarizados que se muestra en el anexo 1.

$$\%\ Remoción\ de\ Nutrientes = \frac{(C_I - C_F)}{(C_I)} \cdot 100$$

Ecuación 7: remoción de nutrientes

- **Cosecha y obtención de biomasa microalgal**

Cuando se alcanzó los 14 días de cultivo, se observó que las microalgas alcanzaron la fase de lisis debido a una disminución en los parámetros de crecimiento celular. El producto del fotobiorreactor se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos para eliminar la mayor cantidad de humedad posible y obtener biomasa. La centrifugación se hizo en tubos falcon de 50 mL. También se recolectaron 4 L del sobrenadante de este proceso en un recipiente para realizar pruebas de análisis elemental, luego la biomasa centrifugada se colocó en un vidrio de reloj y se dejó secar en una estufa a 60° C durante 24 h. Finalmente, se raspó la biomasa seca y se pesó para determinar la biomasa total y se almacenó para su posterior análisis.

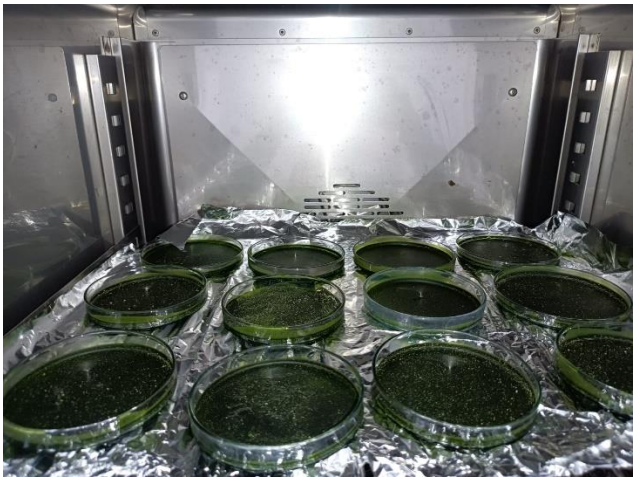


Imagen 8: biomasa seca

- **Extracción de lípidos**

Se extrajeron los lípidos totales a partir del método de Folch, modificado por (Escobar et al., 2018) usando seis solventes: cloroformo:metanol (1:2), cloroformo:metanol (2:1), metilciclohexano, etanol absoluto, acetato de etilo y metanol puro.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE UN CONSORCIO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* sp. CULTIVADO EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL

En un tubo falcon de 50 mL se colocaron 0,5 g de biomasa seca con 20 mL de cada solvente seleccionado y se dejó reposar por dos días. Al transcurrir los dos días se dejó incubar a 28° C por 24 h. Posteriormente, se sonicó nuevamente por 45 min y se centrifugó por 30 min. Se recolectó el sobrenadante y se colocó en un tubo falcon previamente desinfectado. Se agregó 6 mL de NaCl al 0,58 % v/v y se homogeneizó utilizando una centrifuga a 4000 rpm para separar la parte acuosa de la parte orgánica. Se pesaron los frascos vacíos y se etiquetaron correctamente para dejar secar los frascos con la parte orgánica en una estufa a 80° C. Finalmente, se determinó el porcentaje lipídico a partir de la ecuación 8 usada por de Souza et al., (2023), donde P_L hace referencia al peso del frasco que contiene el lípido, y P_B se refiere al peso de la biomasa microalgal donde el porcentaje total se representa como % m/m.

$$\%\ Lípidos = \left(\frac{P_L}{P_B}\right) \cdot 100$$

Ecuación 8: porcentaje de lípidos

También se calculó la productividad volumétrica del contenido lipídico utilizando la ecuación 9, usada por de Souza et al., (2023), donde M_L hace referencia a la masa lipídica, V es volumen del cultivo y t es el tiempo en días.

$$Productividad\ Total\ Volumétrica\ \left(\frac{g}{Ld}\right) = \left(\frac{M_L}{V \cdot t}\right)$$

Ecuación 9: productividad volumétrica

Y a partir de la ecuación 10, se calculó la productividad especifica de biomasa implementando el valor de la productividad volumétrica de biomasa por la concentración de biomasa (Guatemal Nely, 2023).

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

Ecuación 10: productividad específica de biomasa

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

Para la extracción de ácidos grasos libres totales se implementó el protocolo de Dejoye Tanzi et al., (2013) que se enfoca en la saponificación de biomasa seca con los seis solventes utilizados en el procedimiento anterior. Se montó el equipo de reflujo como se observa en la Imagen 9 y se procedió a saponificar 0,5 g de biomasa microalgal en conjunto con una disolución de 20 mL de metanol y 0,1 g de KOH, se mantuvo en reflujo de 60° C por 4 h a 300 rpm. Al transcurrir las 4 h se filtró y adicionó HCl para lograr obtener un pH de 5. Luego se pasó la solución a un embudo de decantación de 50 mL agregando el mismo volumen de agua para eliminar los gases. Posteriormente, se pesó los tubos vacíos previamente etiquetados y se adicionó la mezcla del embudo en los frascos para someter a un proceso de secado de 80° C hasta lograr un mantener un peso constante. Finalmente, se pesó los frascos secos con la muestra de AGL.

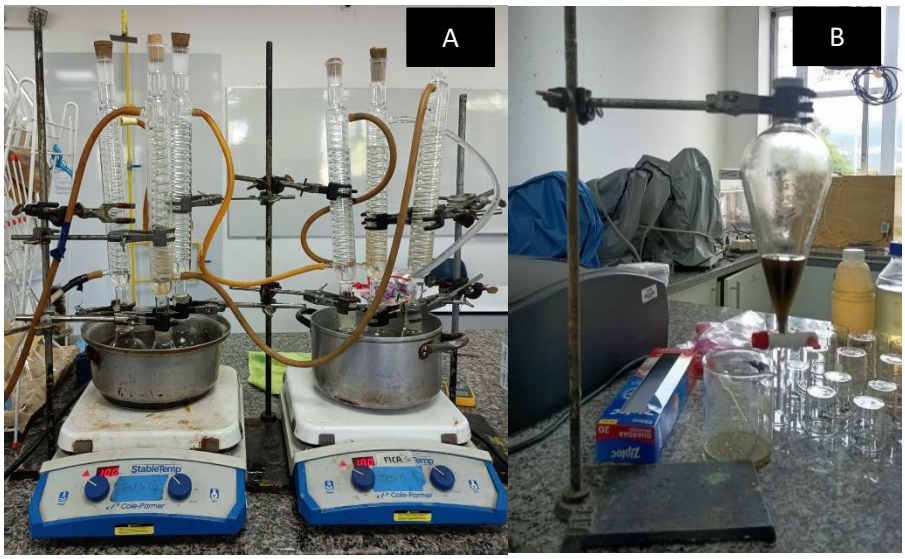


Imagen 9: A: Equipo de reflujo para saponificación de biomasa de consorcio. B: separación de fase acuosa y orgánica después del proceso de extracción

Para calcular el porcentaje de AGL se implementó la ecuación 11, donde T_1 es el peso del frasco vacío, T_2 es el peso del frasco con la muestra y W es la masa inicial usada para realizar el proceso de extracción.

$$\%AGL = \left(\frac{T_2 - T_1}{W}\right) \cdot 100$$

Ecuación 11: porcentaje de ácidos grasos libres

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

Para realizar la extracción de ésteres metílicos a ácidos grasos de estableció tres procesos. Se implementó un catalizador ácido homogéneo = ácido sulfúrico (H_2SO_4) y un catalizador ácido heterogéneo (Resina comercial CT-269DR). En cada reactor de vidrio se agregó un catalizador:solvente:biomasa en una proporción de (1.74:15:1) y (1.1:70:1) para el catalizador homogéneo y catalizador heterogéneo respectivamente (Guatemal Nely, 2023). Los reactores se colocaron en baño térmico utilizando agua y pinzas de vidrio para inhibir la evaporación inmediata. Se mantuvo las condiciones de reacción de temperatura a 90° C y agitación de 900 rpm por cuatro horas. Posteriormente, se filtró con el equipo Millipore y se agregó 1 mL de hexano-dietiléter (80:20) para retirar las impurezas. Finalmente, se separó la fase orgánica de la acuosa en un embudo de decantación y se colocó en envases previamente etiquetados y pesados para ser sometidos a un proceso de secado a 80° C hasta lograr un peso constante.

Se calculó el rendimiento a través de la ecuación 12 utilizada por Guatemal Nely, (2023); donde T_2 hace referencia al peso del envase con la muestra seca, T_1 indica el peso inicial del envase vacío y W es la biomasa seca implementada en la reacción.

