



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO
AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL**

Elaborado por:

MARCELO JAVIER OLEAS RECALDE

Director del proyecto:

PhD. Johanna Medrano Barboza

Como requisito para la obtención del título de:

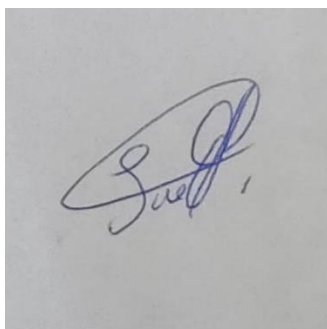
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, junio del 2024

DECLARATORIA JURAMENTADA

Yo, MARCELO JAVIER OLEAS RECALDE, con cédula de identidad # 1724814957, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo.

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature is stylized and appears to read 'Marcelo J. Oleas Recalde'.

FIRMA

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL
DE *Chlorella Vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO
AVÍCOLA CON LUZ ARTIFICIAL”**

Realizado por:

MARCELO JAVIER OLEAS RECALDE

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por la profesora

PhD. JOHANNA MEDRANO BARBOZA

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

PhD. KATY CORAL CARRILLO

PhD. MIGUEL MARTÍNEZ FRESNEDA-MESTRE

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

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

Energías, Ambiente y Biotecnología

Perteneciente a la Facultad de Arquitectura e Ingenierías

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres que me han apoyado a que pueda cumplir esta meta y
nunca me dejaron solo.

A mi familia que siempre me apoyo con palabras de aliento y que no me rindiera.

A mis amigos en especial a Thaís Flor por su ayuda constante.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Johanna Medrano por ser mi tutora de tesis, por su apoyo incondicional y por nunca dejar que me rindiera. A Katty Coral por recibirme en la universidad y a Estefy Tisalema por su apoyo en los laboratorios.

A Carlos Almeida por su ayuda durante la carrera en el ámbito laboral.

Para someter a:

To be submitted:

Marcelo Javier Oleas Recalde ¹, Johanna Medrano Barboza^{2*},

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL
DE *Chrorella Vulgaris* CULTIVADA EN AGUA DE FAENAMIENTO AVÍCOLA
Y LUZ ARTIFICIAL”**

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud

²Universidad Internacional SEK, Facultad de Arquitectura e Ingenierías

Quito, Ecuador.

Julio de 2024

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

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Arquitectura e Ingenierías

Quito, Ecuador.

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

RESUMEN

Las microalgas como *Chlorella vulgaris* son microorganismos fotosintéticos con alto contenido lipídico que tienen la capacidad de crecer y eliminar nutrientes simultáneamente en aguas residuales. En esta investigación, la especie *Chlorella vulgaris* fue inoculada en agua residual de faenamiento avícola esterilizada utilizando fotoperiodos de 19 h luz y 5 h oscuridad. La luz utilizada fue artificial LED blanca (control) y azul, los cultivos se realizaron en fotobiorreactores constituidos por peceras comerciales. Se llevaron a cabo mediciones del crecimiento celular donde se obtuvieron valores de 0,392 g/L y 0,361 g/L de biomasa para las luces de colores blanca y azul, respectivamente. Los resultados de la extracción de lípidos demuestran que se encontró el máximo contenido de lípidos totales con luz azul (18,93 %) con solvente cloroformo:metanol (2:1). Respecto de la extracción ácidos grasos libres (AGL) el mayor porcentaje obtenido fue 16,82 % con etanol para luz blanca y 21,37 % con metanol para luz azul. En los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) indirecto, se obtuvo una extracción de 97,60 % en luz azul con uso de un catalizador homogéneo (ácido sulfúrico).

Adicionalmente, esta especie puede ser utilizada en procesos de biorremediación debido a su capacidad de remoción de nutrientes y metales. En este estudio se logró una remoción en términos de Nitrógeno Total (32,14 % para la luz blanca y 74,19 % para la luz azul, respectivamente), Fósforo Total (27,23 % y 11,98 %) y Carbono Orgánico Total (64,10 % y 67,74 %). Referente a los metales se obtuvo una remoción de hierro (92,5 % luz blanca y 95,31 % para luz azul) y sodio (64,6 % para luz blanca y 47,95 % para luz azul). La eliminación de estos nutrientes y metales después de la inoculación lograron los niveles permisibles para descarga en alcantarillado público según la normativa de calidad ambiental y de descarga de efluentes en el Ecuador.

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*, faenamiento avícola, remoción de nutrientes, AGL, lípidos, FAME, luz azul, luz blanca

ABSTRACT

Microalgae such as *Chlorella vulgaris* are photosynthetic microorganisms with high lipid content that can grow and remove nutrients simultaneously in wastewater. In this research, *Chlorella vulgaris* was inoculated in sterilized poultry slaughter wastewater using photoperiods of 19 h of light and five h of darkness. The light used was artificial white (control) and blue LEDs mounted in commercial fish tanks as photobioreactors. Cell growth measurements were carried out where values of 0,392 g/L and 0,361 g/L of biomass were obtained for the white and blue colored lights, respectively. The results of lipid extraction show that the maximum content of total lipids was found under blue light (18,93 %) with the solvent chloroform: methanol (2:1). Regarding the extraction of free fatty acids (FFA), the highest percentage obtained was 16,82 % with ethanol for white light and 21,37 % with methanol for blue light. In indirect fatty acid methyl esters (FAME), an extraction of 97,60 % in blue light was obtained using a homogeneous catalyst (sulfuric acid).

Additionally, this species can be used in bioremediation processes due to its capacity to remove nutrients and metals. In this study, a removal was achieved in terms of Total Nitrogen (32,14 % for white light and 74,19 % for blue light, respectively), Total Phosphorus (27,23 % and 11,98 %), and Organic Carbon Total (64,10 % and 67,74 %). Regarding metals, a removal of iron (92,5 % white light and 95,31 % blue light) and sodium (64,6 % white light and 47,95 % blue light). Eliminating these nutrients and metals after inoculation achieved the permissible levels for discharge into public sewage according to Ecuador's environmental quality and effluent discharge regulations.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, poultry slaughter, nutrient removal, FFA, lipids, FAME, blue light, white light

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. METODOLOGÍA	13
2.1 Sitios de estudio	13
2.1.1 Recolección de agua residual.....	13
2.2 Metodología	14
2.2.1 Fase de campo.....	14
2.2.2 Fase de laboratorio.....	15
3. RESULTADOS.....	24
3.1 Determinación del crecimiento celular.....	24
3.2 Peso seco	25
3.3 Análisis de parámetros fisicoquímicos y remoción de nutrientes	27
3.4 Extracción de Lípidos	31
3.5 Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)	33
3.7 Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography-TLC)	36
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
Crecimiento celular	40
Remoción de Nutrientes.....	42
Extracción de lípidos.....	44
Extracción de AGL	46
Extracción FAME	46
Cromatografía en capa fina (TLC).....	47
5. CONCLUSIONES.....	48
6. RECOMENDACIONES.....	49
7. RECONOCIMIENTOS	49
8. ANEXOS	51
9. BIBLIOGRAFÍA.....	53

1. INTRODUCCIÓN

Debido al agotamiento de las fuentes de energía no renovables, existe la necesidad de reemplazar los combustibles fósiles en el entorno actual. Según estimaciones recientes, la mayoría de las reservas de petróleo convencional se agotarán en 2050 como resultado del uso insostenible del petróleo y el creciente consumo de energía. Se cree que los biorrecursos satisfacen las necesidades energéticas del mundo moderno. (Davoodbasha et al., 2021).

En los últimos años se ha visto un enorme aumento en el interés por las microalgas debido a su composición de biomasa y su rápido crecimiento en comparación con plantas más grandes. Son capaces de producir biomasa con una composición compleja que puede ser controlada por el entorno de cultivo. Por ejemplo, la producción de ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos (carotenoides o clorofilas), proteínas, enzimas antioxidantes, exopolisacáridos, polialcoholes u otros compuestos bioactivos diversos, cuyo contenido se puede aumentar ajustando la irradiancia incidente, los ciclos de luz y oscuridad, la temperatura de cultivo, o la concentración de nutrientes específicos (Davoodbasha et al., 2021). Proporcionan bienes económicos con valor añadido, como biocombustibles, así como bienes de alto valor en los campos de la acuicultura, la cosmética, la nutrición y la salud humana y animal, etc. (Davoodbasha et al., 2021).

Los productos como el biodiesel y el bioetanol son ejemplos de nuevas fuentes renovables de biocombustibles que los especialistas están buscando en respuesta al agotamiento de los suministros de petróleo y la creciente demanda de ellos. Es fundamental enfatizar que los biocombustibles no representan una respuesta perfecta a los problemas energéticos, ambientales y económicos que enfrenta el mundo, sin

embargo, son una fuente de energía diferente que puede complementar a las convencionales en el corto plazo y tienen muchas perspectivas interesantes a largo plazo. La primera gran pregunta es ¿cómo cambiarán con el tiempo los combustibles fósiles, que actualmente constituyen la base de la economía global? (Ramos et al., 2016).

Debido a su rápido desarrollo y a la falta de competencia por las tierras cultivables o los recursos hídricos, se cree que las microalgas son un buen sustituto de los cultivos convencionales como biocombustible (Valdés Santiago et al., 2018). Existen diversas fuentes de biomasa que pueden utilizarse para la producción de biocombustibles. En la actualidad, se está debatiendo ampliamente su viabilidad como una prometedora fuente de energía alternativa debido a las múltiples ventajas que ofrecen, como lo mencionan; Brar et al, (2021) en su trabajo "Información sobre los enfoques de ingeniería genética y metabólica para mejorar la competencia de las microalgas como recurso de biocombustible: una revisión" y Peter et al, (2021) en su revisión "Microalgas para biocombustibles, tratamiento de aguas residuales y vigilancia ambiental".

Dependiendo de la materia prima utilizada, los biocombustibles se agrupan comúnmente en cuatro generaciones principales (Toalombo-Vargas et al., 2022).

- Primera generación: Se puede incluir biomasa comestible como el maíz, la soja y el girasol en la producción de biocombustibles. Sin embargo, el uso de biomasa comestible plantea ciertas preocupaciones, ya que requiere grandes cantidades de fertilizantes, agua y extensiones de tierra que podrían competir con los cultivos destinados a la alimentación humana. Este tema ha generado un debate conocido como "alimento versus combustible", donde se discute el equilibrio entre la producción de biocombustibles y la disponibilidad de alimentos.

- Segunda generación: la biomasa lignocelulósica no comestible, como la paja de arroz, la paja de trigo, el aserrín y los desechos municipales, es considerada como una opción importante para la producción de biocombustibles debido a su abundancia. Sin embargo, hay desafíos asociados con su utilización. Estos desechos contienen lignina y presentan una estructura recalcitrante, lo cual dificulta el acceso a la celulosa y la hemicelulosa, que son los componentes deseados. Por lo tanto, se requiere un pretratamiento para descomponer la lignina y mejorar la accesibilidad de los componentes de interés. Sin embargo, este pretratamiento puede ser energéticamente intensivo, consumir mucho tiempo y ser costoso.
- Tercera generación: la producción de biocombustibles de tercera generación ha centrado su atención en las algas de tipo salvaje.
- Cuarta generación: En la actualidad, se está debatiendo el uso de microalgas genéticamente modificadas como materia prima para la producción de biocombustibles de cuarta generación.

La necesidad de energía en una sociedad de rápido crecimiento ya no puede ser satisfecha únicamente con combustible fósil por lo que, estos solo pueden ser sustituidos por biocombustible que pueden ser producidos por la tercera y cuarta generación.

Debido a su capacidad para generar cantidades significativas de triacilglicerol (20-50 % en peso de células secas), que son el material básico del biodiesel, las microalgas han desempeñado un papel fundamental en la fabricación de biodiesel (Kim et al., 2010). Además, señalan que los carbohidratos incluidos en la biomasa se pueden convertir en bioalcoholes como menciona Kim et al. (2010). Por último, se puede utilizar un proceso de digestión anaeróbica para producir biogás a partir de la biomasa sobrante.

Para crecer, las microalgas necesitan agua, luz, CO₂, fósforo, nitrógeno y una variedad de micronutrientes. Se sabe que las aguas residuales urbanas tienen un alto contenido de nitrógeno y fósforo, por lo que el cultivo de microalgas en ellas permitiría la eliminación de estos contaminantes asimilándolos en la biomasa de microalgas. Más del 64 % del nitrógeno utilizado en total se recicla como biomasa en *C. vulgaris* (He et al., 2013).

Debido a que pueden descomponer sus nutrientes para la biorremediación, las microalgas son organismos que pueden prosperar en una variedad de condiciones acuáticas, incluidas las aguas residuales. Estas aguas contienen muchos nutrientes que pueden ser aprovechados por las microalgas, con esto evitamos el uso de agua potable y el requerimiento de nutrientes adicionales (Medrano Barboza & Guasumba Anchundia, 2022).

Se estima que existen 300.000 especies distintas de microalgas en el mundo, de las cuales sólo se han descrito unas 40.000. Las microalgas son una colección variada de microorganismos unicelulares. En este grupo se incluyen los procariotas o cianobacterias y las especies de microalgas eucariotas que pueden crecer en una variedad de condiciones. La mayoría son fotoautótrofos, lo que significa que su fuente de carbono es el CO₂ y su fuente de energía es la luz (Lewandowski et al., 2018).

Para esta investigación se ha elegido la microalga verde unicelular *Chlorella vulgaris* con el fin de examinar su crecimiento y capacidad de obtención de lípidos. Es un protista fotosintético ampliamente reconocido que se incluye en la siguiente categoría científica: el dominio de Eukaryota incluye el reino Protista, división *Chlorophyta*, clase *Trebouxiophyceae*, orden *Chlorellales*, familia *Chlorellaceae* y género *Chlorella* (Céspedes Bernal, 2019). Crece rápidamente y es muy prometedor para el tratamiento de aguas

residuales. *C. vulgaris* es capaz de digerir eficazmente el nitrógeno y el fosfato contenidos en las aguas residuales y puede soportar las duras condiciones ambientales que allí se encuentran (Pittman et al., 2011).

Su morfología es la de una célula esférica con un diámetro de 2 a 10 μm que alberga los cloroplastos de los pigmentos fotosintetizadores verdes clorofila a y clorofila b (Navinta Huashuayo, 2019). Las aplicaciones de las especies de *Chlorella* incluyen aditivos alimentarios, cosméticos, biocombustibles, nutrición y salud humana y animal (Santos Montes et al., 2014). Por ejemplo, *Chlorella* sp. ha demostrado una buena capacidad de producción de carotenoides, de gran valor comercial y con numerosos usos en la industria alimentaria, farmacéutica, nutracéutica, sanitaria y cosmética (Rajesh et al., 2017).

