







## TESIS DOCTORAL

*Biorrefinería de microalgas: una  
solución sostenible para el tratamiento  
de aguas residuales de origen industrial y  
la valorización energética de la biomasa  
obtenida*

**Autora:**

*Johanna Lucía Medrano Barboza*

**Directoras:**

*Rosalía Rodríguez Escudero*

*María Victoria Morales Pérez*

**Programa de Doctorado en Tecnologías Industriales:  
Química, Ambiental, Energética, Electrónica, Mecánica y de los  
Materiales.**

**Escuela Internacional de Doctorado**

2024



**Dña. Rosalía Rodríguez Escudero**, Profesora Titular de Universidad en el área de Ingeniería Química del Departamento de Tecnología Química, Energética y Mecánica de la Universidad Rey Juan Carlos,

**y**

**Dña. Victoria Morales Pérez**, Profesora Titular de Universidad del área de Ingeniería Química del Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Biorrefinería de microalgas: una solución sostenible para el tratamiento de aguas residuales de origen industrial y la valorización energética de la biomasa obtenida” constituye la memoria que presenta Dña. Johanna Medrano Barboza para aspirar al grado de Doctor por la Universidad Rey Juan Carlos, y que ha sido realizado en los laboratorios de La Facultad de Arquitectura e Ingenierías de la Universidad Internacional SEK- Ecuador en conjunto con laboratorios del Grupo de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos bajo nuestra dirección. Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Móstoles, a 02 de abril de dos mil veinticuatro.

Fdo.: Dra. Rosalía Rodríguez Escudero

Fdo.: Dra. María Victoria Morales Pérez



*Por un medioambiente mejor para Amanda*





## Agradecimientos

A Dios y Jesús de la Misericordia, por darme vida, salud, fuerza y constancia para finalizar esta meta planteada. Que este trabajo sirva para nutrir mi actividad docente y formar profesionales integrales con conciencia ambiental.

A mi esposo Pedro David, y mi hija Amanda Lucía, por su apoyo y compañía en cada día y etapa de este trabajo doctoral. No hay palabras que puedan expresar todo lo que significan para mí. Ustedes siempre fueron, son y serán siempre mi mejor motor para alcanzar las metas que me plantee.

A mis padres y hermanos, porque aún en la distancia su apoyo es parte fundamental de mi vida y han sido promotores y partícipes de todos los logros alcanzados.

A mis tías, tíos y primos que siempre estuvieron pendientes de mi avance en mis estudios doctorales.

A mis tesistas: Javier, Kevin, Paula, Luís, Alisson Vega, Thaís, Samuel, Valeria, Nely, Alisson Guerrero y Aytana con quiénes desde el año 2018 hemos sacado adelante esta investigación que sienta las bases y aporta un grano de arena para el cambio en la matriz energética de Ecuador hacia una biorrefinería basada en microalgas. También a Lesly y Paúl que inicialmente participaron como estudiantes de apoyo a los proyectos de investigación de microalgas en la UISEK.

A mis tutoras Dra. Rosalía Rodríguez y Dra. Victoria Morales por su mano amiga, guía y acompañamiento durante estos seis años de estudios de doctorado.

A Alejandra, Silvia, Jennifer, Irene, Juan Manuel, Jorge, Patricia y todos aquellos que me acompañaron y ofrecieron su apoyo en mis estancias en la URJC.

A los docentes del Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos y de la Escuela Internacional de Doctorado que me ofrecieron su ayuda en los cursos recibidos y durante mis estancias en Madrid.

A mis amigas y amigos de La Universidad del Zulia (LUZ), Yadira, Beatriz, Mariale, Ida, Yolanda y Aurimar, quienes en la distancia me acompañan con sus consejos y experiencias. Con una especial mención a mi querida amiga Auri, quien cada año me apoyaba con diligencias en la URJC.

A mis padres en España, Micaela y Miguel, que siempre tuvieron las puertas de su hogar y su corazón abiertas para mí y mi familia, me acompañaron en las estancias y enseñaron sobre Madrid y sus encantos.

A los colegas de la Facultad de Arquitectura e Ingenierías de la UISEK por su apoyo durante este tiempo de formación profesional.

A la Universidad Internacional SEK, su personal docente, administrativo y de mantenimiento, por su soporte en este crecimiento personal y profesional, con el apoyo con becas doctorales y proyectos de investigación para sacar adelante la experimentación de este trabajo y siempre SER MEJORES.

A la Universidad Rey Juan Carlos, por su apoyo en mi formación doctoral y financiamiento de los experimentos de este trabajo doctoral.

A todos quienes directa o indirectamente ayudaron a la consecución de este proyecto de investigación.

*¡MIL GRACIAS!*

Johanna

## **Publicaciones surgidas de la presente investigación**

Medrano-Barboza, J.; Herrera-Rengifo, K.; Aguirre-Bravo, A.; Ramírez-Iglesias, J.R.; Rodríguez, R.; Morales, V. Pig Slaughterhouse Wastewater: Medium Culture for Microalgae Biomass Generation as Raw Material in Biofuel Industries. *Water* 2022, 14, 3016. <https://doi.org/10.3390/w14193016>.

## **Comunicaciones a Congresos Internacionales**

Optimisation of *Chlorella vulgaris* hydrothermal liquefaction for bio crude upgrading. 27th European Biomass Conference & Exhibition (EUBCE 2019), Lisboa, Portugal Poster. Del 27 al 30 de mayo de 2019.