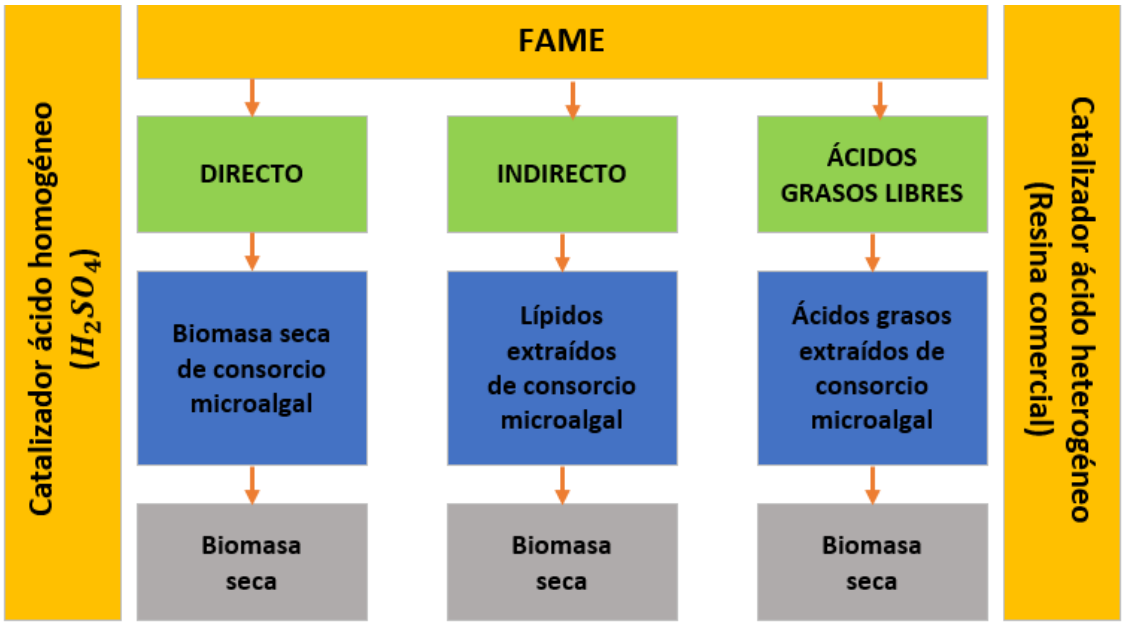


Imagen 10: proceso para la obtención de FAME

$$\%FAME = \left(\frac{T_2 - T_1}{W}\right) \cdot 100$$

Ecuación 12: rendimiento de FAME

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

Para el procedimiento de cromatografía en capa fina se utilizaron placas de gel de 40 mm x 80 mm de 0,2 mm de silica gel. Se trazó una línea de origen con un lápiz de grafito a 1 cm en la base, donde se marcó tres puntos (Imagen 11); el primer punto es el control estándar (oleato de colesterol), el segundo indicó la muestra de luz LED blanca y el tercero la muestra de luz LED azul. También se adicionó una línea de 1 cm al extremo contrario del origen para identificar el frente del disolvente. A partir de los puntos graficados se colocó las placas en la estufa a 100° C por 30 minutos para activarlos. Transcurrido el tiempo, se agregó las muestras disueltas con 5 µL del solvente extractor en cada punto referencial y se dejó reposar la placa sobre la fase móvil del cloroformo puro en un envase de vidrio por 10 min. A continuación, se observó la corrida en la placa

colocada en una cámara de vapores de perlas de yodo por 10 min más. Finalmente, se identificó el factor de retención (R_f) a través de la ecuación 13; donde Y hace referencia a la distancia a partir del punto de origen de corrida de cada muestra y X es la distancia desde el origen hacia el disolvente.

En el proceso de cromatografía en capa fina se utilizó únicamente el mejor solvente extractor de lípidos [cloroformo metanol (2:1)], AGL (metanol), FAME directo (metanol), FAME indirecto (metanol) y FAME a partir de AGL [cloroformo metanol (2:1)].

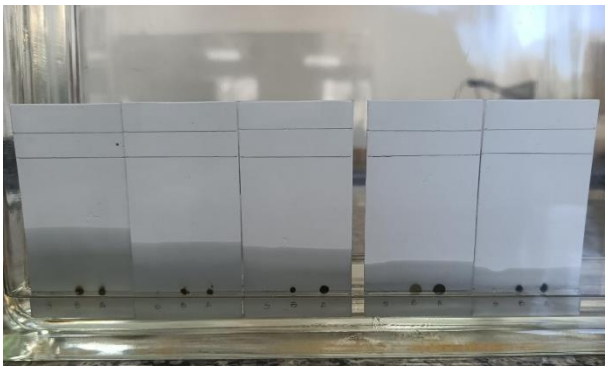


Imagen 11: cromatografía en capa fina

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

Ecuación 13: factor de retención

2.3 Análisis estadísticos de los datos

Los datos obtenidos de los diferentes parámetros de concentración celular, peso seco, remoción de nutriente (NT, PT, COT), porcentaje de lípidos, AGL y FAME, se realizaron por triplicado para ser comparados mediante la prueba Kruskal Wallis con el programa Statgraphics v. 18 y se los ha expresado en valores de desviación estándar (X ± DE). La diferencia significativa se encuentra en un rango de ($p < 0,05$).

3.RESULTADOS

3.1 Caracterización del medio de cultivo

En la tabla 1, se detalla los valores obtenidos de los nutrientes principales que se encuentran presentes en el agua residual de faenamiento avícola en comparación con el medio BBM. Se puede apreciar que el COT presenta una concentración mayor en al agua de faenamiento avícola en los cultivos con luz LED artificial blanca y azul. Por otro lado, también se puede observar que la presencia de nitrógeno y fósforo total se encuentran en una concentración menor respecto al medio BBM.

Tabla 1: Caracterización del agua de faenamiento avícola y medio BBM mediante un análisis fisicoquímico

Parámetro (mg/L)	Agua de faenamiento avícola (luz blanca)	Agua de faenamiento avícola (luz azul)	Medio BBM
COT	130	136,33	39,5
NT	38,33	98,67	67,5
PT	31,02	34,04	125,85

3.2 Determinación del crecimiento celular

3.2.1 Conteo celular

Se graficaron las curvas de crecimiento celular con los valores obtenidos del consorcio microalgal cultivado en agua de faenamiento avícola (Imagen 11). En el consorcio cultivado con luz artificial blanca que la fase exponencial comienza desde el

día cero hasta el día seis aumentando su concentración hasta $2{,}56 \cdot 10^5 \pm 1{,}11 \cdot 10^3$ cel/mL y la fase de muerte celular va desde el día siete al día nueve disminuyendo la concentración celular hasta $2{,}19 \cdot 10^5 \pm 9{,}60 \cdot 10^2$ cel/mL.

Respecto al consorcio cultivado con luz artificial azul podemos observar que la fase exponencial comienza desde el día cero hasta el día ocho aumentando su concentración hasta $8{,}38 \cdot 10^5 \pm 3{,}72 \cdot 10^3$ cel/mL y la fase de muerte celular va desde el día nueve al día 14 disminuyendo la concentración celular hasta $6{,}01 \cdot 10^5 \pm 2{,}70 \cdot 10^3$ cel/mL. De forma general se aprecia un mayor crecimiento celular en la luz azul.

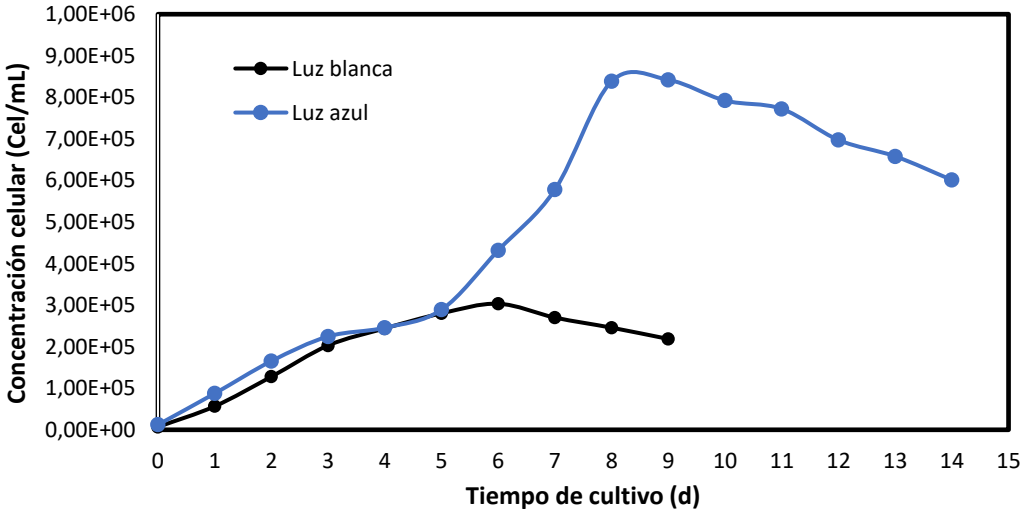


Imagen 12: Concentración celular (cel/mL) respecto al tiempo de cultivo en días de un consorcio conformado por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp., cultivado en agua de faenamiento avícola con luz artificial blanca y azul por 9 y 14 días, respectivamente. En el eje Y se detalla la escala de la concentración celular del consorcio. Los resultados se muestran como el promedio del triplicado con su desviación estándar.

3.2.2 Peso seco

Para identificar el peso seco del consorcio microalgal se realizó las curvas de manera gráfica como se muestra en la Imagen 13. Para la caracterización del peso seco de un consorcio microalgal cultivado con luz artificial blanca, se puede observar que la curva detalla valores diferentes; para el día cero se ha identificado un peso de 0,0031 g/L, a partir del día uno hasta el día ocho las microalgas crecen de manera exponencial llegando a una concentración de 0,0094 g/L y el periodo de decrecimiento va desde el día ocho al día nueve, terminando con una concentración de 0,0079 g/L.

En la caracterización de peso seco del consorcio cultivado con luz artificial azul inicia con un peso de 0,047 g/L, desde el día cinco al día 10 las microalgas crecen de manera exponencial hasta alcanzar un peso de 0,0205 g/L y se aprecia que el decrecimiento va desde el día 11 hasta el día 14 con una concentración final de 0,0115 g/L. En la misma imagen 13 se aprecia una concentración celular mayor para el cultivo en luz LED azul, respecto de su control de luz LED blanca.