Debido a que las microalgas tienen un alto contenido de aceite y pueden cultivarse mediante métodos económicos, son cruciales para la fabricación de biodiesel (Baldev et al., 2021). En comparación con otras materias primas para biocombustibles, las microalgas son materias primas prometedoras con una serie de ventajas. La capacidad de crecer en aguas residuales, salobres, y tener mayor rendimiento de aceite por acre de cultivos de microalgas y menor necesidad de agua en comparación con los cultivos terrestres, así como menores emisiones de CO_2 (un kilogramo de biomasa de algas seca secuestra alrededor de 1,8 kg de CO_2) son beneficios notables (Baldev et al., 2021).

En el proceso tradicional de producción de biodiesel a partir de microalgas intervienen varios procesos, incluido el cultivo, la cosecha, el secado, la extracción de aceite y la transesterificación del aceite para producir biodiesel. Los triglicéridos y el metanol

reaccionan en presencia de un catalizador para formar biodiesel y glicerol (Chi et al., 2019).

Existen factores que afectan al cultivo de microalgas como son:

- Luz: es la principal limitación y está asociada con un diseño de fotobiorreactor eficaz (Sutherland et al., 2015). La disponibilidad de luz para las células se ve afectada por la concentración celular, lo que reduce significativamente la penetración de la luz en el cultivo y da como resultado un uso deficiente de la luz en la sombra (Park and Lee, 2001). En ausencia de limitación nutricional, la fotosíntesis aumenta al aumentar la intensidad de la luz, alcanzando la saturación lumínica cuando se alcanza la tasa de crecimiento específica máxima de cada especie. Más allá de esto, se llega al punto de fotoinhibición (cuando la concentración de CO₂ es menor que la de oxígeno), lo que provoca efectos perjudiciales sobre las células e incluso puede provocar su muerte. En última instancia, esto conduce a una disminución en la producción de cultivos y la eficiencia fotosintética (Hernández Pérez and Labbé, 2014). Para evitarlo, las microalgas deben estar en un entorno propicio para su crecimiento, lo que requiere que el medio de cultivo tenga una cantidad suficiente de CO₂ y una eliminación eficaz del oxígeno disuelto (Romero Villegas, 2018). Existen estudios que sustentan que la microalga *Chlorella vulgaris* presenta mejor crecimiento bajo la exposición a luz LED azul y fotoperiodos de 24 horas constante (Atta et al., 2013) (Lysenko et al., 2021).
- Temperatura: el rango de temperatura ideal para el crecimiento de la microalga *Chlorella* es entre 18 y 30 °C. La especie crece más lentamente a temperaturas

inferiores a 16°C y puede morir a temperaturas superiores a 35°C. Las algas dependientes de la temperatura producen más biomasa cuando alcanza la temperatura ideal para cada especie. Por encima de este punto, la fotorrespiración reduce la producción total mientras que la respiración aumenta. Se pueden utilizar intercambiadores de calor para regular la temperatura en un sistema de cultivo cerrado; sin embargo, la evaporación es el único método disponible en un sistema de cultivo abierto para reducir la temperatura del cultivo (Barona Altamirano, 2014) (Lysenko et al., 2021).

- pH: por su papel para asegurar la disponibilidad y solubilidad del CO₂ y otros nutrientes, es crucial para los cultivos (Romero Villegas, 2018). La disponibilidad de fuentes de carbono inorgánico está determinada principalmente por la alteración de este componente. Numerosos elementos, incluida la producción de algas, la respiración, la alcalinidad y el contenido iónico del medio de cultivo, así como la actividad microbiana autótrofa y heterótrofa, afectan el pH del cultivo. En definitiva, la efectividad del sistema de adición de CO₂ determina el pH del cultivo (Hernández Pérez y Labbé, 2014).

Cada especie tiene un rango de pH preferido para su crecimiento; *C. vulgaris* prefiere un rango de pH de 6 a 8 (Naderi et al., 2015). En este punto o por debajo de él se produce una reducción de la productividad, lo que afecta tanto al crecimiento de las algas como a la capacidad de los sistemas de tratamiento de agua para eliminar nitrógeno (Park et al., 2011). Al designar el pH ideal como punto de ajuste, un sistema automatizado de inyección de CO₂ puede regular el pH según sea necesario (Lysenko et al., 2021).

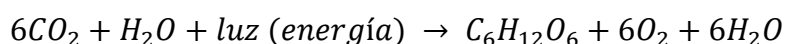
- Nutrientes: Para que la biomasa crezca, debe estar disponible una variedad de nutrientes. Al ser parte integrante de la estructura celular, los macronutrientes (N, P, C, H, S...) son necesarios en mayores proporciones. Los micronutrientes, como el hierro, el magnesio y el cobre, son sustancias que el organismo necesita en pequeñas cantidades y se encuentran típicamente en enzimas (Rodríguez González y Serrano Luna, 2012). El carbono es el nutriente más importante para las microalgas, seguido del nitrógeno, que puede añadirse como amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-). Numerosas funciones biológicas, incluida la síntesis de ácidos nucleicos y la transferencia de energía, dependen del fósforo. Además, está presente en moléculas estructurales como los fosfolípidos y en importantes intermediarios metabólicos (Lysenko et al., 2021).

C. vulgaris es capaz de digerir eficazmente el nitrógeno y el fosfato contenidos en las aguas residuales y puede soportar las duras condiciones ambientales que allí se encuentran (Pittman et al., 2011).

Dado que el fitoplancton marino genera más de la mitad del oxígeno de la atmósfera, se puede decir que la fotosíntesis que realizan las microalgas es una operación muy importante a nivel ambiental. La radiación activa en la fotosíntesis, o PAR (Photosynthetically Active Radiation), con longitudes de onda entre 400 y 700 nm es la que emplean las microalgas. NADPH y ATP son las moléculas que almacenan la energía química que se produce durante la fotosíntesis, que transforma la energía luminosa absorbida en energía que puede utilizarse para el crecimiento y desarrollo celular. Una reacción redox que se ve favorecida por la energía luminosa y da como resultado la conversión de agua y CO_2 en oxígeno y carbohidratos se conoce como fotosíntesis

oxigénica como se puede apreciar en la ecuación (1). A continuación, podemos determinar el vínculo entre el CO₂ fijado, el O₂ liberado y la glucosa creada utilizando la estequiometría de la fotosíntesis oxigénica (Gamarra Santos, 2019).

(1)



Los fotobiorreactores pueden funcionar de diversas formas. En el cultivo por lotes, el fotobiorreactor se llena con el medio de cultivo y el inóculo de microalgas y se deja evolucionar durante un período de tiempo predeterminado. Se recolecta la biomasa o biomoléculas de interés, se limpia el reactor y se inicia una nueva operación cuando la concentración alcanza su valor máximo. Aunque esta disposición confiere al reactor una mayor versatilidad, existen intervalos muertos entre cada carga, lo que reduce la producción en su conjunto.

Cuando se utiliza cultivo semicontinuo, se extrae una parte del volumen del reactor y se reemplaza con medio de cultivo nuevo. Como no hay tiempo de inactividad entre cargas, se puede aumentar la productividad en comparación con el cultivo discontinuo. En el modo de operación continua, para lograr un estado estable que le permita funcionar sin interrupciones, se agrega continuamente nuevo medio al cultivo mezclado uniformemente durante el período iluminado al mismo tiempo que se recolecta el mismo flujo de recolección del reactor (Pozzobon, 2022).

Se dice que el sistema actúa como turbidostato cuando la variable fija es la concentración de biomasa y como quimiostato cuando la variable fija es la tasa de dilución. Según Morales Amaral (2016), el acoplamiento que se produce entre el proceso

fotosintético, que depende de la luz solar, y la generación de aguas residuales, que alcanza sus valores máximos durante el día y disminuye significativamente durante la noche, hace que la modalidad continua sea la más adecuada.

El objetivo general de este trabajo de investigación es evaluar el rendimiento de lípidos obtenidos a partir de biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de faenamiento avícola utilizando luz artificial.

Entre los objetivos específicos considerados para el alcance del objetivo general, se tiene:

- Caracterizar el agua residual de faenamiento avícola mediante análisis fisicoquímicos para la determinación de su potencial como medio de cultivo de microalgas en condiciones de luz artificial
- Analizar el crecimiento de la especie *Chlorella vulgaris* en agua residual de faenamiento avícola bajo condiciones de luz artificial mediante técnicas de crecimiento celular para la producción de biomasa con fines de extracción de lípidos
- Caracterizar la fracción lipídica de la biomasa de *Chlorella vulgaris* cultivada, utilizando procesos de extracción de lípidos totales, ácidos grasos libres y ésteres metílicos para la comprobación de su potencial de uso de estos lípidos en la producción de biodiésel

2. METODOLOGÍA

2.1 Sitios de estudio

2.1.1 Recolección de agua residual

La recolección del agua residual de faenamiento avícola (figura 1) se realizó en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas ubicada en la parroquia Puerto Limón se encuentra a 104 kilómetros de la capital Quito. Esta parroquia presenta una altitud de 244 msnm y cuenta con temperaturas medias de 28 °C.



Figura 1. Agua residual avícola

2.2 Metodología

El método que se utilizó consta de tres fases (anexo 1):

- Fase de campo
- Fase de laboratorio

2.2.1 Fase de campo

- **Recolección del medio de cultivo**

Se recolectaron 100 L de agua residual, 40 L para el control con luz blanca y 40 L para la luz azul, para realizar una comparación entre ambos tipos de luz. Se utilizó un embudo y un colador para evitar el paso de plumas y otros sólidos no requeridos durante la recolección en canecas de 20 L. Posteriormente, se agitó el agua con un palo de madera para distribuir los nutrientes uniformemente. Las canecas fueron selladas con envoltura de plástico, etiquetados y refrigerados a 4° C hasta su uso.

- **Obtención del inóculo**

Se usó la cepa *Chlorella vulgaris* adquirida en el Banco Español de Algas, las cuales fueron preservadas en la ciudad de Quito, Ecuador en medio Bold Basal Medium (BBM) en proporción 1:10 en el Laboratorio de Química de la Facultad de Arquitectura e Ingenierías de la Universidad Internacional SEK. Se mantuvo aireación constante a 4,2 L/min, con luz artificial blanca, realizando cambio de medio cada 15 días.

5.2.2 Fase de laboratorio

- **Caracterización del medio de cultivo**

Se utilizaron botellas de 150 mL para recolección de la muestra de agua avícola, las botellas fueron esterilizadas previamente con luz UV. Se realizó un análisis de macronutrientes importantes para un crecimiento eficiente de las microalgas *Chlorella vulgaris*, usando métodos estandarizados HACH como: fósforo total (PT), carbono orgánico total (COT) y nitrógeno total (NT); así como otros parámetros fisicoquímicos y algunos metales pesados analizados en laboratorios certificados para el análisis de agua (Anexo 3).

- **Preparación de medio de cultivo**

Se realizó una filtración de partículas sólidas presentes en el medio con filtros multicapa cilíndricos, esto para evitar un crecimiento anormal de las microalgas. Cuando el agua fue filtrada se procedió a una esterilización en un autoclave, se usó botellas pyrex de 15 L, el autoclave tuvo unas condición de esterilización de 121°C y 15 psi con un tiempo de 30 minutos, se esperó que llegara a temperatura ambiente (figura 2) y se recolectó en canecas de 20 L para su almacenamiento para su uso posterior.

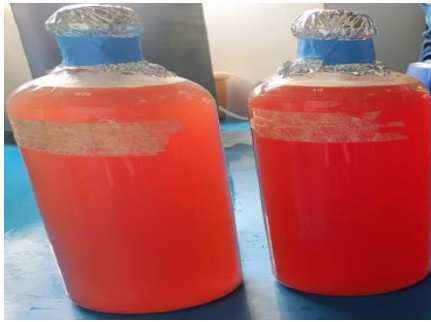


Figura 2. Medio de cultivo esterilizado

- **Preparación de inóculo**

Se prepararon dos fotobiorreactores, uno para luz artificial azul y otro para luz blanca (control). Estos biorreactores contaron de botellas de 5 L, para la inoculación se tomó 3,6 L de medio cultivo (agua de faenamiento) y 0,4 L de inóculo (*Chlorella vulgaris*) y estos se los colocó en las botellas de 5 L. Los biorreactores estuvieron a temperatura ambiente y con luz natural, esto durante un fotoperiodo de siete días con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con aireación artificial y se usó filtros de entrada y salida (figura 3). Se obtuvo una concentración celular de 10^6 células/mL obtenido por conteo celular en cámara de Neubauer, con este resultado se verificó su crecimiento y se procedió a su traspasó a un fotobiorreactor de mayor volumen.



Figura 3. Fotobiorreactor para cultivo del inóculo

- **Siembra del inóculo en el fotobiorreactor**

Cuando el inóculo estuvo listo, se procedió a colocar 4 L de este en el fotobiorreactor; en este caso se usó peceras con unas dimensiones de 19 cm de ancho y 32 cm de alto (figura 4). Posterior a esto se colocó 36 L de medio de cultivo (agua de faenamiento) que ya estaba esterilizada. Para la aireación se usaron compresores de peceras con mangueras que realizaron una oxigenación y suspensión continua del cultivo a una velocidad de 4,2 L/min, esto ayudó a que las microalgas se distribuyeran por todo el cultivo evitando su sedimentación. Para mantener la temperatura constante se colocaron termopares a una condición de 24 ± 3 ° C. El cultivo se mantuvo en condiciones controladas en laboratorio en Quito en un periodo de 15 días.

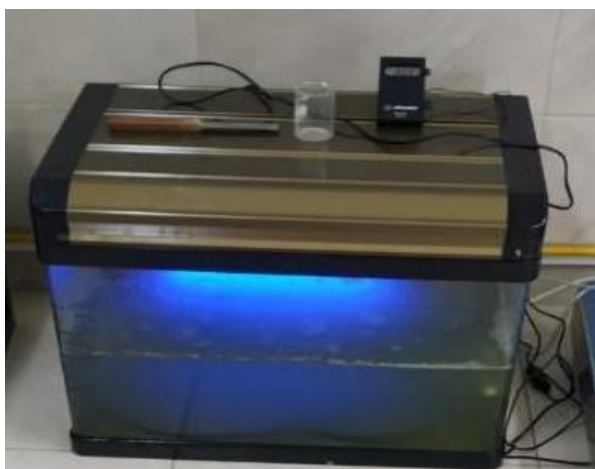


Figura 4. Fotobiorreactor con cultivo de Chlorella vulgaris en luz LED de color azul

- **Determinación de crecimiento celular de microalgas**

Se determinó el conteo celular por día hasta su cosecha; es decir, 15 días, la muestra diaria se recolectó en tubos falcón de 50 mL etiquetados correctamente y esterilizados previamente, estas muestras fueron almacenadas a una temperatura de 4°C. El conteo celular y peso seco se realizó por triplicado; para el peso seco se colocó 1 mL de la

muestra recolectada previamente en papel filtro circular pesado previamente y esto sobre un vidrio reloj y se dejaron secar por 24 horas a 60 °C (figura 5). Transcurrido el tiempo se pesó el filtro con la muestra y para obtener el peso final se usó la ecuación (2) (utilizada por Guatemala, 2023). Para el conteo celular diario se utilizó 10 uL de la muestra homogeneizada y la cámara de Neubauer en un microscopio óptico marca Olympus a 40X. Para la determinación de la concentración celular se usó la ecuación (3).