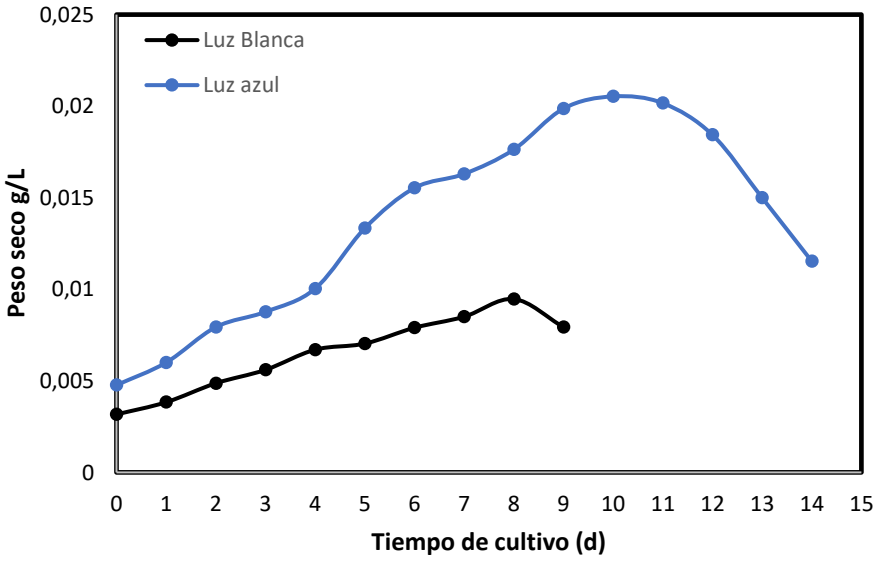


Imagen 13: Peso seco de un consorcio microalgal cultivado en agua de faenamiento avícola

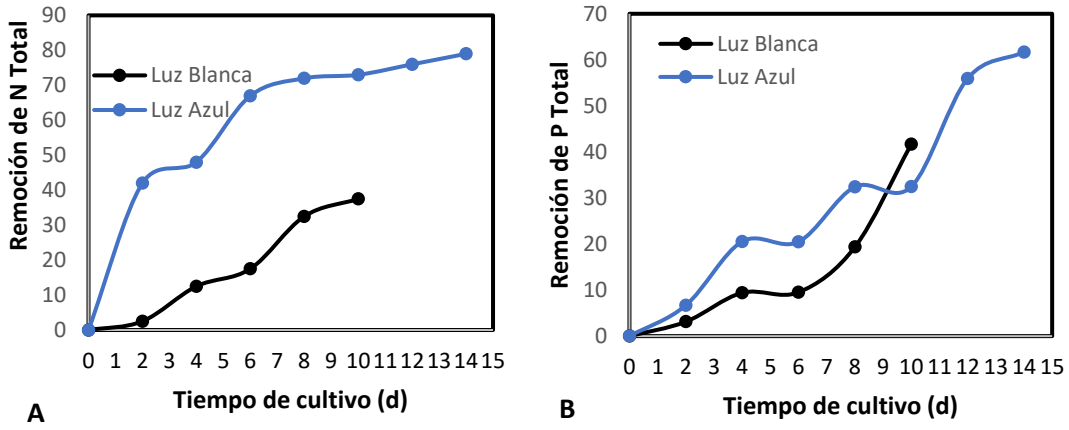
Tabla 2: Biomasa total y productividad de un consorcio microalgal cultivado en agua residual avícola

Parámetro	Consorcio luz blanca	Consorcio luz azul
Biomasa total (g/L)	0,2322	0,1881
Productividad volumétrica (g/L·d)	0,0258	0,0209
Productividad especifica (d^{-1})	0,1111	0,1111
Tasa de crecimiento especifica (μ)	0,2614	0,3231
Tiempo de duplicación	2,6516	2,1453

En la tabla 2 se muestran parámetros de crecimiento como biomasa total, productividad volumétrica, productividad específica, tasa de crecimiento específica y tiempo de duplicación de un consorcio cultivado en aguas residuales de origen avícola en luz artificial blanca y azul. Se puede apreciar que la biomasa total, productividad volumétrica, productividad específica y tasa de crecimiento del consorcio cultivado con luz artificial blanca presenta un mejor rendimiento en comparación al consorcio cultivado en luz artificial azul. Sin embargo, también se puede observar que el tiempo de duplicación del consocio cultivado con luz artificial azul es más eficiente respecto al consorcio cultivado en luz artificial blanca.

3.3 Análisis de parámetros fisicoquímicos y remoción de nutrientes

Los análisis realizados para identificar la concentración de nitrógeno total (NT), fósforo total (PT) y carbono orgánico total (COT) de un consorcio cultivado en agua de faenamiento avícola con luz artificial blanca y azul en un periodo de 9 y 14 días respectivamente, como se muestra en la imagen 14. En la sección A se puede observar que el cultivo en luz artificial blanca presenta una remoción inicial de 38,33 ± 1,53 mg/L NT y una concentración final de 27,67 ± 2,52 mg/L de NT, alcanzando un porcentaje de remoción total de 37,5 %. En el caso del consorcio cultivado en luz artificial azul se ha identificado una remoción inicial de 98,67 ± 3,21 mg/L NT y una concentración final de 19 ± 2 mg/L de NT, alcanzando un porcentaje de remoción total de 79 %.



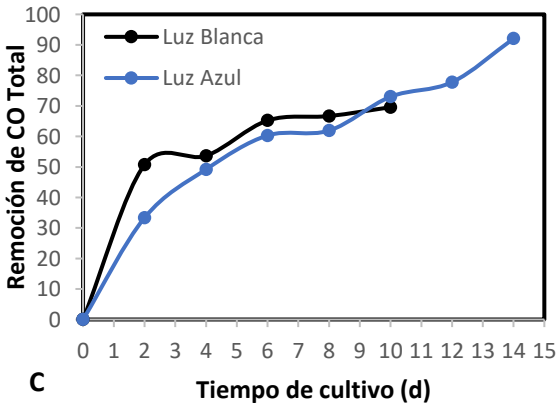


Imagen 14: Porcentaje de remoción de macro nutrientes en el cultivo de un consorcio microalgal conformado por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. En el eje X se muestra el tiempo de cultivo en días, en el eje Y se establece el porcentaje de remoción de nutrientes: sección A: porcentaje de remoción de nitrógeno total, sección B: porcentaje de remoción de fósforo total y en la sección C: porcentaje de remoción de carbono orgánico total. Los valores finales se obtuvieron a partir del promedio de cada triplicado y su respectiva desviación estándar.

En la sección B se detalla el porcentaje de remoción total de fósforo. Para el cultivo de luz artificial blanca presenta una remoción inicial de 31,02 ± 0,01 mg/L PT y una concentración final de 18,04 ± 0,04 mg/L de PT, alcanzando un porcentaje de remoción total de 41,66 %. En el caso del consorcio cultivado en luz artificial azul se ha identificado una remoción inicial de 34,04 ± 0,04 mg/L PT y una concentración final de 13,05 ± 0,01 mg/L de PT, alcanzando un porcentaje de remoción total de 61,68 %.

En la sección C se muestra el porcentaje de remoción del carbono orgánico total. Para el cultivo de luz artificial blanca presenta una remoción inicial de 130 ± 8 mg/L COT y una concentración final de 32,67 ± 11,37 mg/L de COT, alcanzando un porcentaje de remoción total de 69,57 %. En el caso del consorcio cultivado en luz artificial azul se ha identificado una remoción inicial de 136,33 ± 11,06 mg/L COT y una concentración final de 9,67 ± 0,58 mg/L de COT, alcanzando un porcentaje de remoción total de 92,06 %.

Tabla 3: Porcentaje de remoción de NT, PT y COT de un consorcio microalgal cultivado en agua residual de origen avícola

Parámetros fisicoquímicos	**NT (mg/L N)**	**PT (mg/ L PO_4^{-3})**	**COT (mg/L C)**
C_i luz blanca	38,33±1,53	31,02±0,01	130±8
Ci luz azul	98,67±3,21	34,04±0,04	136,33±11,06
C_f luz blanca	27,67±2,52	18,04±0,04	32,67±11,37
C_f luz azul	19±2	13,05±0,01	9,67±0,58
Remoción total (%) luz blanca	37,5	41,66	69,57
Remoción total (%) luz azul	79	61,68	92,06

C_i: concentración inicial, C_f: concentración final

El porcentaje total de remoción para nitrógeno, fósforo y carbono orgánico total se encuentra detallado en la tabla 3. Se puede apreciar que los consorcios microalgales cultivados en agua de faenamiento avícola con luz artificial blanca y azul presentan mayor afinidad de remoción con el COT; a continuación, se observa que la remoción de NT y PT de los consorcios cultivados con luz artificial azul es más eficiente en comparación al consorcio cultivado en luz artificial blanca. Del mismo modo, se puede observar que los metales pesados y otros micronutrientes presentan una remoción considerable (tabla 4). Se puede apreciar la remoción en el cultivo con luz LED artificial blanca para calcio, hierro, potasio, sodio un porcentaje del 88,95 %, 99,55 %, 11,22 %, y 99 %, respectivamente; para el cultivo de luz LED azul se puede observar una remoción de calcio, hierro y potasio con 36,09 %, 99,38 % y 92,27 %, respectivamente. Cabe recalcar que la turbidez ha disminuido considerablemente, tomando en cuenta que su valor inicial es de 73 NTU para cultivo con luz artificial blanca y azul, logrando alcanzar una remoción de 77,81 % y 85,62 %, respectivamente.

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

Parámetros fisicoquímicos (mg/L)	**C_i luz blanca y luz azul**	**C_f Luz blanca**	**C_f Luz azul**	**Remoción total (%) luz blanca**	**Remoción total (%) luz azul**
Calcio	2,10±0,13	2,32±0,03	7,75±0,07	88,95	63,09
Cobre	0,0050±0,0003	0,019±0,001	0,019±0,001	-	-
Cromo	<0,02 LD	<0,01 LD	<0,01 LD	*	*
Hierro	1,60±0,10	0,081±0,005	0,10±0,01	99,5	99,38
Molibdeno	<0,1 LD	<0,1 LD	<0,1 LD	*	*
Nitrógeno amoniacal	117,25	<0,3 LC	<0,3 LC	*	*
Níquel	<0,05 LC	<0,05 LC	<0,05 LC	*	*
Plomo	<0,004 LD	<0,004 LD	<0,004 LD	*	*
Potasio	56,20±4,10	63,30±4,39	43,53±3,02	-	-
Sodio	78,55±5,73	62,70±1,13	34,88±0,63	99	-
Turbidez (NTU)	73	16,2	10,5	77,81	85,62
DQO	200,36±7,49	117,7±4,4	73,4±4,4	99,94	99,96

C_i: concentración inicial, C_f: concentración final, LD: límite de detección, LC: límite de cuantificación * Valores fuera de rango. – Sin remoción

En la Demanda Química de Oxígeno se aprecia una remoción superior al 99 % para los dos cultivos. Y, respecto al cromo, molibdeno, nitrógeno amoniacal, níquel y plomo no fue posible obtener un porcentaje de remoción puesto que, las concentraciones presentes estuvieron fuera del rango posible de medición.