Figura 5. Peso seco diario

(2)

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

(3)

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

Para la medición de productividad volumétrica ecuación (4), la productividad específica de la biomasa ecuación (5), tiempo de duplicación de las microalgas ecuación (6) y tasa de crecimiento específica ecuación (7) se usaron ecuación investigadas por Guatemala (2023).

(4)

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

(5)

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

(6)

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

(7)

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

- **Parámetros fisicoquímicos**

Para la verificación de la eliminación de los macronutrientes y metales analizados, las muestras recolectadas diariamente se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos, posterior a esto se retiró el sobrenadante y se colocó en otros tubos falcon de 50 mL para poder ser analizados. El análisis de concentración de macronutrientes, micronutrientes y metales se realizó por triplicado estos fueron Carbono orgánico total (TOC), Nitrógeno total (TN), Fósforo total (TP), calcio, cobre, cromo, hierro, molibdeno, nitrógeno amoniacal, níquel, plomo, potasio y sodio usando métodos estandarizados HACH y otros métodos indicados en el Anexo 3. Usando la fórmula la concentración inicial de nutrientes (C_I) y la concentración final (C_F) como indica la ecuación (8) (Guatemala, 2023).

(8)

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

- **Cosecha y obtención de biomasa microalgal**

Cuando el cultivo de 40 L llegó al día 15, se verificó que la microalga estuviese en un estado de lisis celular, esto por la disminución de los parámetros de crecimiento para realizar la cosecha y la posterior centrifugación del contenido en tubos falcon de 50 mL a 4000 rpm por 5 minutos para obtención de pellets de biomasa y la eliminación de la

mayor cantidad de humedad. Durante este procedimiento se recolectaron 4 L de sobrenadante para análisis de parámetros fisicoquímicos en laboratorio exterior. Cuando se obtuvo biomasa húmeda se procedió a ponerla en vidrios reloj y colocarlos en la estufa a 60 °C en un periodo de 24 h para secar la biomasa (figura 6). Una vez seca, se procedió al raspado y se obtuvo biomasa seca en polvo, se pesó y se procedió almacenar en un tubo falcon envuelta en papel aluminio.



Figura 6. Biomasa en proceso de secado

- **Extracción de lípidos**

Se utilizaron 6 solventes para la extracción: metilciclohexano, acetato de etilo, etanol, metanol, cloroformo metanol (2:1) y cloroformo metanol (1:2), siguiendo el método de Blight & Dyer modificado por IMARPE. Se incorporó 0,5 g de biomasa seca en seis falcons de 50 ml, adicionando 20 mL de los solventes en cada uno, y se dejó reposar durante dos días. Posterior a esto se sometió a un sonicador por 45 minutos para obtener una lisis celular. Se incubó durante 24 horas a 28° C. Después de las 24 horas, cada tubo se sonicó nuevamente por cuarenta y cinco minutos y se centrifugó por treinta minutos. Se tomó el sobrenadante y se colocó en otro tubo falcón limpio.

Después, se agregó 6 mL de cloruro de sodio (NaCl) al 0,58 % y se mezcló con centrifugación a 4000 rpm para separar la parte acuosa de la orgánica. Los frascos vacíos con etiquetas se pesaron y luego se llevaron a la estufa a 80°C para eliminar el agua y el solvente. Finalmente, se utilizó la ecuación (9) (Guatemala, 2023) para determinar el porcentaje de lípidos. En esta ecuación, P_L se refiere al peso del frasco con el contenido

lipídico ya extraído y seco, mientras que Pb se refiere al peso de la biomasa microalgal. El porcentaje total se representa en % m/m.

(9)

$$\%Lípidos = \left(\frac{PI}{Pb}\right) \times 100$$

Adicionalmente, se utilizó la ecuación (10) (Guatemala, 2023) para calcular la productividad volumétrica de los lípidos para cada solvente extractor. En esta ecuación, Ml representa la masa de lípidos, V es el volumen de cultivo y T es el tiempo en días (d).

(10)

$$Productividad\ Total\ Volumétricas\left(\frac{g}{Ld}\right) = \left(\frac{M_1}{V \times T}\right)$$

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

Para extraer Ácidos Grasos Libres Totales (AGL), se usó el protocolo de Tanzi et al. (2013) el cual saponificó la biomasa seca con los cinco solventes utilizados en el procedimiento anterior. Se instaló un aparato de reflujo, como se muestra en la figura 7. 0,5 g de biomasa de microalgas se saponificaron con una solución de metanol de 20 mL y 0,1 g de KOH. Luego, durante cuatro horas, el reactor se mantuvo a 300 rpm y a 60 °C. Se filtró y se agregó HCl 1 M para reducir el pH a 5. Después, se transfirió la solución a un embudo de decantación de 50 mL y se añadió la misma cantidad de agua, reinvertiendo varias veces para eliminar los gases. Se pesaron los tubos vacíos que habían sido etiquetados previamente y se agregó la mezcla de embudo a los frascos para que se secara a 80 °C hasta que su peso permaneciera constante. Finalmente, se pesan los frascos que ya han secado utilizando la muestra de AGL.



Figura 7. Equipo de reflujo para saponificación de biomasa de *Chlorella vulgaris* (se utilizó para calcular el porcentaje de AGL) (Guatemala, 2023).

(11)

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

- **Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAMES).**

Los ésteres metílicos de ácidos grasos se pueden extraer de dos maneras diferentes. El primero es directo, obtenido de la biomasa seca de ambas luces; el segundo es indirecto, obtenido de lípidos y ácidos grasos libres. Los catalizadores usados fueron de tipo homogéneo, empleando ácido sulfúrico (H_2SO_4) y heterogéneo, con resina comercial CT-269DR. Cada reactor de vidrio recibió la siguiente cantidad de catalizador disolvente de biomasa o grasa: Para catalizadores homogéneos, (1,74:15:1) y para catalizadores heterogéneos, (1,1:70:1). Los reactores se colocan en un baño térmico con agua y componentes de vidrio o espuma Flex para evitar que se evaporen rápidamente. Durante cuatro horas, mantenía la temperatura de reacción a 90 °C y la velocidad de agitación a 900 rpm (figura 8). Después de filtrar el material con el aparato Millipore, se añadieron 2 mL de la mezcla hexano: dietiléter (80:20) para eliminar las impurezas. Finalmente, se separó la fase orgánica de la acuosa en un embudo de decantación, se colocó en recipientes pesados previamente etiquetados y se dejó reposar a 80°C hasta que su peso permaneciera constante.



Figura 8. Proceso de obtención de FAMEs

La ecuación (12) (Guatemal, 2023) se utilizó para calcular el rendimiento; el peso del tubo con la muestra seca se llama T2, el peso inicial del tubo vacío se llama T1 y la biomasa seca utilizada en la reacción se llama W.

(12)

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

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

Se utilizó una placa de gel de sílice de 40 x 80 mm y 0,2 mm de espesor para cromatografía de capa fina. Se marcó una línea conocida como origen, a 1 cm de la base con tres puntos. El primer punto muestra el estándar (oleato de colesterol) como control, el segundo muestra los lípidos AGL y el tercero muestra los lípidos FAME. Se trazó otra línea de 1 cm llamada frente del disolvente al extremo opuesto del origen. Para activar las placas, se calentaron a 100 °C durante treinta minutos después de representar gráficamente los diferentes puntos. Después de un período de tiempo, las muestras secas se agregaron a los puntos mencionados anteriormente con 5 mL de su propio disolvente extractor, y la placa se dejó reposar durante diez minutos en un recipiente de vidrio sellado con cinta adhesiva sobre la fase móvil de cloroformo puro. Diez minutos después, la corrida se exhibió a través de vapores de yodo en un frasco con perlas de yodo sublimado. La ecuación (13) se utilizó para determinar el factor de retención (Rf), donde Y es la distancia del origen al punto de demostración y X es la distancia del origen al frente del disolvente. Es importante tener en cuenta que la cromatografía se realizó utilizando únicamente el mejor solvente extractor resultante en la extracción de AGL y FAME.

(13)

$$Rf = \left(\frac{\text{Distancia recorrida por la muestra (y)}}{\text{Distancia recorrida por la muestra (x)}} \right)$$

3. RESULTADOS

3.1 Determinación del crecimiento celular

La Figura 9 representa las curvas de crecimiento celular con los datos obtenidos del conteo de la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de faenamiento avícola en dos tipos de luces LED (azul y blanca) para medir el crecimiento de las microalgas. Los datos muestran que las microalgas en ambas luces presentan un estado de adaptación a su medio durante los días 0 a 3 de cultivo (Figura 9). Entre el día 0 y el día 3, se puede observar el periodo de adaptación con una concentración celular de $6,09 \cdot 10^3 \pm 8,29 \cdot 10^0$ cel/mL hasta $5,35 \cdot 10^4 \pm 6,50 \cdot 10^0$ cel/mL en luz azul, a partir del día 4 al 9, se puede observar una fase exponencial, con una concentración que aumenta hasta $3,75 \cdot 10^5 \pm 4,62 \cdot 10^0$ cel/mL, a partir de ese momento, comienzan su fase de muerte celular, que se muestra desde el día 10 en adelante con una disminución en la concentración celular hasta $2,81 \cdot 10^5 \pm 1,83 \cdot 10^0$ cel/mL.

En la luz blanca (control) se muestra el mismo periodo de adaptación al medio entre el día 0 a 3 concentraciones de $8,55 \cdot 10^3 \pm 8,06 \cdot 10^0$ cel/mL hasta $1,48 \cdot 10^4 \pm 4,35 \cdot$ cel/mL, durante los días 4 a 12 comienza a experimentar una fase exponencial y aumenta su concentración hasta alcanzar una magnitud de $4,04 \cdot 10^5 \pm 4,17 \cdot 10^1$ cel/mL. A partir del día 13, comienza la disminución de la concentración celular, llegando a $1,95 \times 10^5 \pm 2,30 \times 10^1$ cel/mL.

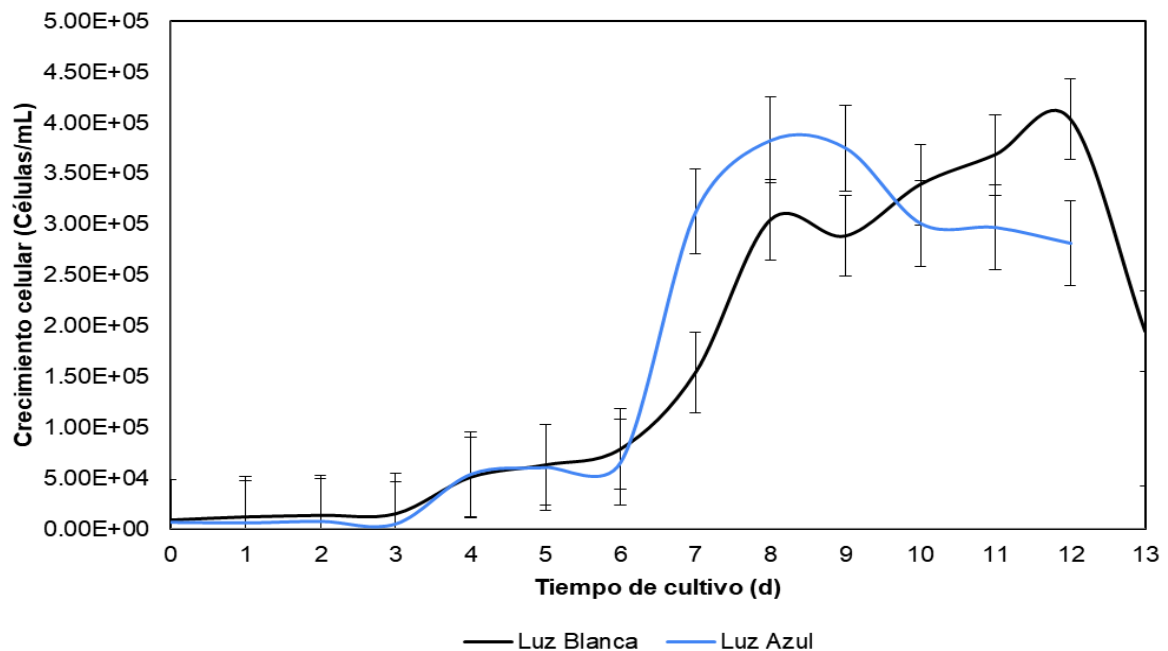


Figura 9. Curva de crecimiento celular de la microalga *Chlorella vulgaris* en un medio de cultivo con luz artificial y agua de faenamiento de aves.

3.2 Peso seco

En relación con el peso seco de la microalga *Chlorella vulgaris* que se observa en la figura 10, la curva muestra variaciones en los valores; por ejemplo, el día cero comenzó con una concentración de 0,0009 g/L para la luz azul, se mantiene constante hasta el día 2. A partir del día 3 muestra un crecimiento, pero para el día 5, las microalgas crecen de forma exponencial hasta el día 9, alcanzando una concentración de 0,0086 g/L. Después de este período, desde el día 10 hasta el 12, comienza a notarse un decrecimiento que indica el inicio de la etapa de lisis celular. Para la luz blanca, el día cero empieza con 0,0005 g/L, del día 1 al 3 percibe un ligero incremento con una contracción de 0,0009 g/L; no obstante, desde el día 4 hasta el 12, se registró un aumento exponencial con una concentración de 0,008 g/L. Sin embargo, a partir del día 13, se observó la etapa de muerte celular.

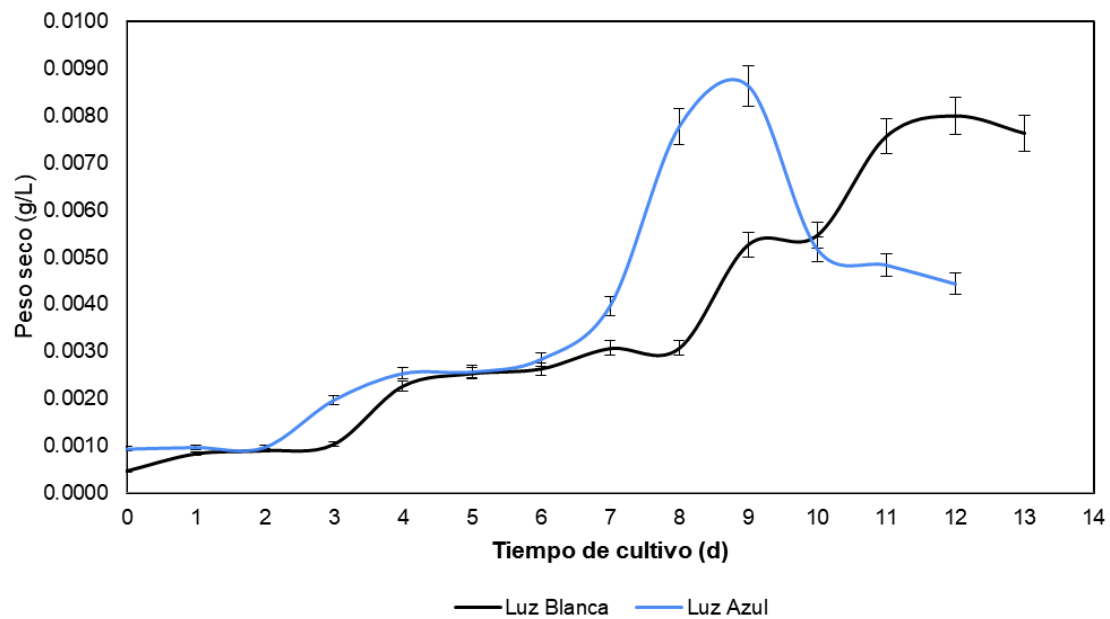


Figura 10. Peso seco de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua de faenamiento de aves.