3.4 Extracción de lípidos totales

En la imagen 15 se muestra los porcentajes de los lípidos totales extraídos al ser expuestos a seis solventes extractores diferentes con propiedades orgánicas. Se puede apreciar que el cloroformo metanol (2:1) es el mejor solvente extractor para el consorcio cultivado con luz artificial blanca al presentar un porcentaje de 54,90 %, seguido del cloroformo metanol (1:2) el cual presenta una extracción de 28,55 % y metanol puro con un 22,17 %. En el consorcio cultivado con luz azul se puede observar que el mejor solvente extractor es el metanol puro con un porcentaje de 18,90 %, seguido del cloroformo metanol (1:2) con 18,42 % y finalmente el cloroformo:metanol (2:1) con una extracción de lípidos total de 13,21 %. De forma general se aprecia una mejor extracción de lípidos en el cultivo control con luz LED blanca, pudiendo inferir que no hay mejoras en el contenido de lípidos con la aplicación de luz LED de color azul.

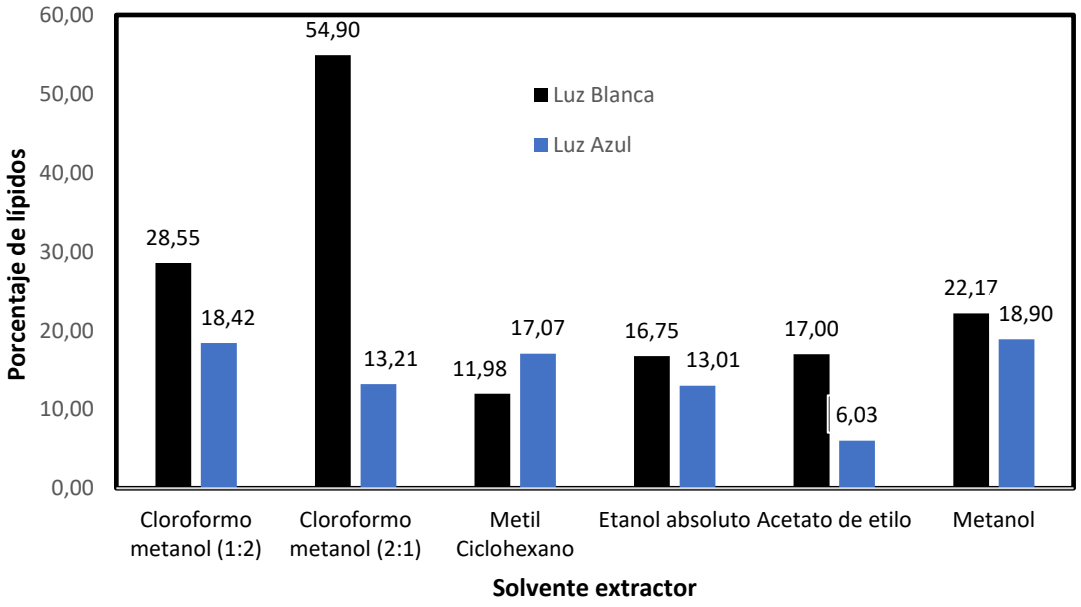


Imagen 15: Porcentaje de lípidos extraídos de un consorcio cultivado en agua de faenamiento avícola con luz artificial blanca y azul con seis solventes extractores. Los valores finales se obtuvieron a partir del promedio de cada triplicado y su respectiva desviación estándar.

3.5 Extracción de ácidos grasos libres (AGL)

En el proceso de extracción de ácidos grasos libres (AGL), se puede observar en la Imagen 16 que los tres mejores solventes extractores para el consorcio microalgal cultivado en agua de faenamiento avícola con luz artificial blanca son: metanol puro con 52,84 %, seguido del solvente etanol absoluto con 35,99 % y cloroformo metanol con 28,92 % de AGL. Por otro lado, los tres mejores solventes para el cultivo microalgal con luz artificial azul son: etanol absoluto con 58,31 %, seguido de metanol puro con 42,58 % y acetato de etilo con un 15,50 % de AGL. De forma general se aprecia una mejor extracción de AGL en el cultivo control con luz LED blanca, con la excepción del etanol absoluto, pudiendo inferir que no hay mejoras en el contenido de lípidos con la aplicación de luz LED azul.

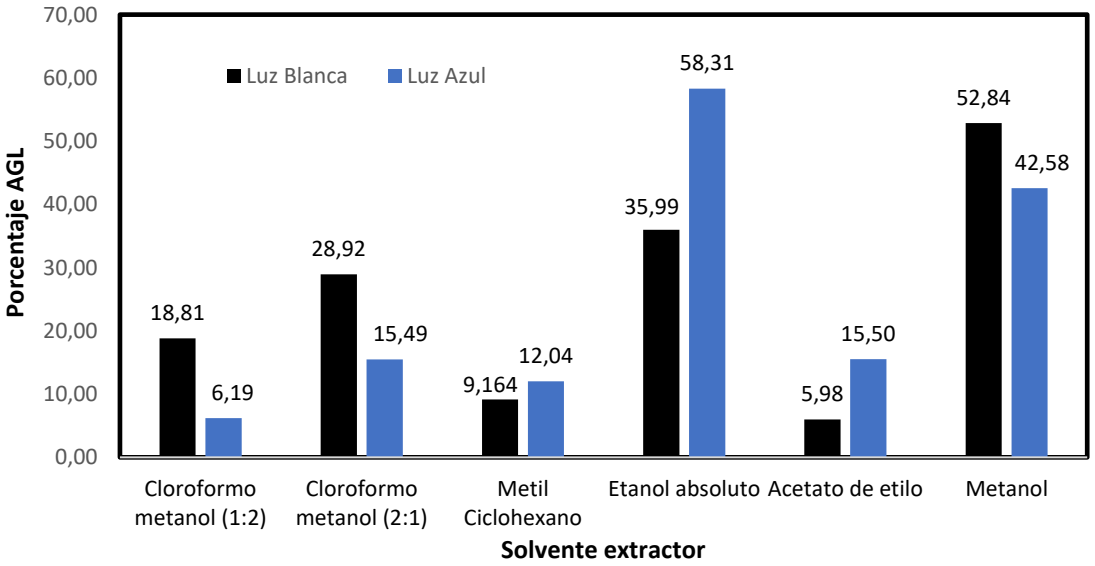


Imagen 16: Porcentaje de extracción de Ácidos Grases Libres (AGL) de un consorcio cultivado en agua de faenamiento avícola con 6 solventes extractores. Los valores finales se obtuvieron a partir del promedio de cada triplicado y su respectiva desviación estándar.

3.6 Extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

En la extracción de FAME directo con biomasa para luz blanca con el catalizador homogéneo se obtuvo 46,35 % y con ácido heterogéneo 35,79 %, en luz artificial azul se obtuvo 59,14 % con ácido heterogéneo y 78,64 % con ácido homogéneo (Imagen 17). Para la extracción de FAME indirecto se logró identificar que en luz artificial blanca el mejor solvente extractor es el cloroformo:metanol (2:1) con un 59,22 % para acido heterogéneo y 59,22 % para ácido homogéneo; en luz artificial azul presentó con un porcentaje de 35,06 % para acido homogéneo y 16,27 % para ácido heterogéneo. A continuación, el segundo mejor solvente extractor es el cloroformo metanol (1:2), en luz blanca presenta un porcentaje de 44,41 % para acido homogéneo 24,88 % para ácido heterogéneo; en luz azul presenta un porcentaje de 38,96 % para acido homogéneo y 30,24 % para ácido heterogéneo. El tercer y último solvente es el metanol, en luz blanca presenta un porcentaje de 18,78 % para ácido

heterogéneo y 37,23 % para ácido homogéneo; en luz azul presenta un porcentaje de 42,13 % para acido homogéneo y 26,55 % para ácido heterogéneo (Imagen 18). Para extracción de FAME a partir de AGL se logró identificar que en luz artificial blanca el mejor solvente extractor es el metanol con un 52,79 % para acido homogéneo y 31,57 % para ácido homogéneo; en luz artificial azul presentó con un porcentaje de 41,70 % para acido homogéneo y 19,04 % para ácido heterogéneo. A continuación, el segundo mejor solvente extractor es el cloroformo metanol (1:2), en luz blanca presenta un porcentaje de 50,50 % para acido homogéneo 24,38 % para ácido heterogéneo; en luz azul presenta un porcentaje de 38,78 % para acido homogéneo y 15,40 % para ácido heterogéneo. El tercer y último solvente es el cloroformo:metanol (2:1), en luz blanca presenta un porcentaje de 23,65 % para ácido heterogéneo y 44,40 % para ácido homogéneo; en luz azul presenta un porcentaje de 36,79 % para acido homogéneo y 10,09 % para ácido heterogéneo (Imagen 19). Cabe recalcar que para la obtención de FAME a partir de biomasa seca, lípidos y AGL se utilizó los tres mejores solventes para ser comparados entre sí.