Podemos verificar que para el contenido de biomasa el uso de luz artificial blanca superando la luz azul. Pero para el crecimiento se observa que la luz azul es superior a la luz blanca como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de generación de biomasa de *Chorella vulgaris* en agua residual de faenamiento avícola en su respectiva luz artificial.

Medio de Cultivo	Agua de faenamiento avícola	
	Luz Blanca	Luz Azul
Biomasa Total (g/L)	0,392	0,361
Productividad Volumétrica (g/L·d)	0,030	0,030
Productividad Específica	0,077	0,083
Tasa de crecimiento específica (μ)	0,259	0,389
Tiempo de Duplicación (d)	2,675	1,780

3.3 Análisis de parámetros fisicoquímicos y remoción de nutrientes

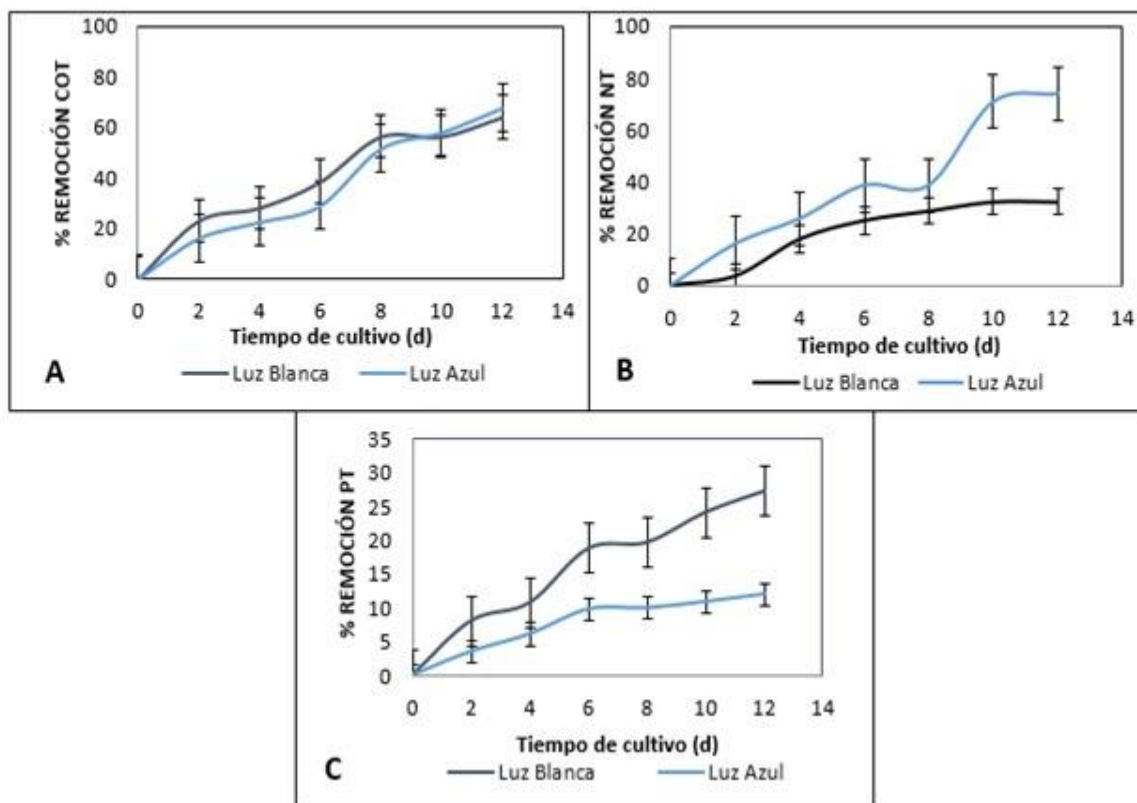


Figura 11. Porcentaje de eliminación de COT (A), de NT (B) y PT (C) en el fotoperiodo de luz artificial blanca (control) y azul

Se llevaron a cabo análisis de nitrógeno total (NT), fósforo total (PT) y carbono orgánico total (COT), y se representó en figuras el porcentaje de nutrientes removidos durante un período de 13 días de cultivo en agua de faenamiento avícola, expuesta a un fotoperiodo compuesto por luz artificial azul y blanca, los análisis se realizaron pasando un día. La figura 11A muestra los valores obtenidos de la medición de la remoción total de carbono orgánico total (COT) en el cultivo de agua residual de faenamiento avícola. Se observa que en el día 0, bajo la exposición a la luz blanca, se registró la mayor concentración de carbono con un valor de $19,5 \pm 4,94$ mg/L COT, la remoción de carbono comenzó a partir del día 2, logrando eliminar el 23,07 % del carbono presente en el medio. Este proceso continuó en el día 4, removiendo el 28,20 %, y en el día 6, alcanzando el 38,46 %. En los días 8 y 10, se logró una remoción del 56,41 %. Al finalizar el día 12, se registró una concentración de 7 ± 0 mg/L COT y una remoción total del 64,10 % del COT. Para la luz azul en el día 2, se removió un 16,12 % del carbono total. En el día 4, la

remoción aumentó a un 22,58 %. En el día 6, se observó una remoción del 29,03 %. En el día 8, hubo un incremento significativo en la remoción, alcanzando un 51,61 %. A partir de los días 10 hasta el día 12, se logró una remoción final del 67,74 %, con una concentración de $5 \pm 5,65$ mg/L COT. Puede observarse que, en ambos cultivos, la remoción de COT fue muy próxima entre sí.

La figura 11B presenta información sobre el porcentaje de remoción de nitrógeno total en cada día de cultivo, lo que permite observar posibles tendencias o variaciones a lo largo del tiempo. En el caso del fotoperiodo con luz blanca, se observa que en el día 0 se registra la mayor concentración de nitrógeno en el medio, con $42 \pm 0,00$ mg/L NT. A medida que avanzan los días, se evidencia un aumento en el porcentaje de remoción de nitrógeno. En el día 2, se alcanza un porcentaje de remoción del 3,57 %, mientras que en el día 4 este porcentaje aumenta a 17,85 %. En el día 6, se logra una remoción del 25,00 %. Este comportamiento ascendente continúa hasta llegar al día 12, donde se obtiene un porcentaje de remoción del 32,34 %. La concentración final de nitrógeno en el medio es de $28,5 \pm 0,70$ mg/L NT. En contraste con la luz blanca, se observó un mayor crecimiento de remoción de nitrógeno en el fotoperiodo con luz azul. En el día 0, se obtuvo una concentración inicial de $15,5 \pm 0,70$ mg/L NT. A partir del día 2, se observa un crecimiento exponencial en la remoción de nitrógeno, y este aumento continúa hasta el día 12, donde se alcanza un impresionante porcentaje de remoción del 77,41 %. La concentración final de nitrógeno en el medio es de $3,5 \pm 0,70$ mg/L NT. En comparación con los datos posteriores y la remoción de nitrógeno, se determina que se obtuvo un mejor rendimiento en el fotoperiodo con luz azul, superando significativamente a la luz blanca.

En la Figura 11C se representa el porcentaje de remoción de fósforo obtenido a lo largo de 13 días en el medio de cultivo. Al igual que en la gráfica anterior, se observa un incremento gradual en el porcentaje de remoción a medida que pasan los días. Para el fotoperiodo con luz blanca, se evidencia una concentración inicial de fósforo de $11,2 \pm 0,28$ mg/L PO_4^{3-} en el día 0 al 2, con una remoción inicial de 8,034 %. Este porcentaje aumenta progresivamente en el día 4 con 10,71 % y el día 6 con 18,75 %. A partir del día 8, se obtiene un porcentaje de remoción final de 27,23 % para la luz blanca, con una concentración final de fósforo de $8,15 \pm 0,07$ mg/L PO_4^{3-} .

En el caso del fotoperiodo con luz azul, se observa que el porcentaje de remoción de fósforo no es tan alto en comparación con la luz blanca. En el día 0, se registra una concentración inicial de $27,1 \pm 0$ mg/L PO_4^{3-} y una remoción del 0,00 %. En el día 2, se logra un porcentaje de remoción de 3,50 %, y en el día 4, el porcentaje de remoción aumenta a 6,08%. Sin embargo, a partir del día 6, la curva comienza a incrementarse gradualmente, y para el día 12 se alcanza un porcentaje de remoción del 12,26 %, el cual es menor en comparación con la luz blanca. El experimento concluye con una concentración final de fósforo de $23,85 \pm 0,35$ mg/L PO_4^{3-} en el medio de cultivo bajo luz azul.

Tabla 2 Porcentaje de remoción de Nitrógeno, Fósforo y Carbono total por Chlorella vulgaris en agua residual de origen avícola con fotoperiodo luz blanca y luz azul.

Parámetros Físicoquímicos	Concentración Inicial		Concentración Final		% Remoción final	
	Luz Blanca	Luz Azul	Luz Blanca	Luz Azul	Luz Blanca	Luz Azul
NT (mg/L N)	42 ± 0	$15,5 \pm 0,7$	$28,5 \pm 0,70$	$4 \pm 1,41$	32,14	74,19
PT (mg/L PO_4^{3-})	$11,2 \pm 0$	$27,1 \pm 0$	$8,15 \pm 0,07$	$23,85 \pm 0,35$	27,23	11,99
COT (mg/L C)	$19,5 \pm 4,9$	$15,5 \pm 3,5$	7 ± 0	$5 \pm 5,65$	64,10	67,74

En la tabla 2 se muestra el porcentaje de remoción de nitrógeno total (NT), fósforo total (PT) y carbono orgánico total (COT) de *Chlorella vulgaris* en agua residual de origen avícola. Se observa que para la exposición a luz blanca, se logró la mayor remoción de COT con un porcentaje de 64,10 %. En segundo lugar, se observa una remoción de NT con un porcentaje de 32,14 %. En cuanto al fósforo, se aprecia una remoción de 27,23 %. Referente a la luz azul se observó una remoción mayor en NT con un 74,19 %, seguido de COT con 67,74 % y por último PT con una remoción de 11,99 %. Estos resultados evidencian una mejora en la remoción de NT y COT al exponer el cultivo a la luz LED de color azul; sin embargo, la remoción de PT se ve desfavorecida ante la exposición a luz LED azul.

En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de remoción de macro y micronutrientes y metales pesados analizados a partir del medio de cultivo previo a la siembra de microalgas

(concentración inicial) y del sobrenadante recolectado luego de la cosecha (concentración final). Para la exposición a luz blanca, se observa una remoción considerable en hierro, turbidez y DQO, con un porcentaje del 92,5 %, 94,38 % y 74,53 % en peso, respectivamente. Además, se observa una remoción de sodio y potasio con un porcentaje de 64,6 % y 46,35 %, respectivamente. En cuanto a la exposición a luz azul, se observa una remoción considerable en turbidez, hierro y DQO, con un porcentaje de 96,84%, 95,31% y 81,48% en peso, respectivamente. Además, se registra una remoción de sodio y potasio con un porcentaje de 47,95% y 7,38% respectivamente.

*Tabla 3. Remoción de nutrientes en agua de faenamiento avícola por *Chorella vulgaris* realizado por el laboratorio acreditado por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano SAE. Los valores se expresan como resultado del promedio de triplicados con su respectiva desviación estándar.*

Parámetros Físicoquímicos	Concentración Inicial	Concentración Final		Remoción Total (%)	
		Luz blanca	Luz azul	Luz blanca	Luz azul
Calcio (mg/L)	2,10 ± 0,13	6,98 ± 0,07	4,26 ± 0,05	-	-
Cobre (mg/L)	0,005 ± 0,003	< 0,01 LC	< 0,01 LC	*	*
Cromo (mg/L)	< 0,02 LD	< 0,01 LD	< 0,01 LD	*	*
Hierro (mg/L)	1,60 ± 0,10	0,12 ± 0,01	0,075 ± 0,004	92,5	95,31
Molibdeno (mg/L)	< 0,1 LD	< 0,1 LD	< 0,1 LD	*	*
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	117.25	< 0,3 LC	< 0,3 LC	*	*
Níquel (mg/L)	< 0,05 LC	<0,05 LC	<0,05 LC	*	*
Plomo (mg/L)	< 0,004 LD	<0,004 LD	<0,004 LD	*	*
Potasio (mg/L)	56,20 ± 4,10	30,15 ± 2,09	52,05 ± 3,61	46,35	7,38
Sodio (mg/L)	78,55 ± 5,73	27,80 ± 0,5	40,88 ± 0,74	64,6	47,95
Turbidez (NTU)	73	4,1	2,3	94,38	96,84
DQO (mg/L)	200,36 ± 7,49	60,1 ± 3,6	43,7 ± 2,6	74,53	81,48

*Valores fuera de rango. –Sin remoción. LD. Límite de Detección.

3.4 Extracción de Lípidos

Tabla 4. Productividad volumétrica de lípidos con los mejores tres solventes

Productividad Volumétrica de lípidos (g/L·d)	Cloroformo: metanol (1:2)	$4,97 \cdot 10^{-4}$	$4,19 \cdot 10^{-4}$
	Cloroformo: metanol (2:1)	$7,91 \cdot 10^{-4}$	$4,15 \cdot 10^{-4}$
	Metanol	$3,91 \cdot 10^{-4}$	$3,50 \cdot 10^{-4}$

La figura 12 y tabla 4 muestran los resultados del análisis de los lípidos extraídos de la biomasa seca de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de faenamiento avícola, utilizando diferentes solventes como metanol, etanol, cloroformo metanol (1:2), cloroformo metanol (2:1), acetato de etilo y metilciclohexano, se determinó la extracción total de lípidos y la productividad específica. Los mejores solventes extractores para lípidos, tanto en la luz blanca como en la luz azul, fueron los siguientes:

- Cloroformo metanol (2:1): Este solvente mostró el porcentaje más alto de obtención de lípidos, con un 18,93 % para luz azul y 10,73 % para luz blanca. Además, se logró una producción de 0,0008 g/L·d y 0,0004 g/L·d, respectivamente.
- Cloroformo metanol (1:2): En segundo lugar, se encontró que este solvente obtuvo un porcentaje de obtención de lípidos de 11,88 % para luz azul y 10,8 % para luz blanca, con una producción de 0,0005 g/L·d y 0,0004 g/L·d, respectivamente.
- Metanol: Como tercer solvente más efectivo, se obtuvo un porcentaje de lípidos del 9,37 % para luz azul y 9,04 % para luz blanca. Y una productividad de 0,0004 g/L·d y 0,00035 g/L·d, respectivamente.