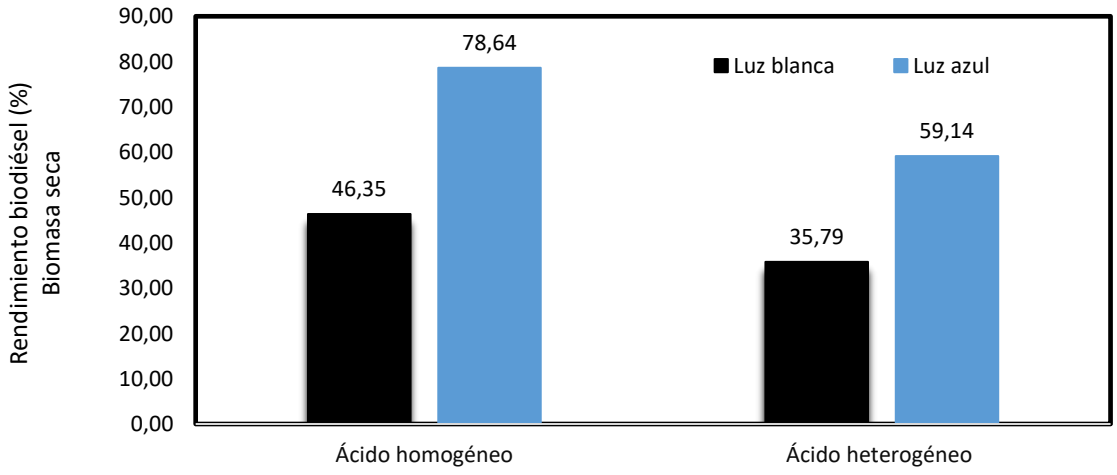


Imagen 17: porcentaje de esteres metílicos de ácidos grasos (FAME) a partir de un proceso directo (biomasa seca). Los valores finales son el resultado obtenido del promedio de sus triplicados a partir de su desviación estándar.

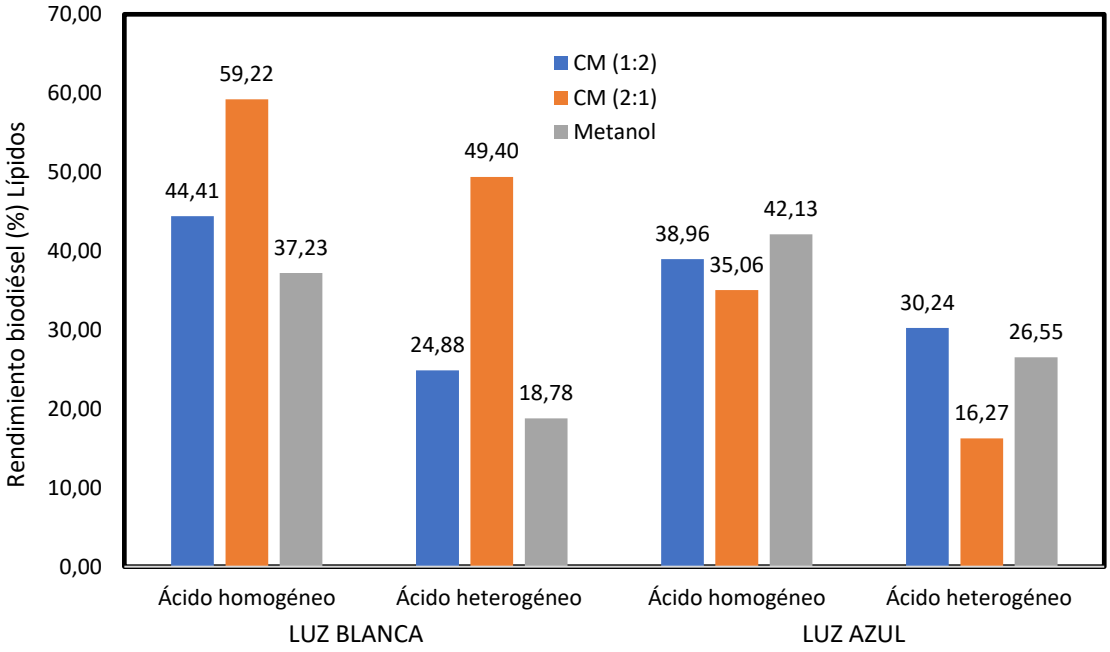


Imagen 18: porcentaje de esteres metílicos de ácidos grasos (FAME) a partir de un proceso indirecto (lípidos). Los valores finales son el resultado obtenido del promedio de sus triplicados a partir de su desviación estándar.

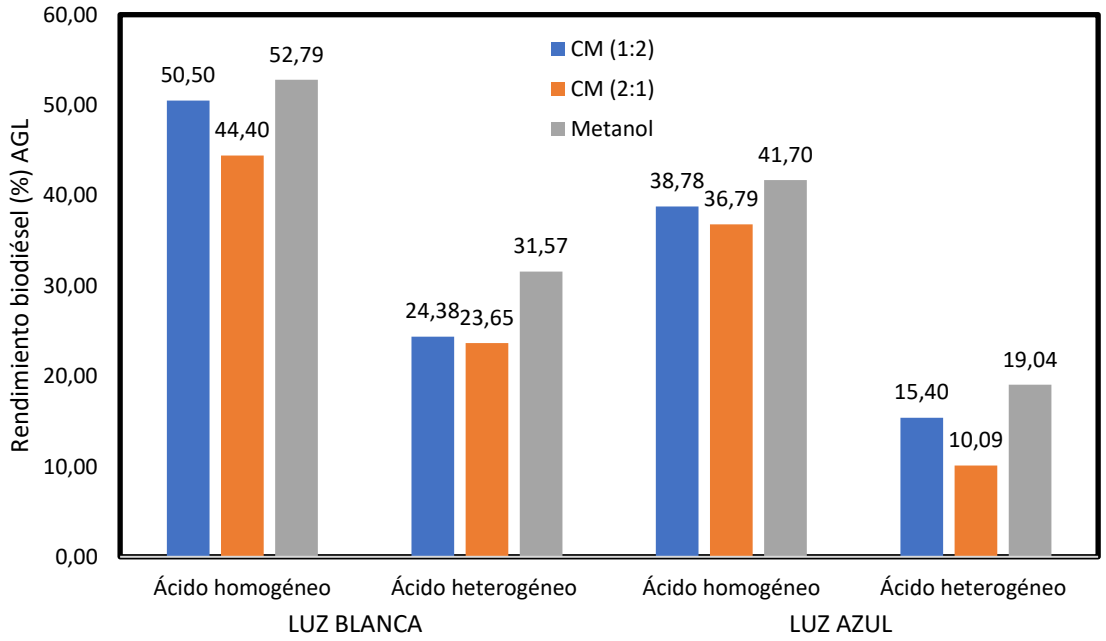


Imagen 19: porcentaje de esteres metílicos de ácidos grasos (FAME) a partir de AGL (ácidos grasos libres). Los valores finales son el resultado obtenido del promedio de sus triplicados a partir de su desviación estándar.

3.7 Cromatografía de capa fina (Thin laver chromatography-TLC)

Se observó en las placas de gel de sílice con cloroformo puro (Imagen 20) que las muestras colocadas recorrieron distancias diferentes. En la sección A se identificó que la muestra de luz azul a partir de lípidos presenta un factor de retención más alto, en la sección B la muestra obtenida a partir de AGL en luz blanca indica un factor de retención mayor, en la sección C en la placa de FAME directo la muestra de luz azul presentó un mejor recorrido, en la sección D en la placa de FAME indirecto la muestra con luz azul presenta un recorrido más largo y, en la sección E se observó que la muestra obtenida en luz azul a partir de AGL presenta un factor de retención mayor. Los valores obtenidos se detallan en la tabla 5 y para su caracterización de realizó una comparación a partir de bibliografía que incluye el factor de retención (R_F) de cada muestra.

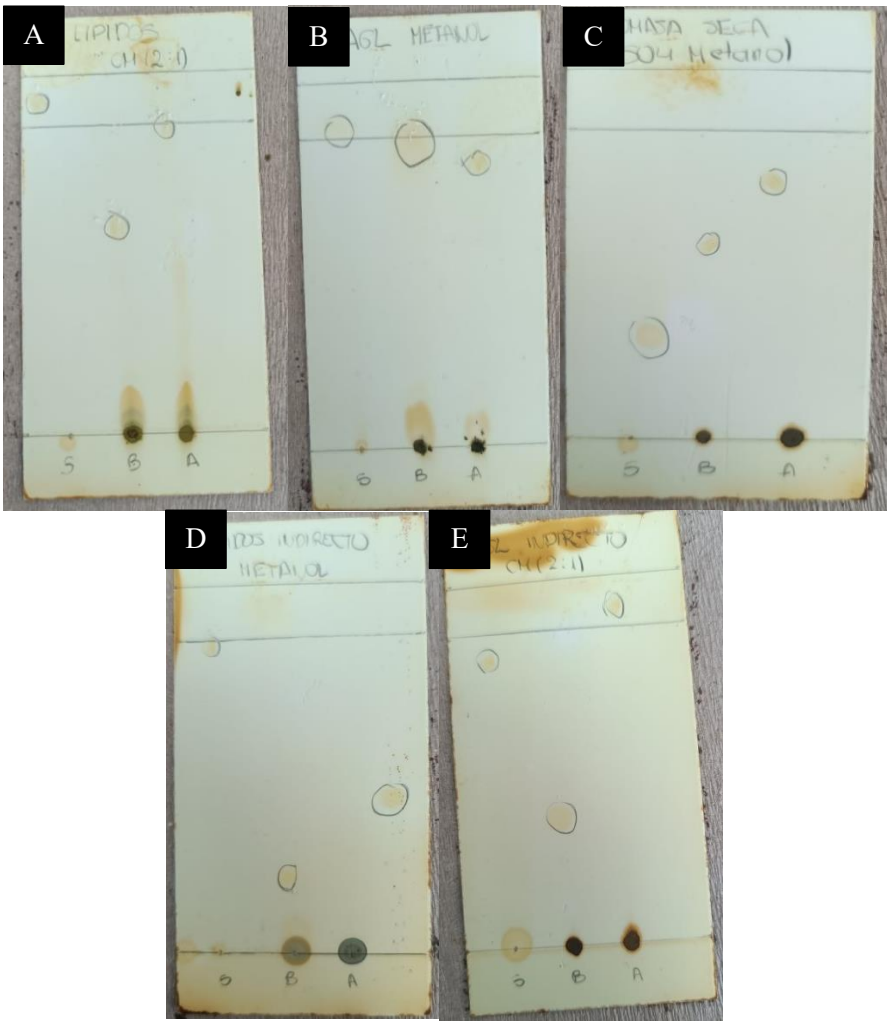


Imagen 20: Sección A: TLC a partir de lípidos. Sección B: TLC a partir de AGL. Sección: C TLC de FAME directo, Sección D: TLC de FAME indirecto. Sección E: FAME a partir de AGL.

Tabla 5: Factor de retención de lípidos, AGL y FAME obtenido de un consorcio microalgal cultivado en agua residual de origen avícola.

Muestra	Y (cm)	X (cm)	R_F
Estándar para lípidos	5,5	6	0,9
Luz blanca	3,5	6	0,6
Luz azul	5	6	0,8

Estándar para AGL	5,2	6	0,9
Luz blanca	5	6	0,8
Luz azul	4,5	6	0,8
Estándar para FAME - Directo	2	6	0,3
Luz blanca	3,2	6	0,5
Luz azul	4,4	6	0,7
Estándar para FAME - Indirecto	3	6	0,5
Luz blanca	1,5	6	0,3
Luz azul	2,5	6	0,4
Estándar para FAME - AGL	4,5	6	0,8
Luz blanca	2,2	6	0,4
Luz azul	1,5	6	0,3

Rf: factor de retención. Y: distancia total. X: distancia recorrida por la muestra.

4.DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para lograr conseguir un crecimiento óptimo en un cultivo de microalgas, generalmente se requiere componentes esenciales como: energía lumínica, CO_2, un sustrato con carbono, nitrógeno, fósforo (Hernández-Pérez & Labbé, 2014), finalmente también se requiere la presencia de aceptores y donadores de electrones (Chia et al., 2018). Referente a los nutrientes, en la tabla 1 se puede apreciar los valores de los macronutrientes presentes en agua residual de origen avícola, utilizada como sustrato para

el crecimiento de un consorcio microalgal (Amaral et al., 2023). Al realizar un análisis fisicoquímico se puede observar la presencia de nutrientes óptimos para obtener un crecimiento óptimo de microalgas. Se puede observar que el valor de carbono orgánico total es relativamente mayor a diferencia de los valores obtenidos para nitrógeno y fósforo total. Según Viegas et al., (2021), se podría considerar como un medio de cultivo apto para un crecimiento óptimo de un consorcio microalgal.

Crecimiento celular

En el proceso de determinación de crecimiento celular (Imagen 11), se identificó que la concentración microalgal del consorcio cultivado con luz artificial blanca es relativamente mayor en comparación con el cultivo microalgal cultivado con luz artificial azul. En la tabla 2 se realizó una comparación de ciertos parámetros de crecimiento celular. Se puede observar que la biomasa total y la productividad volumétrica del consorcio cultivado con luz artificial blanca es mayor a los datos obtenidos para el consorcio cultivado con luz artificial azul. Sin embargo, la tasa de crecimiento específica y el tiempo de duplicación del cultivo con luz artificial azul es mayor presentando una duplicación en 2,15 días a diferencia de los datos obtenidos para el cultivo con luz artificial blanca, el cual presenta una duplicación de 2,65 días. Citando a Ruiz-Marin et al., (2020), señala que el acondicionamiento de luz LED de tonos cálidos como el color azul o purpura en cultivos de microalgas inducen de manera más eficiente el bioproceso de la fotosíntesis dando como resultado en su investigación un tiempo de duplicación de 2,4 días, valores similares tomando en cuenta que los fotobiorreactores fueron acondicionados con variables semejantes entre sí.

En el apartado de peso seco (Imagen 13), se puede observar una fase de adaptación, crecimiento exponencial, latencia y muerte celular, donde la mayor

concentración de peso seco para el cultivo con luz LED azul es de 0,021 g/L y en el cultivo de luz artificial blanca es de 0,009 g/L. Ruiz-Marin et al., (2020) reporta que la mayor concentración de un cultivo con luz artificial azul es de 0,04 g/L y para cultivos microalgales con luz blanca es de 0,0012 g/L, valores un tanto similares con la diferencia del tiempo de cultivo ya que, Ruiz-Marin et al., (2020) cultivo el consorcio microalgal de *C. vulgaris* y *S. obliquus* por nueve días para cada luz y en el presente trabajo de investigación el consorcio de microalgas con luz LED blanca se cultivó por 12 días y el consorcio microalgal con luz LED azul se cultivó por 14 días.

Remoción de nutrientes

En la imagen 14 sección A y B se muestra los porcentajes de remoción de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT) del consorcio microalgal en agua de faenamiento avícola acondicionado con luz artificial blanca y azul, cultivados por un periodo de 9 y 14 días respectivamente. Se observa una remoción más elevada para nitrógeno y fósforo total del consorcio cultivado con luz artificial azul, alcanzando un 79 % para (NT) y 61,68 % para (PT). En la investigación de Ferreira et al., (2018), podemos identificar que el porcentaje de remoción en un cultivo de *Scenedesmus* sp., en agua de faenamiento avícola para nitrógeno es de 95 % y fósforo es de 63 %, podemos deducir que la presencia de la especie *Scenedesmus* sp., en un cultivo microalgal garantiza la remoción de nitrógeno seguido de fósforo.

Referente a la remoción de carbono orgánico total (COT), se puede observar en Imagen 14, sección C que el consorcio cultivado en agua de faenamiento avícola acondicionado con luz artificial azul presenta un 92,06 %. Terán Hilares et al., (2021) menciona que, la remoción de carbono orgánico total en un cultivo de *Chlorella vulgaris*

en agua de faenamiento avícola es de 83 %. Se puede asumir que un consorcio microalgal es más eficiente en el proceso de captura de carbono.

Adicionalmente, se realizó un análisis fisicoquímico del agua residual de origen avícola para identificar la remoción total de metales pesados como se puede observar en la tabla 4. Se puede observar la presencia de remoción considerable de calcio de 88,95 % en el cultivo de luz LED blanca y 63,09 % en el cultivo de luz LED azul. En la investigación de (Wang et al., 2016), señala que en un cultivo microalgal en aguas residuales conformado por *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp., ha logrado obtener una remoción máxima del 83,7 %, afirmando que la presencia de calcio (Ca) en un sustrato microalgal que contribuye en la formación de paredes celulares mejorando la rigidez y estructura para la obtención de una biomasa productiva. El porcentaje de remoción de hierro (Fe) es superior al 99 %, Blanco-Vieites et al., (2022) reporta una remoción de 97,5 % de hierro en un consorcio de *T. obliquus, C. vulgaris* y *C. sorokiniana máxima* cultivadas en aguas residuales quienes analizan que, la remoción de hierro en un cultivo microalgal contribuye al desarrollo del metabolismo celular y da lugar al crecimiento microalgal ya que induce a la síntesis de los principales componentes celares de este tipo de microorganismos. En el caso del sodio (Na) de logró una remoción del 99 % en el cultivo acondicionado con luz LED blanca, porcentaje parecido al de (Figler et al., 2019) con un porcentaje de remoción de 99,68 % de sodio obtenido en un consorcio de *Chlorella* spp. y *Chlorococcum* sp., se aprecia un alto porcentaje de remoción ya que el sodio actúa como un activador de enzimas e induce a la producción de biomasa microalgal con un alto porcentaje lipídico y presencia de FAME (Polat et al., 2020).

En la turbidez se logró una eliminación de 77,81 % y 85,62 % en los cultivos de luz LED blanca y azul, respectivamente. En el estudio de Leite & Daniel, (2020), logró una eliminación de 98,1 % de turbidez en un cultivo de *Chlorella sorokiniana* de aguas

residuales, afirmando la eficiencia de la producción de microalgas para realizar procedimientos de biorremediación en aguas residuales.

En la Demanda Química de Oxígeno se puede observar que ha disminuido más del 99 % para los dos cultivos considerando una presencia relativamente alta de concentración inicial. Hernández-Pérez & Labbé, (2014), señala que las microalgas en consorcio hacen uso de varios compuestos orgánicos, además del CO_2 para logran un mejor rendimiento en su reproducción.

La remoción de metales pesados en general, presenta una remoción alta en comparación a la concentración inicial.

Se realizó una comparación de los valores finales de remoción en el agua residual de origen avícola donde, el consorcio con los valores de Límite Máximo de Descarga en un Cuerpo de Agua Dulce (Anexo 1), según La Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua. Se identificó que el DQO ha superado una concentración de 100,36 mg/L al valor límite que permite la normativa; es decir, 100 mg/L (Normas del Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), 2016); sin embargo, la concentración final del cultivo con luz LED blanca presenta un valor de 117,7 mg/L y el cultivo con luz LED azul presenta un valor de 73,4 mg/L.

Extracción de lípidos

Citando a Dhanker et al., (2023), señala que la biomasa total de un cultivo microalgal sea apto para la producción de biocombustibles debe presentar un porcentaje mayor al 30 % de presencia de lípidos totales, obteniendo en su investigación un 70 % de lípidos totales del cultivo en aguas residuales con *C. vulgaris*, En la presente investigación se aplica el método de Folch implementado por Chen et al., (2020) para la obtención de lípidos con el solvente extractor cloroformo:metanol (2:1) en el cultivo microalgal

acondicionado con luz LED blanca, donde se obtuvo como resultado de 54,90 % de lípidos totales presentes. Comparando con los resultados de Dhanker et al., (2023), los valores no son cercanos; sin embargo, superan el porcentaje mínimo de lípidos totales presentes es biomasa microalgal para ser considerada materia prima en la producción de biocombustibles.