Estos resultados indican que los solventes cloroformo metanol (2:1), cloroformo metanol (1:2) y metanol son los más eficientes para la extracción de lípidos de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de faenamiento avícola, tanto en términos de porcentaje de obtención de lípidos como de la productividad volumétrica de lípidos. Para los solventes restantes, como el etanol, metilciclohexano (MCH) y acetato de etilo, se observó que no tuvieron una buena eficiencia en la extracción de lípidos de *Chlorella*

vulgaris cultivada en agua residual de faenamiento avícola. Los porcentajes de obtención de lípidos obtenidos con estos solventes fueron los siguientes:

- Acetato de etilo: Se obtuvo un porcentaje de obtención de lípidos de 5,22% luz blanca y 3,56% luz azul.
- Etanol: El etanol mostró un porcentaje de obtención de lípidos de 7,76 % luz blanca y 6,63% luz azul.
- Metilciclohexano (MCH): Este solvente presentó un porcentaje de obtención de lípidos de 5,24 % luz blanca y 5,36% luz azul.

Estos resultados indican que el acetato de etilo, el etanol y el metilciclohexano no fueron tan eficientes como los otros solventes mencionados previamente (cloroformo metanol en diferentes proporciones y metanol) en la extracción de lípidos de *Chlorella vulgaris*. Los porcentajes obtenidos fueron más bajos, lo que indica una menor capacidad de extracción de lípidos con estos solventes.

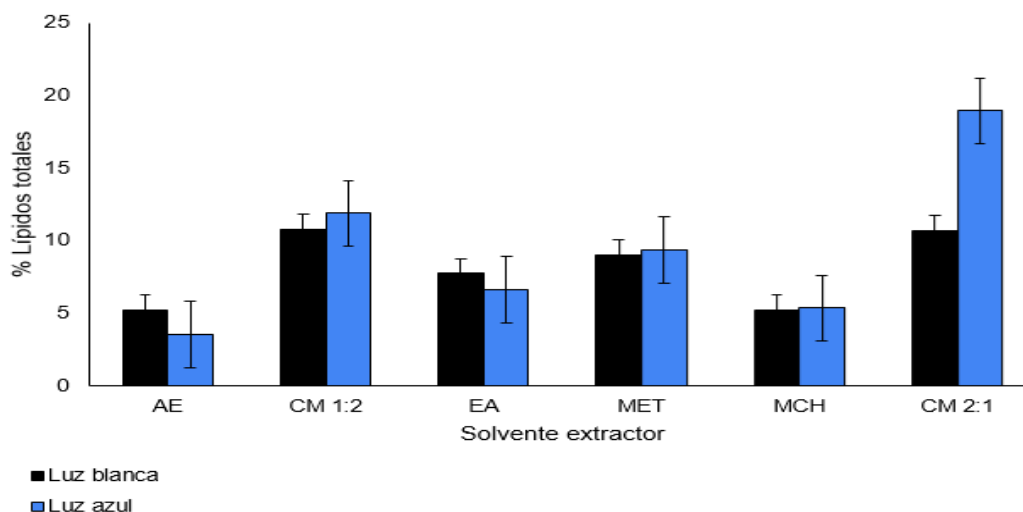
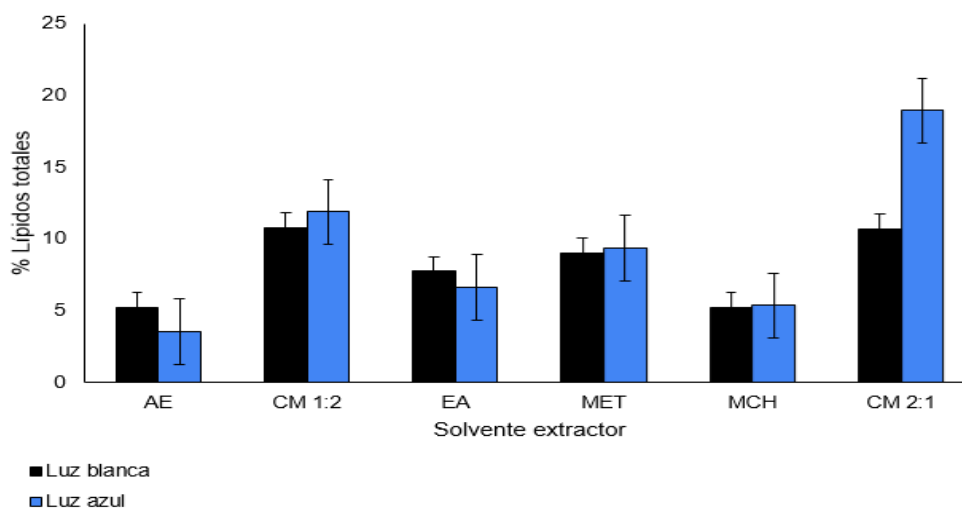


Figura 12. Porcentaje de extracción de lípidos totales de la especie *Chlorella vulgaris*, cultivada en agua residual de faenamiento avícola utilizando un fotoperiodo de luz artificial blanca y azul usando seis solventes extractores: Metilciclohexano (MCH), Cloroformo metanol 1:2 (CM 1:2), Cloroformo metanol 2:1 (CM 2:1), Etanol (EA), Acetato de etilo (AE) y Metanol (MET).

3.5 Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)

En la figura 13 se presentan los datos obtenidos para la extracción de ácidos grasos libres (AGL) utilizando luz blanca y luz azul. En el caso de la luz blanca, se determinaron los siguientes resultados: El mejor solvente extractor para la luz blanca fue el etanol, con un porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) del 16,82 % en relación con la biomasa seca. El segundo mejor solvente para la luz blanca fue el cloroformo metanol en proporción 1:2 (CM 1:2), con un porcentaje de AGL del 13,22 %. Como tercer mejor solvente para la luz blanca se encontró el cloroformo metanol en proporción 2:1 (CM 2:1), con un porcentaje final de AGL de 9,58 %.

En contraste, para la extracción de ácidos grasos libres utilizando luz azul, los resultados de los solventes fueron los siguientes: El mejor solvente extractor para la luz azul fue el metanol, con un porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) del 21,37 % en relación con la biomasa seca. En segundo lugar, se encontró el etanol, con un porcentaje de AGL del 19,36 %. El cloroformo metanol en proporción 1:2 (CM 1:2) ocupó el tercer lugar con un porcentaje de AGL de 17,97 %.



*Figura 13. Datos del porcentaje de extracción de Ácidos grasos libres de la especie *Chlorella vulgaris*, cultivada en agua residual de faenamiento, utilizando un fotoperiodo de luz artificial blanca y azul.*

3.6 Producción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME)

Los resultados de la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se muestran en la figura 14. Para explicar estos resultados, en primer lugar, se indicarán los valores para los tres métodos de producción probados (i) directo, (ii) indirecto a partir de lípidos y (iii) indirecto a partir de AGL con luz LED blanca (control), y luego con luz LED azul.

Para el control en luz LED blanca, se logró obtener un rendimiento del $72,55 \pm 2,30$ % en la extracción de FAME a partir del método directo a partir de biomasa seca bajo un fotoperiodo 19:5 con luz blanca utilizando el catalizador ácido homogéneo (H_2SO_4). Por otro lado, al emplear el catalizador heterogéneo (resina CT-269), se obtuvo un rendimiento del $54,04 \pm 2,83$ %. Para el cultivo en luz LED azul se obtuvo un rendimiento del $84,46 \pm 0\%$ en la extracción de FAME directamente a partir de biomasa seca utilizando el catalizador ácido homogéneo en un fotoperiodo (19:5). Se constató que, para ambos colores, la mejor extracción fue con el catalizador ácido homogéneo.

En el caso de la extracción de FAME con el método indirecto a partir de lípidos previamente extraídos con luz azul, se observó que la ácido sulfúrico logró obtener un mayor porcentaje de extracción en comparación con la resina CT-269 (según se muestra en la figura 14), el mejor solvente encontrado en FAME indirecto con ayuda del catalizador ácido homogéneo con luz azul fue la mezcla de cloroformo: metanol en proporción 2:1, con un rendimiento de $97,60 \pm 1,14$ %, seguido por el solvente metanol con catalizador heterogéneo con una extracción de $93,46 \pm 1,35$ %. Respecto a la luz blanca se observó que la resina CT-269 logró obtener un mayor porcentaje de extracción en comparación con ácido sulfúrico (según se muestra en la figura 14), se obtuvo el mejor porcentaje de FAMES indirecto de $94,60 \pm 1,34$ % con el catalizador heterogéneo y solvente CM 2:1. Le sigue en segundo lugar el metanol con un rendimiento de $84,79 \pm 1,85$ %, y en tercer lugar se encuentra la mezcla de cloroformo: metanol en proporción 1:2, con un rendimiento de $74,96 \pm 0,38$ %. En cuanto al catalizador ácido homogéneo, se encontró que el metanol fue el solvente que logró el mayor porcentaje de extracción, con un rendimiento del $63,33 \pm 4,95$ %.

En términos generales, la mezcla de cloroformo: metanol en proporción 2:1 demostró ser el mejor solvente tanto en el proceso de FAMES AGL con catalizador ácido con luz blanca. Este solvente logró extraer un $91,09 \pm 0$ % de FAME, seguido por el metanol con un rendimiento del $83,01 \pm 0$ %. El tercer mejor solvente fue la mezcla de cloroformo: metanol en proporción 1:2, también con un rendimiento de $83,01 \pm 0$ %. En relación con el uso de la resina CT-269 como catalizador, se encontró que el solvente más efectivo para la extracción de FAME fue la mezcla de cloroformo: metanol en proporción 1:2. Este solvente logró alcanzar un porcentaje de extracción de hasta $71,92 \pm 0$ %.

En el caso de la extracción de FAME indirecto, se observó que tanto el catalizador ácido como la resina demostraron rendimientos similares. En el caso del catalizador ácido H_2SO_4 , el mejor solvente encontrado fue la mezcla de cloroformo: metanol en proporción 2:1, con un rendimiento de $97,60 \pm 0,67$ %. Le sigue el metanol con un rendimiento de $72,22 \pm 3,02$ %, y en tercer lugar se encuentra la mezcla de cloroformo: metanol en proporción 1:2, con un rendimiento de $43,86 \pm 1,43$ %. En cuanto a la resina CT-269 como catalizador, se encontró que el metanol fue el solvente más efectivo para la extracción, logrando un porcentaje de extracción de hasta $93,46 \pm 4,64$ %. Le sigue la mezcla de cloroformo: metanol en proporción 2:1, con un rendimiento de $87,36 \pm 2,56$ %. Por último, la mezcla de cloroformo: metanol en proporción 1:2 obtuvo un rendimiento de $36,63 \pm 12,36$ %. Para FAMES AGL el catalizador ácido obtuvo un mejor rendimiento siendo el mejor solvente cloroformo metanol (2:1) con $85,57 \pm 0$ %, seguido por el metanol con $83,33 \pm 0$ % y por último el cloroformo metanol (1:2) $75,23 \pm 0$ %. Referente a la resina CT-269 su más alto rendimiento fue con cloroformo metanol (2:1) con $43,11 \pm 0$ %.

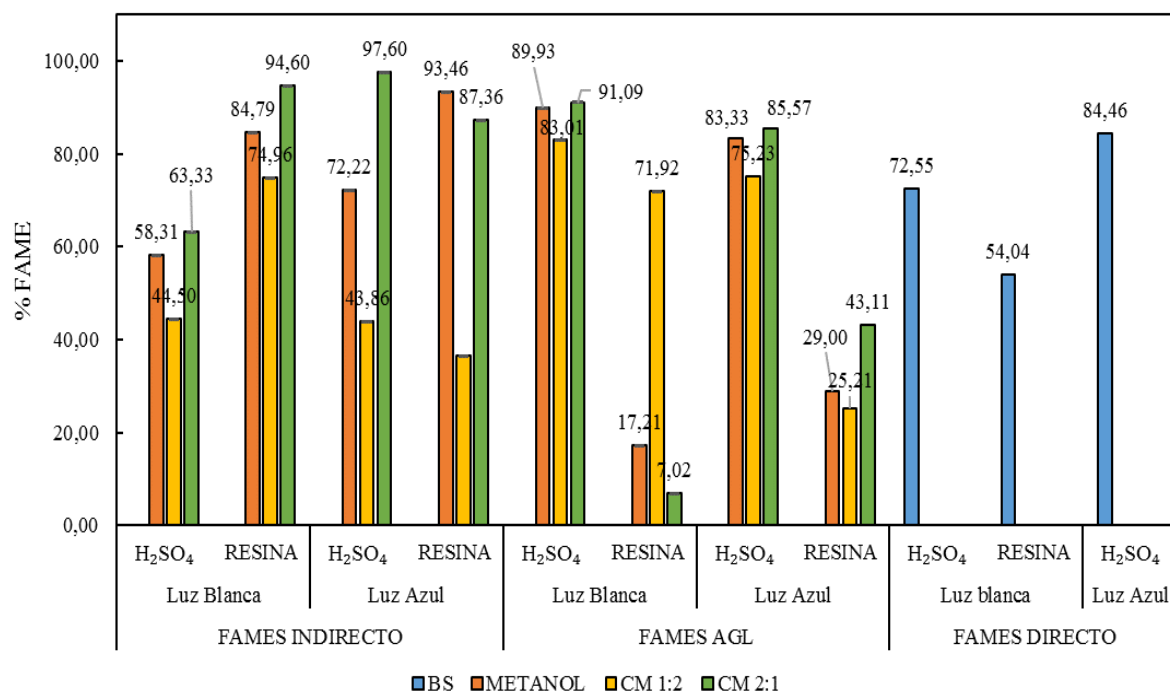


Figura 14. Porcentaje de extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME) de *Chlorella vulgaris* cultivadas en agua residual avícola

3.7 Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography-TLC)

En la cromatografía de capa fina (TLC) los resultados obtenidos se observan en la figura 15, en donde se aprecia el recorrido de las muestras del estándar el cual corresponde a un éster de colesterol (oleato de colesterol), se tomó una muestra del FAME directa, indirecta y AGL de luz blanca y azul con sus catalizadores (ácido sulfúrico homogéneo y resina CT-269 heterogéneo). La figura 15 A muestra los resultados obtenidos de la cromatografía de capa fina para la muestra de biomasa directa utilizando el catalizador de ácido sulfúrico (H₂SO₄). En la parte superior izquierda se puede observar la fase móvil del estándar, donde se identifica claramente la presencia del éster de colesterol. Al utilizar luz azul, se puede determinar la presencia de monoglicéridos, los cuales son compuestos orgánicos con bajo contenido de ácidos grasos, triglicéridos y ésteres metílicos. Por otro lado, al utilizar luz blanca en la fase móvil, se obtiene una marca que indica la presencia de ésteres metílicos.

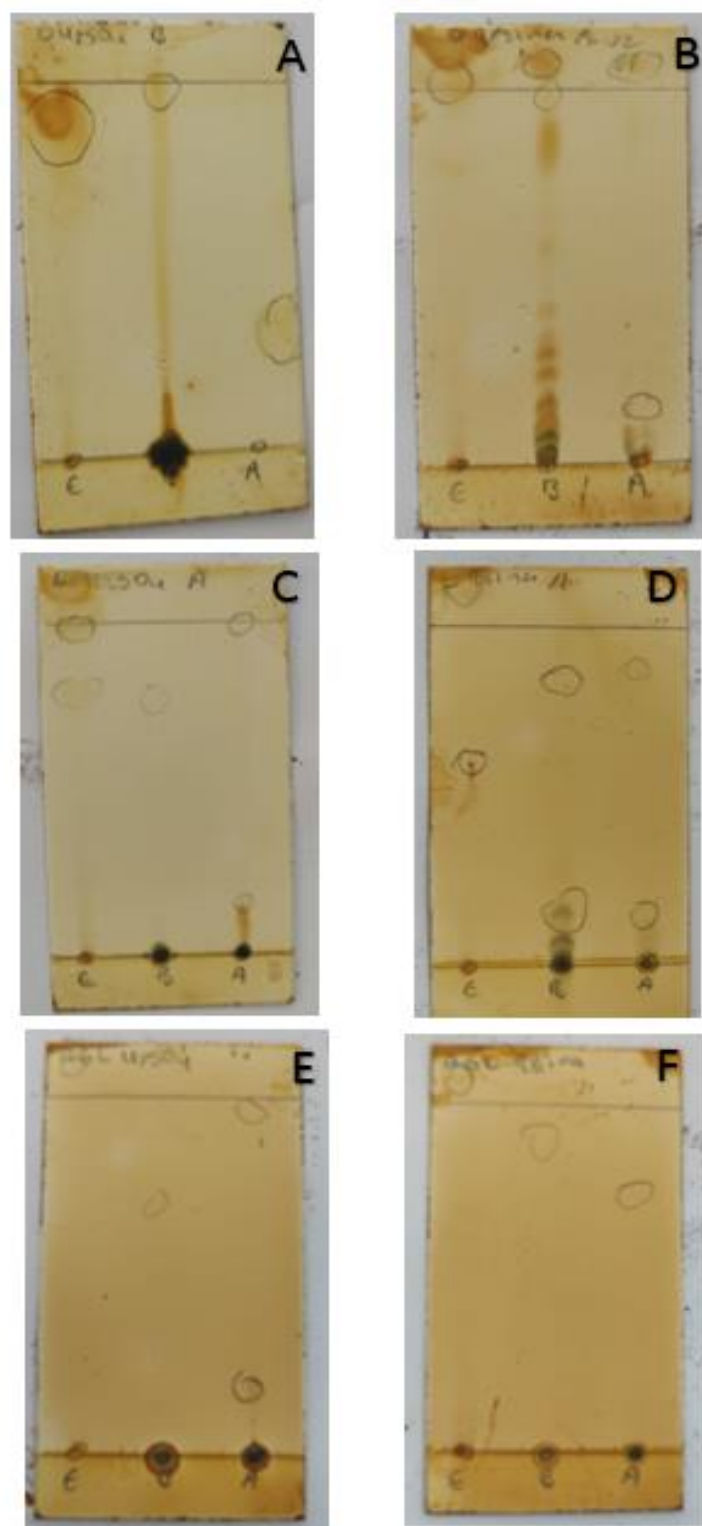


Figura 15. Cromatografía en capa fina de FAMES de la microalga *Chlorella vulgaris* cultivada en agua de faenamiento avícola en fotoperiodo de luz artificial blanca (control) y azul.

En contraste, en el apartado 15 B se presentan los resultados obtenidos de la cromatografía de capa fina (TLC) para la muestra de biomasa directa utilizando el catalizador de resina CT-269. En este caso, la fase móvil del estándar muestra la presencia de ésteres de colesterol. Al utilizar luz blanca, se evidencia la presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos, mientras que al emplear luz azul se obtienen marcas correspondientes a monoglicéridos y ésteres metílicos de ácidos grasos.

En los apartados 15 C y 15 D)se analizó la biomasa indirecta FAMES (lípidos) utilizando el mejor solvente extractor CM 2:1. En el apartado 15 C, utilizando el catalizador de ácido sulfúrico, se observó la presencia de algún éster metílico en la luz azul, mientras que en la luz blanca se detectó la presencia de ácidos grasos. Por otro lado, en el apartado 15 D, utilizando la muestra de CM 2:1 con el catalizador de resina, se determinó la presencia de monoglicéridos y ésteres metílicos en ambas luces, tanto en la luz azul como en la luz blanca.

En los apartados 15 E y F se realizaron análisis de los datos FAMES (AGLs) utilizando el mejor solvente extractor, el etanol para la luz blanca y el metanol para la luz azul. En el apartado 15 E, utilizando el catalizador de ácido sulfúrico, se encontró la presencia de monoglicéridos y ésteres metílicos en la luz azul, mientras que en la luz blanca se detectó la presencia de ácidos grasos. En cambio, en el apartado 15 F, utilizando el catalizador de resina, se determinó la presencia de ésteres metílicos en la luz blanca y la presencia de ácidos grasos en la luz azul.

Tabla 5. Factor de retención de FAMES (ésteres metílicos de ácidos grasos) mediante biomasa directa con ambos catalizadores (H₂SO₄ y resina CT-269) obtenidos a partir de Chlorella vulgaris en el medio de cultivo de faenamiento avícola con fotoperiodos de luz (19:5)

Directa	Recorrido luz blanca	Rf	Recorrido del estándar	Rf
Resina	5,9	0,98	6	1
H ₂ SO ₄	5,9	0,98	5,9	0,98
Directa	Recorrido luz azul	Rf	Recorrido del estándar	Rf
Resina	5,9	0,98	6	1

Directa	Recorrido luz blanca	Rf	Recorrido del estándar	Rf
H ₂ SO ₄	3,8	0,63	5,9	0,98

En la tabla 5 se presentan los resultados de la fase móvil utilizando muestra de biomasa directa con dos catalizadores diferentes. Se utiliza el factor de retención para comparar los resultados obtenidos con los de una muestra estándar en ambas luces. En la luz blanca, el catalizador que se aproxima más al valor estándar de 0,98 es el ácido sulfúrico, con un factor de retención de 0,98. Es importante destacar que la resina también presenta un factor de retención de 0,98 en comparación con el valor estándar de 1. Para la luz azul el catalizador que más se aproxima al valor estándar es la resina CT-269 con un factor de retención de 0,98 y para el ácido sulfúrico presenta un factor de 0,63.

Tabla 6. Factor de retención de FAMES a través de biomasa indirecta. El CM 2:1 con ambos catalizadores (H₂SO₄ y Resina) obtenidos de Chlorella vulgaris en el medio de cultivo de faenamiento avícola se utiliza como solvente extractor. Se utiliza un fotoperiodo de luz artificial blanca (control) y azul.

Indirecta	Recorrido luz blanca	Rf	Recorrido del estándar	Rf
Resina	5,3	0,88	6	1
H₂SO₄	4,7	0,78	6	1
Indirecta	Recorrido luz azul	Rf	Recorrido del estándar	Rf
Resina	5,5	0,91	6	1
H₂SO₄	5,9	0,98	6	1

En la placa de gel de sílice utilizando cloroformo: metanol (2:1) como mejor solvente extractor, se pudo observar que las muestras presentaron diferentes distancias de recorrido. En la Tabla 6 se logra distinguir que, el catalizador homogéneo junto con el cultivo realizado con luz azul mostró un mayor factor de retención de 0,98 en comparación con la luz blanca la cual obtuvo un factor de retención de 0,78 con el mismo catalizador.

Tabla 7. Factor de retención de FAMES a partir de AGL con ambos catalizadores (H_2SO_4 y resina) obtenidos a partir de *Chlorella vulgaris* en el medio de cultivo de faenamiento avícola con un fotoperiodo de luz artificial blanca (control) y azul

FAMES AGL	Recorrido luz blanca	Rf	Recorrido del estándar	Rf
Resina	5,5	0,91	6	1
H_2SO_4	4,2	0,7	6	1
FAMES AGL	Recorrido luz azul	Rf	Recorrido del estándar	Rf
Resina	4,5	0,75	6	1
H_2SO_4	5,7	0,95	6	1

En la placa de gel de sílice utilizando etanol para luz blanca y metanol para luz azul como mejores solventes extractores, se pudo observar que las muestras presentaron diferentes distancias de recorrido. En la tabla 7, los mejores resultados de los factores de retención obtenidos fueron con la luz azul de 0,95 con la ayuda del catalizador homogéneo, seguido por la luz blanca con catalizador heterogéneo con un factor de retención de 0,91.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Crecimiento celular

La microalga *Chlorella vulgaris* experimentó cuatro etapas de crecimiento: lag, exponencial, estacionaria y muerte celular. En comparación con las luces blancas y azules, se puede ver en la figura 9 que, durante el periodo de adaptación, los cultivos que usaron agua de faenamiento avícola con luces LED blancas y azules experimentaron un breve retraso. Esto puede deberse a que la intensidad de la luz no fue adecuada, la proporción óptima entre zona iluminada de un reactor y zona oscura se ha establecido en 15 % y 85 % respectivamente (Martínez de la Cruz et al., 2022). Para la fase exponencial se evidenció entre los días 4 a 12 y difiere un poco con Martínez de la Cruz, et al., (2022) ya que en su estudio la fase comienza en el día 2 el utilizo la microalga *Chlorella vulgaris*

con luz azul, violeta, roja y blanca con fotoperiodo (12:12) su medio fue diferente ya que uso un medio especializado. Para Sinmaz et al, (2023), su estudio realizado en agua de matadero de aves con *Chlorella vulgaris* con iluminación continua luz blanca, la mayor concentración celular fue en el día 12 coincidiendo con los resultados, en un periodo de 12 días. Para la luz azul, se observa que el cultivo comenzó su crecimiento el día 4 pero con diferencia que termina en el día 9; Martínez de la Cruz et al., (2022) obtuvieron su fase exponencial en el día 1.

Atta et al., (2013) cultivaron la especie *Chlorella vulgaris* en medio de cultivo BBM en un periodo de 13 días, obtuvo un crecimiento superior significativo usando fotoperiodos de (24:0, 16:08 y 12:12) luz azul. Para el estado estacionario la luz blanca y azul no tienen una diferencia importante. Referente a la muerte celular en la luz blanca se presentó en el día 13 y en la luz azul en el día 12, cabe recalcar que en la bibliografía consultada no se aprecia la fase de muerte celular de la especie cultivada. En resumen, los resultados obtenidos en el crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* bajo luces LED blanca y azul muestran variaciones en las diferentes fases de crecimiento en comparación con los estudios citados. Estas discrepancias pueden deberse a diferentes condiciones experimentales y factores específicos de cada estudio que pueden variar según la composición del medio de cultivos, las condiciones de cultivo (temperatura, pH, intensidad de luz, etc).

La generación de biomasa fue ligeramente mayor en el cultivo con la luz blanca con un resultado de 0,392 g/L en comparación con la obtenida con luz azul que fue de 0,361 g/L. La productividad total de biomasa obtenida en esta investigación fue de 0,030 g/L·d para luz blanca y luz azul. Este resultado fue superior al alcanzado por Han et al., (2014), de 0,028 g/L donde utilizaron un cultivo de *Chlorella* sp. inoculada en aguas residuales sintéticas. Así mismo la tasa de crecimiento específica de la investigación de Han et al., (2014), demostró ser inferior ($0,08 \mu$) respecto a la luz blanca y azul las cuales obtuvieron resultados de 0.259μ y 0.389μ respectivamente, demostrando un crecimiento más rápido en la luz de color blanco.

Remoción de Nutrientes

Las algas requieren esencialmente luz (energía), fuente de carbono (CO_2 para el metabolismo autótrofo), medio de crecimiento (agua) y nutrientes (nitrógeno y fósforo) para reproducirse (Blair et al; 2014). Al mismo tiempo que las microalgas crecen, sucede una remoción de nutrientes presentes en el medio de cultivo. Las aguas residuales de los mataderos de aves de corral tienen un alto contenido de amonio y fosfato (Katircioglu, 2022). La remoción observada en el presente proyecto indicó que; respecto al NT en el medio de cultivo con un pH de 7, hubo una remoción total de 32,14 % en luz blanca y 74,19 % para luz azul (tabla2). Según Katircioglu (2022), *Chorella Vulgaris* remueve Nitrógeno a través de amonio (NH_4) y en sus estudios esta microalga logró remover un 95 % de NH_4 donde el medio tenía un pH de 10,5; por lo tanto, se llegó a la conclusión que existía una mejor remoción a un pH mayor (Katircioglu, 2022).

Respecto al carbono orgánico total, en el estudio "Efectos de varias longitudes de onda de luz LED y estrategias de suministro de intensidad de luz en la purificación de aguas residuales sintéticas de alta resistencia por *Chlorella vulgaris*" cuya agua residual sintética utilizada fue una modificación de un agua residual estándar de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), ocurrió una remoción de CT de 73,81 % y 42,57 % con luz blanca y luz azul respectivamente (Yan et al; 2013). Mientras que, los resultados de remoción de agua de faenamiento de aves fueron de 64,10 % con luz blanca y 67,74 % en luz azul, resultado similares a los encontrados en bibliografía consultada.

El fósforo es un nutriente utilizado en la formación de biomasa que se puede encontrar en forma de fosfato en las aguas residuales. Debido a la saturación de las células por la acumulación de polifosfatos, la eliminación de este nutriente mediante microalgas es más lenta en comparación a la eliminación de nitrógeno (Ayatollahi et al., 2020). El mayor porcentaje de eliminación de fósforo total en el trabajo de Gutiérrez et al., (2022) donde se cultivó *Chlorella vulgaris* en aguas residuales de una planta procesadora de aves de una planta con fotoperiodos de luz de 12 horas, fue de 29,56 % (Gutiérrez et al., 2022). En la remoción de Fósforo total del presente trabajo, se obtuvo un porcentaje del 27, 23% con luz blanca y 11,9% con luz azul, próximos a los reportados por otros investigadores.

En la tabla 3 se puede observar la remoción de otros nutrientes y metales donde se tomó en cuenta la concentración inicial; previo a la inoculación con *Chlorella vulgaris*. Así como la concentración final posterior a la cosecha del cultivo. Se observó una remoción considerable de hierro de 92,5 % y 95,31 % de luz blanca y luz azul, respectivamente, con una concentración final de $0,12 \pm 0,01$ mg/L y $0,075 \pm 0,004$ mg/L los cuales son menores al límite máximo permisible de descarga al sistema de alcantarillado público que es de 25 mg/L lo cual afirma su aprobación como descarga (Anexo 2). Esto se debe a que, el hierro tiene una función clave para la regulación de la biomasa de microalgas por lo que es necesario la absorción de este metal presente en el medio de cultivo (Aksu, 2000).