Para el consorcio cultivado con luz artificial azul el mejor solvente extractor es el metanol puro al presentar un resultado de 18,90 % de lípidos totales. Wetterwald et al., (2023) señala que, el metanol puro como solvente extractor permite conservar las características iniciales de las biomoléculas de la especie y también contribuye a una mejor selectividad en conjunto con la disminución de afecciones ambientales y costes energéticos. Obteniendo como resultado en su investigación un 20 % de lípidos totales en un cultivo con *Chlorella vulgaris.*

Extracción de ácidos grasos libres

En el proceso de extracción de AGL se detalla el porcentaje total obtenido de ácidos grasos libres al implementar seis solventes extractores diferente, los cuales son: cloroformo:metanol (1:2), cloroformo:metanol (2:1), metilciclohexano, etanol absoluto, acetato de etilo y metanol puro, como se muestra en la imagen 16. Se puede observar que el mejor solvente extractor para el consorcio cultivado en agua de faenamiento avícola acondicionado con luz artificial blanca es el metanol puro con un 52,84 % de AGL totales. (Moreno Martínez et al., 2022), señala que el uso de solventes extractores orgánicos como el metanol en presencia de un catalizador homogéneo le ha permitido obtener una recuperación del 52,52 % de AGL totales, al ser resultados cercanos podemos asumir que la biomasa microalgal tiene un alto contenido lípido lo cual permite una recuperación considerable de los ácidos grasos libres presentes.

Por otro lado, también se puede identificar que le mejor solvente extractor para el consorcio microalgal cultivado con luz artificial azul es el etanol absoluto con un 58,31 % de AGL totales. En la investigación de Moreno Martínez et al., (2022), indica que al implementar el etanol como solvente extractor le ha permitido recuperar el 49,70 % de ácidos grasos libres presentes en biomasa microalgal de *Nannochloropsis Gaditana* cultivada en agua residual.

Extracción de ésteres metílicos

En base a los resultados obtenidos de la extracción de esteres metílicos producidos a partir de un consorcio microalgal, determinó que presentaron un mejor rendimiento con el catalizador homogéneo (H_2SO_4) en comparación al catalizador heterogéneo (resina CT-269DR). En la investigación de Mat Yasin et al., (2023) sugiere que, para la producción de FAME se debe implementar el uso de catalizadores, solventes extractores y biomasa para poder producir una fuente innovadora de energía, la cual puede reemplazar combustibles fósiles al inducir un proceso de transesterificación *in situ*. En la presente investigación se determinó que el mejor solvente extractor para obtener un alto porcentaje de producción de FAME en el cultivo de luz artificial blanca es el cloroformo:metanol (2:1) al presentar un porcentaje de 59,22 % y para cultivos con luz artificial azul se identificó que el mejor solvente extractor es el metanol con un 42,13 %. En un cultivo de *Nannochloropsis Gaditana* en aguas residuales realizado por Moreno Martínez et al., (2022) informa que el uso de cloroformo:metanol (2:1) como solvente orgánico le ha permitido recuperar el 175,5 % de ésteres metílicos y con el solvente orgánico metanol puro le permitió una recuperación de 54,7 % de esteres metílicos. Tomando en cuenta los resultados obtenidos por Moreno Martínez et al., (2022) y los resultados de la presente

investigación podemos apreciar que la presencia de lípidos en la biomasa microalgal ha permitido una transesterificación que dar lugar a una conversión en ésteres metílicos.

Cromatografía de capa fina (Thin laver chrimatography-TLC)

En el proceso de cromatografía de capa fina (Thin Laver Chrimatography o TLC), se incluyó hexano (80:20) para identificar el factor de retención de cada muestra y, de manera general se determinó que las muestras de luz azul presentan un factor de retención mayor a la luz blanca. Cabe recalcar que tanto las muestras de luz blanca y luz azul en TCL de lípidos, AGL, FAME directo, FAME indirecto y FAME a partir de AGL presentaron un recorrido relevante para poder obtener su respectivo factor de retención. Según Pannkuk et al., (2013) señala que, la adición de hexano (80:20) en procedimientos de TCL para lípidos, AGL o FAME garantiza la presencia visible de un recorrido de cada muestra requerida y poder determinar su factor de retención.

Para TCL de lípidos se obtuvo un factor de retención de 0,6 y 0,8 para luz blanca y luz azul respectivamente, en el caso de TCL a partir de AGL el recorrido fue de 0,8 tanto para luz blanca y luz azul, en TCL de FAME directo de obtuvo un factor de retención de 0,5 en luz blanca y 0,7 en luz azul, en TCL de FAME indirecto se determinó un factor de retención de 0,3 y 0,4 para luz blanca y luz azul y para FAME a partir de AGL se determinó 0,4 como factor de retención para luz blanca y 0,3 para luz azul. En la investigación de Eibler et al., (2017) realiza el procedimiento de TCL en *Ursus maritimus* logrando determinar un R_f de 0,0 para fosfolípidos, R_f de 0,07 – 0,09 para AGL y un R_f de 0,42 – 0,46 para FAME, en base a los resultados obtenidos y comparados con los resultados de Eibler et al., (2017) podemos confirmar cualitativamente la presencia de lípidos, AGL y FAME en los cultivos de luz artificial blanca y luz artificial azul.

5.CONCLUSIONES

En el presente estudio de investigación se logró comprobar que un consorcio microalgal conformado por las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp., puede adaptarse y crecer en agua residual de origen avícola acondicionado con luz LED blanca y azul.

Se determinó que el contenido de nutrientes originales del agua residual es suficiente para lograr la obtención de biomasa.

Los consorcios microalgales acondicionados con luz LED blanca y luz LED azul presentaron un porcentaje de remoción de nutrientes alto durante los 12 días y 14 días de cultivo, respectivamente; demostrando así que los consorcios tienen un alto potencial para realizar tratamiento de aguas residuales.

La extracción de lípidos presentó un porcentaje mayor al 50%, en presencia de los solventes extractores cloroformo:metanol (2:1) y metanol en el procedimiento de biomasa seca. Sin embargo, en la extracción de AGL logró un rendimiento superior al 58 % y FAME se logró un rendimiento superior al 59%. Se concluye que el medio de cultivo y el acondicionamiento con luz LED garantiza un mayor rendimiento en la producción de grasas con potencial para la producción de biocombustibles a partir de microalgas.

6.RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar análisis fisicoquímicos con nuevas fuentes de aguas residuales que se caractericen por la presencia de nutrientes y acondicionado con variables ideales para lograr un adecuado crecimiento de microalgas y además crear nuevas propuestas de biorremediación de aguas residuales.

Es recomendable realizar distintos métodos de biorremediación en el cultivo, como someter a ciertas condiciones de estrés lumínico, pero manteniendo una fuente de aireación para evitar la tasa de cizallamiento.

En base a la bibliografía, se recomienda manipular el sustrato del medio de cultivo aumentado la concentración de Hierro y disminuyendo la presencia de nitrógeno para lograr un mejor rendimiento lipídico.

Se recomienda realizar análisis con solventes eutécticos como: cloruro de colina, ácido acético, ácido cítrico o glucosa para realizar procesos de obtención de lípidos y lograr una menor contaminación ambiental como la que se ha producido al implementar solventes extractores volátiles utilizados en la presente investigación.

Se recomienda realizar un análisis lipídico de los FAMEs obtenidos para ratificar cuantitativamente la conversión a ésteres metílicos de ácidos grasos característicos del biodiesel y poder detallar si el consorcio microalgal tiene un potencial adecuado para la producción de biocombustibles.

7.RECONOCIMIENTO

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

ANEXOS

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

REVISION DEL ANEXO 1 DEL LIBRO VI DEL TEXTO UNIFICADO DE LEGISLACION 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
Cadmino	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 cloroformo 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 Kjedahl	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

BIBLIOGRAFÍA

Abdullah, B., Syed Muhammad, S. A. F., 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*, 37–50. https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.018

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

Ali, S. S., Mastropetros, S. G., Schagerl, M., Sakarika, M., Elsamahy, T., El-Sheekh, M., Sun, J., & Kornaros, M. (2022). Recent advances in wastewater microalgae-based biofuels production: A state-of-the-art review. *Energy Reports*, *8*, 13253–13280. https://doi.org/10.1016/j.egyr.2022.09.143

Amaral, E. T., Bender, L. B. Y. C., Rizzetti, T. M., & Schneider, R. de C. de S. (2023). Removal of organic contaminants in water bodies or wastewater by microalgae of the genus Chlorella: A review. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, *8*, 100476. https://doi.org/10.1016/j.cscee.2023.100476

Blanco-Vieites, M., Suárez-Montes, D., Delgado, F., Álvarez-Gil, M., Battez, A. H., & Rodríguez, E. (2022). Removal of heavy metals and hydrocarbons by microalgae from wastewater in the steel industry. *Algal Research*, *64*, 102700–102706. https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102700

Carneiro, G. A., Silva, J. J. R., Oliveira, G. de A., & Pio, F. P. B. (2018). Uso de Microalgas para Produção de Biodiesel. *Research, Society and Development*, *7*(5), e1075181. https://doi.org/10.17648/rsd-v7i5.250

Chen, W., Liu, Y., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2020). Automated accelerated solvent extraction method for total lipid analysis of microalgae. *Algal Research*, *51*, 102080. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102080

Chia, S. R., Chew, K. W., Show, P. L., Yap, Y. J., Ong, H. C., Ling, T. C., & Chang, J.-S. (2018). Analysis of Economic and Environmental Aspects of Microalgae Biorefinery for Biofuels Production: A Review. *Biotechnology Journal*, 1700618. https://doi.org/10.1002/biot.201700618

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), e04213. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04213

Daliry S, Hallajisani A, Mohammadi J, Nouri H, & Golzary A. (2017). Investigation of optimal condition for Chlorella vulgaris microalgae growth. *Global Journal of Environmental Science and Management*, *3*(2), 217–230.

de Souza, D. S., Lomeu, A., de Oliveira Moreira, O. B., de Oliveira, M. A. L., & Mendonça, H. V. de. (2023). New methods to increase microalgae biomass in anaerobic cattle wastewater and the effects on lipids production. *Biomass and Bioenergy*, *176*, 106915–106920. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106915

Dejoye Tanzi, C., Abert Vian, M., & Chemat, F. (2013). 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

Dhanker, R., Khatana, K., Verma, K., Singh, A., Heena, Kumar, R., & Mohamed, H. I. (2023). An integrated approach of algae-bacteria mediated treatment of industries generated wastewater: Optimal recycling of water and safe way of resource recovery. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *54*, 102936–102938. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102936

Eibler, D., Krüger, S., Skírnisson, K., & Vetter, W. (2017). Combined thin layer chromatography and gas chromatography with mass spectrometric analysis of lipid classes and fatty acids in malnourished polar bears (Ursus maritimus) which swam to Iceland. *Journal of Chromatography B*, *1046*, 138–146. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.043

Escobar, K. F., Bonilla, J. O., & Chaparro, A. R. (2018). Extracción de aceite a partir de microalgas obtenidas de la laguna El Estanco, en San Andrés de sotavento - Colombia. *KnE Engineering*, *3*(1), 11. https://doi.org/10.18502/keg.v3i1.1408

Faife E, Alvarez A, & Otero M. (2021). Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energia renovable parte I: Levaduras y bacterias. *ICIDCA*, *46*(1), 22–32.