El potasio y sodio son otros nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas ya que estas son microorganismos fotosintéticos (Gutiérrez et al, 2022). Estos macronutrientes son activadores de enzimas de microalgas (Luna et al, 2007). En la tabla 3 se muestra una remoción de potasio de 46,35 % y 7,38 % para luz blanca y luz azul respectivamente. La concentración final de sodio fue de $27,80 \pm 0,5$ mg/L con luz blanca y $40,88 \pm 0,74$ mg/L con luz azul presentando una remoción de 64,6 % y 47,95 % respectivamente. Así mismo se observó que las concentraciones de níquel y plomo eran muy bajas para su detección. Respecto al níquel, existen fuentes bibliográficas que afirman que las microalgas pueden remover este metal, el estudio Musah (2022), demostró que *C. vulgaris* puede ser usado para la bioabsorción de níquel modificando su biomasa. Se obtuvo una remoción del 100 % de Ni (II) en condiciones de pH 5 (Musah et al., 2022).

En el estudio de Hee (2021), utilizaron *C. vulgaris* como bioindicador de contaminación por Pb, y demostraron que a una exposición de 5 μ mol/L de Pb se perciben por cambios de parámetros fisicoquímicos en el agua, ya que esta microalga es sensible a la presencia de este metal el cual obstaculiza el crecimiento y fotosíntesis de *C. vulgaris* al mismo tiempo que inhibe las actividades metabólicas de las misma conduciendo a cambio de pH, conductividad y oxígeno del agua.

Extracción de lípidos

Los lípidos, que representan las reservas de carbono y energía de una célula de microalga, son materiales productores de biocombustibles líquidos como el biodiésel. Dentro de la célula microalgal se encuentran lípidos polares como componentes de las membranas y los organelos, y lípidos neutros, que sirven como reservas de energía. Las células de microalgas acumulan y almacenan triacilglicerol (TAG) que son lípidos neutros (Olabi et al., 2023).

Según IMARPE (2020), la composición del solvente utilizado puede ser determinante para lograr una extracción efectiva de lípidos. En el presente estudio, se evaluaron seis tipos de solventes extractores seleccionados de la bibliografía con el objetivo de determinar su capacidad para extraer lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de faenamiento avícola esterilizada en autoclave y sin dilución. Además, se evaluaron los efectos del fotoperiodo de 19:5 con luz blanca y luz azul en el proceso de extracción. La elección adecuada de solventes extractores es fundamental para optimizar la extracción de lípidos de las microalgas. La selección de solventes se basa en sus propiedades fisicoquímicas, como la polaridad y la capacidad de disolver los lípidos presentes en las células de las microalgas.

Es importante señalar que la elección de los solventes extractores puede variar según las características específicas de la microalga, así como las condiciones experimentales y los objetivos del estudio. Por lo tanto, la selección de los seis solventes evaluados en este estudio se basó en la información disponible en la bibliografía. El uso de agua residual de faenamiento avícola esterilizada en autoclave como medio de cultivo y la evaluación de los fotoperiodos de luz blanca y azul son variables adicionales que se tuvieron en cuenta en este estudio, con el fin de comprender cómo afectan al proceso de extracción de lípidos. En la figura (12) se visualizan los porcentajes obtenidos de lípidos con los dos fotoperiodos los solventes usados fueron acetato de etilo, cloroformo metanol 2:1, cloroformo metanol 1:2, metil ciclohexano, metanol y etanol absoluto. Para luz blanca el mejor solvente extractor fue cloroformo metanol 2:1 con un porcentaje de 10,73%; en un estudio realizado por Katırcıoğlu Sınmaz, Erden, & Şengil, (2023) en agua de matadero de aves con *Chlorella vulgaris* con iluminación continua luz blanca, la

extracción de lípidos con cloroformo:metanol (2:1) fue de 14,85 %; esta diferencia pudo deberse al pH de 10 utilizado por los investigadores. En su estudio empleando agua de matadero de aves en luz blanca para el cultivo de la especie *Chlorella* sp., Ummalyma et al., (2023) emplearon la mezcla cloroformo:metanol (2:1) para la extracción de lípidos, obteniendo un porcentaje de lípidos 36,2 %; esto puede deberse que se realizó a pequeña escala en condiciones de laboratorio el cual permite un control más estricto de las condiciones del cultivo.

En la presente investigación, para la luz azul su mejor solvente fue cloroformo metanol 2:1 se obtuvo un porcentaje de 18,93%. Martínez de la Cruz et al., (2022) obtuvo porcentajes en el rango de 14-22% confirmando que nuestros resultados están en su rango. Otro estudio realizado por Atta et al., (2013) con *Chlorella vulgaris* en medio de cultivo BBM con luz azul con solvente extractor cloroformo:metanol (1:2), obtuvo un porcentaje de 20,8 % y 23 % pero este realizó un fotoperiodo de luz:oscuridad de 24:0 y 12:12, respectivamente.

La extracción de lípidos con los solventes halogenados con mejores valores de extracción era de esperarse, pues el cloroformo y el metanol son los solventes originales usados en el método estándar de Bligh y Dyer (1959); se trata de una mezcla de solventes de polaridades diferentes (Cloroformo es de baja polaridad y metanol es de alta polaridad) que ayudan a la extracción de lípidos polares neutros y ácidos grasos). Sin embargo, el uso de solventes halogenados está cada vez más limitado por los daños a la salud y al ambiente que estos generan (Sánchez-Bayo et al., 2020). Por ello, estudios más recientes hablan sobre el uso de solventes más respetuosos con el ambiente y la salud conocidos como solventes eutécticos profundos (Deep Eutectic solvents -DES por sus siglas en Inglés) (Torres Palacio, 2021). Los líquidos iónicos (IL) y los disolventes eutécticos profundos (DES) son considerados como alternativas a los disolventes que contienen compuestos orgánicos volátiles (VOC). Mientras que los líquidos iónicos están compuestos principalmente por iones asimétricos y voluminosos, los DES son sistemas formados por una mezcla eutéctica de ácidos de Lewis o de Brønsted y bases, que contienen una variedad de especies catiónicas y/o aniónicas. Estos sistemas presentan enlaces tipo puente de hidrógeno entre sus componentes (Torres Palacio, 2021). Como

ejemplos encontramos ChCl:ácido malónico (1:1), ChCl:Urea (1:2), Cloruro de colina:Ácido cítrico:Agua (1:1:2) entre otros.

Referente la productividad lipídica un estudio realizado por (Rodolfi et al., 2009) con *Chlorella vulgaris* en agua de desecho de aceite de palma con fotoperiodo (12:12) con luz blanca, se obtuvo productividad de 0,0369 g/L·d; este valor es más alto respecto respecto de la productividad del presente estudio, pudiendo estar asociado a las diferencias en el medio de cultivo empleado y el fotoperiodo considerado para los cultivos. En el estudio de (Liang et al., 2009) empleando *Chlorella vulgaris* se reportan una productividad de 0,054 g/L·d, superando igualmente nuestros resultados; esto puede deberse a que se hizo un medio específico idóneo para el cultivo de microalgas con iluminación continua.

Extracción de AGL

En la figura 13 se muestran los porcentajes de AGL obtenidos con las dos luces, el mejor solvente para la luz blanca fue el etanol con un porcentaje de 16,82 %; según Tejeda-Benítez et al.; (2015) quienes realizaron la extracción de AGL, se obtuvieron porcentajes de 34,9 % de AGL a partir de la especie *Chlorella* sp., cultivada en medio Conwy modificado usando la mezcla cloroformo metanol 2:1. En el estudio realizado por (Yaakob et al., 2019) con *Scenedesmus* sp., empleando la mezcla cloroformo metanol 1:2 con solvente extractor, se obtuvo un porcentaje de AGL de 14,11 % al usar fotoperiodos de 6 a 24 horas de luz ; y en otro estudio realizado por Patrino et al., (2020) se reportan porcentajes entre 14,96 - 31,40 % usando otra microalga *Leptolyngbya* sp en agua de desechos avícolas. Los resultados de AGL de la presente investigación se encuentra en el rango reportado por los diferentes investigadores citados, aun cuando se emplean condiciones de cultivos y especies diferentes.

Extracción FAME

El contenido de triacilglicerol (TAG) obtenidos en los lípidos, son el factor clave para producir biodiesel a partir de microalgas, ya que los ácidos grasos asociados reaccionan con el metanol para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), una reacción conocida como transesterificación (Anyanwu et al; 2022). En la figura 14 se

presentaron los porcentajes de ésteres metílicos de ácidos grasos donde el mejor solvente fue cloroformo:metanol 2:1 con una extracción de 97,60 % con ácido sulfúrico como catalizador. Este catalizador es usado comúnmente para realizar transesterificaciones.

En el trabajo de “Producción de FAMES de varias extracciones lipídicas de microalga y transesterificación directa de *Chlorella pyrenoidosa*” realizado por D’Oca (2011), encuentra que, el porcentaje de FAMES obtenida a partir de cloroformo:metanol 2:1 con ayuda del catalizador homogéneo; ácido sulfúrico fue de 10,6 %, resultado inferior al obtenido por *Chlorella vulgaris* de 97,60 % en la presente investigación. En el trabajo realizado por Unmalyma et al; (2023) donde se inoculó *Chlorella* sp. como medio de cultivo en aguas residuales de los mataderos de aves, los resultados que se obtuvieron en el perfil de ácidos grasos postulan que, *Chlorella* sp. contiene cadenas C15 a C20:5 los cuales tienen potencial como suplementos dietéticos, cosméticos y aplicaciones de biocombustibles.

En FAME directo realizada con biomasa seca con catalizador ácido sulfúrico y obtenida con luz azul mostró la mejor extracción de 84,46 %, superior al obtenido por Vega (2022), donde se obtuvo un porcentaje de 70,33 % realizando una extracción directa con el mismo catalizador de *Chlorella vulgaris* en agua de origen acuícola. Respecto a los resultados de FAMES de AGL se puede observar que, los porcentajes de extracción con catalizador homogéneos con luz blanca (91,09 %) son mejores que los heterogéneos (7,02 %) esto debido a que, los catalizadores ácidos; a pesar de que su tiempo de reacción es más alto, pueden convertir fácilmente materias lipídicas con altas concentraciones de AGL (Vyas et al., 2010). Así mismo se pudo apreciar que, la luz blanca (91,09 %) tuvo mejor extracción de FAME que la luz azul (85,57 %). Esto se confirma en el estudio de Hultberg (2014) “Impacto de la calidad de la luz en la producción de biomasa y contenido de ácidos grasos en la microalga *Chlorella vulgaris*” donde se obtuvo un mayor contenido de lípidos (medidos como FAME) en luz blanca con una concentración de 67,9 % a diferencia de la azul donde se extrajeron 63,8 % de FAME.

Cromatografía en capa fina (TLC)

Según los resultados obtenidos en la TLC, se observó un valor de Rf de 0,98-1 para el estándar compuesto por oleato de colesterol. De acuerdo con Vilardell (1971), se

menciona que el éster de colesterol, siendo un lípido no polar, migrará de manera más rápida en la placa de sílica gel polar, lo que resulta en un Rf mayor en comparación con los demás compuestos. Además, Rodríguez (2008) señala en su análisis de lípidos que los lípidos no polares tienden a migrar en el siguiente orden: ésteres de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos, diglicéridos, colesterol, monoglicéridos y fosfolípidos. Esto sugiere que el estándar se ubicará a una mayor distancia del punto de origen, los FAME estarán por debajo de él y los ácidos grasos se encontrarán en una posición relativamente central con respecto al punto de origen.

En el estudio realizado por (Vega Ayala, 2022) en luz obtuvo Rf de 0,68 en ésteres metílicos y para AGL obtiene 0,45 difiere del resultado obtenido en este estudio para ésteres metílicos se obtuvo Rf 0,88 y para AGL 0,95, esto puede deberse a que (Vega Ayala, 2022) realizó su estudio con agua de origen acuícola, contiene otra composición de nutrientes.

5. CONCLUSIONES

La caracterización del agua de faenamiento avícola afirmó que esta contiene los nutrientes adecuados para el crecimiento de la cepa de microalgas de *Chlorella vulgaris* en donde la misma pudo crecer de manera eficaz en cultivos de 15 días.

Así mismo, se observó que la especie *Chlorella vulgaris* acarreó una remoción de nutrientes (PT, NT y COT) para la luz blanca mayor a 40 % y para luz azul mayor a 50%, y metales pesados mayor a 74 % y 65%, en estos tonos de luz respectivamente; esto confirma el potencial de biorremediación de la microalga, y a su vez asegurando límites permisibles de descarga al sistema de alcantarillado público según la normativa ambiental vigente.

Los porcentajes de extracción de lípidos fueron de 18,93 % y 10,73 % luz azul y luz blanca, respectivamente; esto con la ayuda del solvente cloroformo: metanol 2:1 el cual demostró ser el mejor solvente confirmado con bibliografía. En la extracción de ácidos grasos libres para la luz blanca el mejor solvente fue etanol con 16,82 % y para la luz azul fue de 21,37 % con metanol. Para la producción de FAME se obtuvo un porcentaje para luz azul 97,60% con el catalizador ácido sulfúrico en extracción indirecta.

Para luz blanca se mostró una mejor extracción con catalizador resina de 94,60% en extracción directa.

El presente trabajo por lo tanto demuestra que la luz azul tuvo mejores resultados en comparación a la luz blanca. Además, los resultados cercanos al 100 % en la producción de FAME sugieren que esta especie cultivada en agua residual de faenamiento avícola presenta un alto potencial hacia la producción de biocombustibles como el biodiesel.

6. RECOMENDACIONES

Se debe ampliar las investigaciones en relación con el uso de luz artificial con faenamiento de avícola, esto porque el agua contiene alto porcentaje de nutrientes ideales para la producción de microalgas, con esto se daría un mejor uso al agua residual y así reducir la contaminación.

Referente a la luz artificial se debe realizar fotoperiodos en el cultivo según la bibliografía periodos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad obtenía un alto porcentaje de lípidos y AGL (Atta et al., 2013), igual se recomienda probar con fotoperiodos diferentes y documentar los resultados. Para futuras comparaciones

También se recomienda que el cultivo tenga una buena iluminación según (Martínez de la Cruz, y otros, 2022) el fotobiorreactor debe tener una iluminación mínima de 85%, con esto las microalgas podrán absorber la luz óptimamente. Existe los reactores tubulares que son óptimos para el aprovechamiento de luz.

Se recomienda realizar un perfil lipídico se las muestras extraídas para verificar la existencia de ácidos grasos similares a la encontrados en muestras de biodiésel.

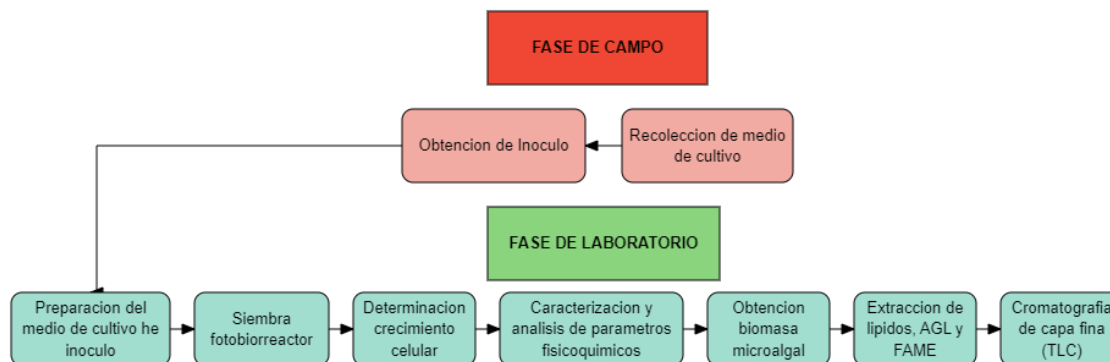
7. RECONOCIMIENTOS

Para la realización de esta investigación la DII proyecto P101617_2.2 de la Universidad Internacional SEK, Ecuador financió los reactivos y materiales de trabajo y

la Corporación para la Investigación Energética del Ecuador hizo la donación de otros materiales y equipos.

8. ANEXOS

Anexo 1. Flujo de trabajo para la metodología de investigación



Anexo 2. Límites máximos permisibles de descarga al sistema de alcantarillado público

Parámetros Fisicoquímicos	Expresado como	Expresado como	Límite máximo permisible
Calcio	Ca	mg/L	No Aplica
Cobre	Cu	mg/L	1,0
Cromo	Cr	mg/L	0,5
Hierro	Fe	mg/L	25
Molibdeno	Mo	mg/L	No Aplica
Nitrógeno Total	N	mg/L	60,0
Níquel	Ni	mg/L	2,0
Plomo	Pb	mg/L	0,5
Potasio	K	mg/L	No Aplica
Sodio	Na	mg/L	No Aplica
Sólidos Totales	ST	mg/L	1 600,0
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/L	500,0
Fósforo Total	P	mg/L	15,0

Obtenido de: Revisión del Anexo 1 del libro del Acuerdo Ministerial 097 A: Límites máximos permisibles de descarga al sistema de alcantarillado público por parte de la norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua del Ecuador.

Anexo 3. Métodos empleados para la caracterización fisicoquímica de las aguas residuales en laboratorio acreditado por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano SAE con N° SAE LEN 12-001

Parámetro	Expresado	Método	Unidad
Nitrógeno Total	N	SM 4500 N	mg/L
Fósforo Total	PT	POE 7.2.10 SM 4500-BF	mg/L
Carbono Orgánico Total	COT	No reporta	-
Demanda Química de Oxígeno	DQO	POE 7.2.37 SM 5220 D	mg/L
Calcio	Ca	POE 7.2.51 SM 2340	mg/L
Cobre	Cu	POE 7.2.16 SM 3111-B	mg/L
Cromo	Cr	POE 7.2.16 SM 3111-B	mg/L
Hierro	Fe	POE 7.2.16 SM 3111-B	mg/L
Molibdeno	Mo	POE 7.2.16 SM 3111-B	mg/L
Nitrógeno amoniacal	N-NH ₃	SM 4500 N	mg/L
Oxígeno Disuelto	O. D	POE 7.2.84 SM 4500 O. G	mg/L
Níquel	Ni	POE 7.2.16 SM 3111-B	mg/L
Plomo	Pb	POE 7.2.16 SM 3111-B	mg/L
Potasio	K	POE 7.2.16 SM 3111-B	mg/L
Sodio	Na	POE 7.2.16 SM 3111-B	mg/L

SM: Standard Methods (método estándar).

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aksu, Z., & Açikel, Ü. (2000). Modelling of a single-staged bioseparation process for simultaneous removal of iron (III) and chromium (VI) by using *Chlorella vulgaris*. *Biochemical Engineering Journal*, 4(3), 229-238.
- Anyanwu, R. C., Rodriguez, C., Durrant, A., & Olabi, A. G. (2022). Evaluation of growth rate and biomass productivity of *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* under different LED wavelengths and photoperiods. *Sustainability*, 14(10), 6108.
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., & Wahidin, S. (2013). Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in freshwater microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 148, 373–378. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.08.162>
- Ayatollahi, S. Z., Esmaeilzadeh, F., & Mowla, D. (2020). Integrated CO₂ capture, nutrients removal and biodiesel production using *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 104763. doi:10.1016/j.jece.2020.104763
- Azrina Yaakob, M., Saphira Radin Mohamed, R. M., Al-Gheethi, A., ATiey, t., & Hashim Mohd Kassim, A. (2019). Optimising of *Scenedesmus* sp. biomass production in chicken slaughterhouse wastewater using response surface methodology and potential utilisation as fish feeds. *Environmental Science and Pollution Research*, 12089–12108.
- Baldev, E., Mubarak Ali, D., Pugazhendhi, A., & Thajuddin, N. (2021). Wastewater as an economical and ecofriendly green medium for microalgal biofuel production. *Fuel*, 294, 120484. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2021.120484>
- Barona Altamirano, A.C. (2014). Determinación del potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Tilulum y el Socavón del cantón Ambato. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador
- Blair, M. F., Kokabian, B., & Gude, V. G. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of environmental chemical engineering*, 2(1), 665-674.
- Brar, A., Kumar, M., Soni, T., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2021). Insights into the genetic and metabolic engineering approaches to enhance the competence of microalgae as biofuel resource: a review. *Bioresource Technology*, 339, 125597.
- Céspedes Bernal, D.N. (2019). Tratamiento terciario de aguas residuales no domésticas empleando *Chlorella* sp. y conversión de la biomasa microbiana por pirólisis lenta. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

- Chi, N. T. L., Duc, P. A., Mathimani, T., & Pugazhendhi, A. (2019). Evaluating the potential of green alga *Chlorella* sp. for high biomass and lipid production in biodiesel viewpoint. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 184–188. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2018.11.011>
- Davoodbasha, M. A., Pugazhendhi, A., Kim, J. W., Lee, S. Y., & Nooruddin, T. (2021). Biodiesel production through transesterification of *Chlorella vulgaris*: Synthesis and characterization of CaO nanocatalyst. *Fuel*, 300, 121018. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2021.121018>
- Gamarra Santos, G.J. (2019). Optimización de la producción de microalgas en fotobiorreactores externos. Universidad de Almería, España.
- Grompe, M., St.-Louis, M., Demers, S. I., Al-Dhalimy, M., Leclerc, B., & Tanguay, R. M. (1994). A Single Mutation of the Fumarylacetoacetate Hydrolase Gene in French Canadians with Hereditary Tyrosinemia Type I. *New England Journal of Medicine*, 331(6). <https://doi.org/10.1056/nejm199408113310603>
- Guatemal Nely. (2023). Obtención de lípidos a partir de biomasa de consorcio de microalgas cultivada en agua residual de origen acuícola.
- Gutiérrez-Casiano, N., Hernández-Aguilar, E., Alvarado-Lassman, A., & Méndez-Contreras, J. M. (2022). Removal of carbon and nitrogen in wastewater from a poultry processing plant in a photobioreactor cultivated with the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 57(7), 620-633.
- Han, L., Pei, H., Hu, W., Han, F., Song, M., & Zhang, S. (2014). Nutrient removal and lipid accumulation properties of newly isolated microalgal strains. *Bioresource Technology*, 165(C), 38–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.131>
- He, P.J., Mao, B.L.F., Shao, L.M., Lee, D.J., & Chang, J.S. (2013). The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource Technology*, 146, 562-568. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.111>
- Hee, C. W., Shing, W. L., & Chi, C. K. (2021). Effect of Lead (Pb) exposure towards green microalgae (*Chlorella vulgaris*) on the changes of physicochemical parameters in water. *South African Journal of Chemical Engineering*, 37, 252-255.
- Hernández Pérez, A., & Labbé, J.I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Hultberg, M., Jönsson, H. L., Bergstrand, K. J., & Carlsson, A. S. (2014). Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, 159, 465-467.

- Katircioğlu Sınmaz, G., Erden, B., & Şengil, I. A. (2023). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in alkaline condition for biodiesel feedstock after biological treatment of poultry slaughterhouse wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(3), 3237-3246.
- Kim, J., Lingaraju, B.P., Rheume, R., Lee, J.Y., & Siddiqui, K.F. (2010)., 15(4), 391-396.
- Lewandowski, I., Lippe, M., Montoya, J.C., Dickhöfer, U., Langenberger, G., Pucher, J., ... & Lippert, C. (2018). Primary production. In I, Lewandowski (Ed.), *Bioeconomy: Shaping the transition to a sustainable, biobased economy* (pp. 97-178).
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043–1049. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>
- Luna, L. M. G. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista cubana de química*, 19(2), 3-20.
- Lysenko, V., Kosolapov, A., Usova, E., Tatosyan, M., Varduny, T., Dmitriev, P., Rajput, V., Krasnov, V., & Kunitsina, A. (2021). Chlorophyll fluorescence kinetics and oxygen evolution in *Chlorella vulgaris* cells: Blue vs. red light. *Journal of Plant Physiology*, 258–259, 153392. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2021.153392>
- Martínez de la Cruz, M. O., Robles Heredia, J., Narváez García, A., Anguebes, F., Tamayo Ordoñez, M., Ruiz Marín, A., & Canedo López, Y. (2022). Desarrollo celular de *Chlorella vulgaris* en FBR de columna de burbujeo bajo distintos regímenes de luz. *Journal of Basic Sciences*, 72-84.
- Medano Barboza, J., & Guasumba Anchundia, L. F. (2022). Obtención de lípidos a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual de cerveza artesanal. Quito: Universidad Internacional SEK.
- Morales Amaral, M.D.M. (2016). Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos. Universidad de Almería, España.
- Musah, B. I., Wan, P., Xu, Y., Liang, C., & Peng, L. (2022). Contrastive analysis of nickel (II), iron (II), copper (II), and chromium (VI) removal using modified *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*: Characterization and recovery studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(5), 108422.
- Naderi, G., Tade, M.O., & Znad, H. (2015). Fotobiorreactor modificado para biofijación de dióxido de carbono por *Chlorella vulgaris* a diferentes intensidades de luz. *Ingeniería Química y Tecnología*, 38(8), 1371-1379.

- Navinta Huashuayo, N.L. (2019). Tasa de filtración (TF), en juveniles y adultos, de la almeja *Anodontites trapesialis* para las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Anabaena* sp. a diferentes concentraciones y temperaturas. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú.
- Olabi, A. G., Shehata, N., Sayed, E. T., Rodriguez, C., Anyanwu, R. C., Russell, C., & Abdelkareem, M. A. (2023). Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy. *Science of The Total Environment*, 854, 158689. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.158689>
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., & Shilton, A.N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Park, K.H., & Lee, C.G. (2001). Eficacia de la luz intermitente para aumentar la eficiencia fotosintética de los cultivos de microalgas sobre una densidad celular crítica. *Biotecnología e Ingeniería de Bioprocesos*, 6(3), 189.
- Patrinou, V., Tsolcha, O., Tatoulis, T., Stefanidou, N., Dourou , M., Moustaka-Gouni , M., . . . Tekerlekopoulou, A. (2020). Biotreatment of Poultry Waste Coupled with Biodiesel Production Using Suspended and Attached Growth Microalgal-Based Systems. *MDPI*, 1-28.
- Peter, A. P., Khoo, K. S., Chew, K. W., Ling, T. C., Ho, S. H., Chang, J. S., & Show, P. L. (2021). Microalgae for biofuels, wastewater treatment and environmental monitoring. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 2891-2904.
- Pittman, J.K., Dean, A.P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17-25.
- Pozzobon, V. (2022). *Chlorella vulgaris* cultivation under super high light intensity: An application of the flashing light effect. *Algal Research*, 68, 102874. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102874>
- Rajesh, K., Rohit, M.V., & Mohan, S.V. (2017). Microalgae-based carotenoids production. *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*. Elsevier. (pp. 139-147). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00007-2>
- Ramos, F.D., Díaz, M.S., & Villar, M.A. (2016). Biocombustibles. *Universidad Nacional del Sur-Conicet*, 25(147), 69-73.
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112. <https://doi.org/10.1002/bit.22033>
- Rodríguez González, A.M., & Serrano Luna, F.A. (2012). Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa y lípidos en cultivos de

- Chlorella vulgaris* Utex 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio. Universidad Industrial de Santander, España.
- Rodríguez, J. V. (2008). Análisis de Lípidos de Biomembranas. In Rosario Argentina (Issue March). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4691.1529>
- Romero Villegas, G.I. (2018). Producción de biomasa microalgal en exterior utilizando lixiviado como fuente de nutrientes. Universidad de Almería, España.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.148>
- Santos Montes, A.M., González Arechavala, Y., & Martín Sastre, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas.
- Sutherland, D.L., Howard Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., & Craggs, R.J. (2015). Mejora de la fotosíntesis de microalgas y la productividad en el tratamiento de aguas residuales en estanques de algas de alta velocidad para la producción de biocombustibles. *Bioresource Technology*, 184, 222-229.
- Tejeda-Benítez, L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería (Fac. Ing.)*, 43-54.
- Toalombo-Vargas, V. M., Borja Mayorga, D. F., Feijoo Álvarez, M. P., & Cedillo Espinoza, J. P. (2022). Los biocombustibles como alternativa de energía a partir de recursos renovables. *Polo del Conocimiento*, 386-407.
- Torres Palacio, P. C. (2021). Síntesis, propiedades, caracterización y aplicaciones químicas de novedosos disolventes eutécticos profundos: DES (Deep Eutectic Solvents). Universidad de Lleida. Departamento de Química, Física y Ciencias Ambientales y del Suelo [104], 1-120.
- Ummalyma, S. B., Chiang, A., Herojit, N., & Arumugam, M. (2023). Sustainable microalgal cultivation in poultry slaughterhouse wastewater for biorefinery products and pollutant removal. *Bioresource Technology*, 374, 128790. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2023.128790>
- Valdés Santiago, L., Ayala Islas, A., & Colli Mull, J.G. (2018). Hacia el reemplazo de pesticidas químicos: Explorando las microalgas para su uso en control biológico. En Fundación para la Educación Superior Internacional, A.C. (Ed.), *El impacto de la integración disciplinaria de la ingeniería y las ciencias químicas, en la innovación y el desarrollo sostenible* (pp. 366-382).

- Vega Ayala , A. S. (2022). OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA. Universidad Internacional SEK, 1-96.
- Vilardell, A. C. (1971). LIPOBIOQUÍMICA COMPARADA Estudio de lípidos y lipoproteínas en diversas especies animales.
- Vyas, A. P., Verma, J. L., & Subrahmanyam, N. (2010). A review on FAME production processes. *Fuel*, 89(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.08.014>
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Tiey, A., & Kassim, A. H. M. (2019). Optimising of *Scenedesmus* sp. biomass production in chicken slaughterhouse wastewater using response surface methodology and potential utilisation as fish feeds. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(12). <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04633-0>
- Yan, C., Zhao, Y., Zheng, Z., & Luo, X. (2013). Effects of various LED light wavelengths and light intensity supply strategies on synthetic high-strength wastewater purification by *Chlorella vulgaris*. *Biodegradation*, 24, 721-732.