Ferreira, A., Marques, P., Ribeiro, B., Assemany, P., de Mendonça, H. V., Barata, A., Oliveira, A. C., Reis, A., Pinheiro, H. M., & Gouveia, L. (2018). Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research*, *164*, 32–38. https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.007

Figler, A., B-Béres, V., Dobronoki, D., Márton, K., Nagy, S. A., & Bácsi, I. (2019). Salt Tolerance and Desalination Abilities of Nine Common Green Microalgae Isolates. *Water*, *11*(12), 2527–2536. https://doi.org/10.3390/w11122527

Foteinis, S., Chatzisymeon, E., Litinas, A., & Tsoutsos, T. (2020). Used-cooking-oil biodiesel: Life cycle assessment and comparison with first- and third-generation biofuel. *Renewable Energy*, *153*, 588–600. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.022

Gebremedhin, M., Mishra, S., & Mohanty, K. (2018). Augmentation of native microalgae based biofuel production through statistical optimization of campus sewage wastewater as low-cost growth media. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *6*(5), 6623–6632. https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.08.061

Guatemal Nely. (2023). *Obtención de lípidos a partir de biomasa de consorcio de microalgas cultivada en agua residual de origen acuícola*.

Hasan, H. A., Muhamad, M. H., Ji, B., Nazairi, N. A., Jiat, K. W., Sim, S. I. S. W. A., & Poh, A. F. M. S. (2023). Revolutionizing wastewater treatment with microalgae: Unveiling resource recovery, mechanisms, challenges, and future possibilities. *Ecological Engineering*, *197*, 107117. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2023.107117

Hasson, O., & Wishkerman, A. (2022). CultureLED: A 3D printer-based LED illumination cultivation system for multi-well culture plates. *HardwareX*, *12*, e00323. https://doi.org/10.1016/j.ohx.2022.e00323

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

Ibadurrohman, I. A., Hamidi, N., & Yuliati, L. (2022). The role of the unsaturation degree on the droplet combustion characteristics of fatty acid methyl ester. *Alexandria Engineering Journal*, *61*(3), 2046–2060. 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), 36. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x

Leite, L. de S., & Daniel, L. A. (2020). Optimization of microalgae harvesting by sedimentation induced by high pH. *Water Science and Technology*, *82*(6), 1227–1236. https://doi.org/10.2166/wst.2020.106

Li, B., & Haneklaus, N. (2021). The role of renewable energy, fossil fuel consumption, urbanization and economic growth on CO2 emissions in China. *Energy Reports*, *7*, 783–791. https://doi.org/10.1016/j.egyr.2021.09.194

Marchão, L., Fernandes, J. R., Sampaio, A., Peres, J. A., Tavares, P. B., & Lucas, M. S. (2021). Microalgae and immobilized TiO2/UV-A LEDs as a sustainable alternative for winery wastewater treatment. *Water Research*, *203*, 117464. https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117464

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

Mat Yasin, N. H., Mohd Yusop, M. A., Awang Kechik, N. A. A., & Zahuri, A. Z. (2023). Composition of fatty acid methyl ester in microalgae Chlorella vulgaris: Comparison between various methods of harvesting, extraction and transesterification. *Materials Today: Proceedings*, 2014–2068. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.04.317

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., & Thrän, D. (2018). Relative Greenhouse Gas Abatement Cost Competitiveness of Biofuels in Germany. *Energies*, *11*(3), 615. https://doi.org/10.3390/en11030615

Moreno Martínez, P., Ortiz-Martínez, V. M., Sánchez Segado, S., Salar-García, M. J., los Ríos, A. P. de, Hernández Fernández, F. J., Lozano-Blanco, L. J., & Godínez, C. (2022). Deep eutectic solvents for the extraction of fatty acids from microalgae biomass: Recovery of omega-3 eicosapentaenoic acid. *Separation and Purification Technology*, *300*, 121844–121845. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121842

Normas del Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2016). *Ley de Gestión Ambiental y del Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental*.

Pannkuk, E. L., Risch, T. S., & Savary, B. J. (2013). Profiling the Triacylglyceride Contents in Bat Integumentary Lipids by Preparative Thin Layer Chromatography and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Visualized Experiments*, *79*, 465–472. https://doi.org/10.3791/50757

Parveen, A., Bhatnagar, P., Gautam, P., Bisht, B., Nanda, M., Kumar, S., Vlaskin, M. S., & Kumar, V. (2023). Enhancing the bio-prospective of microalgae by different light systems and photoperiods. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *22*(11), 2687–2698. https://doi.org/10.1007/s43630-023-00471-9

Polat, E., Yüksel, E., & Altınbaş, M. (2020). Mutual effect of sodium and magnesium on the cultivation of microalgae Auxenochlorella protothecoides. *Biomass and Bioenergy*, *132*, 105441–105447. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105441

Priya, A. K., Jalil, A. A., Vadivel, S., Dutta, K., Rajendran, S., Fujii, M., & Soto-Moscoso, M. (2022). Heavy metal remediation from wastewater using microalgae: Recent advances and future trends. *Chemosphere*, *305*, 135375. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135375

Purba, L. D. A., Susanti, H., Admirasari, R., Praharyawan, S., Taufikurahman, & Iwamoto, K. (2024). Bibliometric insights into microalgae cultivation in wastewater: Trends and future prospects for biolipid production and environmental sustainability. *Journal of Environmental Management*, *352*, 120104–120107. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120104

Rame, R., Purwanto, P., & Sudarno, S. (2023). Sustainable energy harnessing: Microalgae as a potential biofuel source and carbon sequestration solution. *Renewable Energy Focus*, *47*, 100498. https://doi.org/10.1016/j.ref.2023.100498

Ruiz-Marin, A., Canedo-López, Y., & Chávez-Fuentes, P. (2020). Biohydrogen production by Chlorella vulgaris and Scenedesmus obliquus immobilized cultivated in artificial wastewater under different light quality. *AMB Express*, *10*(1), 191. https://doi.org/10.1186/s13568-020-01129-w

Sánchez-Bayo, A., López-Chicharro, 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

Shokravi, H., Heidarrezaei, M., Shokravi, Z., Ong, H. C., Lau, W. J., Din, M. F. M., & Ismail, A. F. (2022). Fourth generation biofuel from genetically modified algal biomass for bioeconomic development. *Journal of Biotechnology*, *360*, 23–36. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.10.010

Sobolewska, E., Borowski, S., & Nowicka-Krawczyk, P. (2023). Effect of solar and artificial lighting on microalgae cultivation and treatment of liquid digestate. *Journal of Environmental Management*, *344*, 118445. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118445

Song, Y., Xie, L., Zhang, X., Hu, Z., Li, S., Zhang, P., & Yang, X. (2024). Enhancement of biomass, lipid accumulation, and carbon sequestration potential in microalgae via cultivation with Aggregation-Induced emission Light-Conversion films. *Chemical Engineering Journal*, *483*, 149148. https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.149148

Terán Hilares, R., Garcia Bustos, K. A., Sanchez Vera, F. P., Colina Andrade, G. J., & Pacheco Tanaka, D. A. (2021). Acid precipitation followed by microalgae (Chlorella vulgaris) cultivation as a new approach for poultry slaughterhouse wastewater treatment. *Bioresource Technology*, *335*, 125284–125289. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125284

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

Viegas, C., Gouveia, L., & Gonçalves, M. (2021). Evaluation of microalgae as bioremediation agent for poultry effluent and biostimulant for germination. *Environmental Technology & Innovation*, *24*, 102050–102054. https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102048

Wang, X.-X., Wu, Y.-H., Zhang, T.-Y., Xu, X.-Q., Dao, G.-H., & Hu, H.-Y. (2016). Simultaneous nitrogen, phosphorous, and hardness removal from reverse osmosis concentrate by microalgae cultivation. *Water Research*, *94*, 215–224. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.062

Wetterwald, L., Leybros, A., Fleury, G., Delrue, F., Dimitriades-Lemaire, A., Chambonniere, P., & Hertz, A. (2023). Supercritical CO2 extraction of neutral lipids from dry and wet Chlorella vulgaris NIES 227 microalgae for biodiesel production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *11*(5), 110630–110631. https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110628

Yan, C., Muñoz, R., Zhu, L., & Wang, Y. (2016). The effects of various LED (light emitting diode) lighting strategies on simultaneous biogas upgrading and biogas

slurry nutrient reduction by using of microalgae Chlorella sp. *Energy*, *106*, 554–561. https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.03.033

You, X., Yang, L., Zhou, X., & Zhang, Y. (2022). Sustainability and carbon neutrality trends for microalgae-based wastewater treatment: A review. *Environmental Research*, *209*, 112860. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112860

Zhang, W., Zhao, C., Liu, J., Sun, S., Zhao, Y., & Wei, J. (2021). Effects of exogenous GR24 on biogas upgrading and nutrient removal by co-culturing microalgae with fungi under mixed LED light wavelengths. *Chemosphere*, *281*, 130791. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130791

Zhao, Q., Han, F., You, Z., Huang, Y., & She, X. (2023). Evaluation of the relationship of wastewater treatment and biodiesel production by microalgae cultivated in the photobioreactor. *Fuel*, *350*, 128750. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.128750