Obtención de lípidos de microalgas cultivadas en agua residual de cervecería. Ponencia en XXVI Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2023. Quito – Ecuador del 23 al 25 de agosto de 2023.

## **Proyectos de investigación en los que se ha participado**

Obtención de biodiesel a partir de microalgas y residuos madereros. Entidad financiadora: Universidad Internacional SEK. Financiación total: 10000 USD \$ Vigencia: 2017-2018. Código de proyecto de Investigación: P101617\_2.2

Obtención de biomasa destinada a la producción de biocombustibles a partir de microalgas y residuos madereros. Entidad financiadora: Universidad Internacional SEK. Financiación total: 8755.40 USD \$ Vigencia: 2018-2019. Código de proyecto de Investigación: P101617\_2.2.

Obtención de biocombustibles de origen microalgal y vegetal. Entidad financiadora: Universidad Internacional SEK. Financiación total: 9991.12 USD \$ Vigencia: 2019-2020. Código de proyecto de Investigación: P101617\_2.2.

Obtención de biocombustibles a partir de microalgas y residuos orgánicos. Entidad financiadora: Universidad Internacional SEK. Financiación total: 7000 USD \$ Vigencia: 2020-2021. Código de proyecto de Investigación: P101617\_2.2.

Análisis de lípidos de microalgas cultivadas en agua residual industrial. Entidad financiadora: Universidad Internacional SEK. Financiación total: 15500 USD \$ Vigencia: 2021-2023. Código de proyecto de Investigación: P101617\_2.2.

Análisis de lípidos de microalgas cultivadas en agua residual de la industria acuícola. Entidad financiadora: Universidad Internacional SEK. Financiación total: 8000 USD \$. Vigencia: 2023-2024. Código de proyecto de Investigación: P101617\_2.2.

## **Reconocimientos**

Exhibición itinerante “Mujeres protagonistas de la Ciencia” y miembro del nodo UISEK de la Red Ecuatoriana de Mujeres Científicas REMCI. Junio 2023.

Mejores prácticas Docentes 2019. Premios Felipe Segovia Olmo 2019. Universidad Internacional SEK.



## ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción .....	8
1.1 Panorama energético actual y objetivos de desarrollo sostenible.....	8
1.2 Biorrefinerías .....	12
1.3 Problemática actual de las aguas residuales industriales.....	13
1.3.1 Tratamientos de aguas residuales convencionales .....	13
1.3.2 Aguas residuales industriales.....	17
a) Aguas residuales de la industria porcina.....	18
b) Aguas residuales de cerveza artesanal.....	19
c) Aguas residuales de piscicultura .....	21
1.4 Microalgas.....	23
1.4.1 Selección de las especies de estudio .....	24
1.4.2 Cultivo de microalgas.....	27
1.4.3 Tratamiento de aguas residuales con microalgas.....	29
1.5 Aprovechamiento energético de la biomasa microalgal generada .....	30
1.5.1 Producción de biocombustibles a partir de microalgas.....	30
1.5.2 Obtención de lípidos y ácidos grasos libres .....	33
1.5.3 Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos.....	36
2. Objetivos.....	41
3. Metodología .....	45
3.1 Tratamiento de aguas residuales de origen industrial mediante microalgas....	45
3.1.1 Recolección de aguas residuales a tratar .....	45
3.1.2 Obtención del inóculo.....	46
3.1.3 Preparación del medio de cultivo e inóculo .....	46
3.1.4 Siembra en fotobiorreactores.....	46
3.1.5 Crecimiento celular y peso seco .....	47
3.1.6 Caracterización elemental de la biomasa microalgal .....	48

3.1.7	Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales.....	48
3.2	Aprovechamiento energético de la biomasa obtenida .....	49
3.2.1	Extracción de lípidos totales .....	49
3.2.2	Extracción de ácidos grasos libres (AGL).....	50
3.2.3	Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).....	50
4.	Resultados y discusión.....	55
4.1	Tratamiento de aguas residuales de origen industrial mediante microalgas....	55
4.1.1	Caracterización del agua residual antes y después del cultivo de microalgas .....	55
a)	Agua residual de la industria porcina.....	55
b)	Agua residual de industria cervecera.....	69
c)	Agua residual de piscicultura .....	83
4.1.2	Crecimiento de la biomasa en las aguas residuales de estudio.....	96
a)	Agua residual de la industria porcina.....	96
b)	Agua residual de industria cervecera.....	104
c)	Agua residual de piscicultura .....	113
4.2	Aprovechamiento energético de la biomasa obtenida .....	121
4.2.1	Extracción de lípidos totales de las biomosas obtenida .....	122
a)	Agua residual de industria porcina .....	122
b)	Agua residual de industria cervecera.....	128
c)	Agua residual de piscicultura .....	132
4.2.2	Obtención de ácido grasos libres (AGL) .....	136
a)	Agua residual de industria porcina .....	136
b)	Agua residual de industria cervecera.....	138
c)	Agua residual de piscicultura .....	139
4.2.3	Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).....	141
4.2.3.1	Método indirecto.....	142
a)	Agua residual de industria porcina .....	142

b)	Agua residual de la industria cervecera .....	149
c)	Agua residual de piscicultura .....	154
4.2.3.2	Método directo .....	161
a)	Agua residual de industria porcina .....	161
b)	Agua residual de la industria cervecera .....	163
c)	Agua residual de piscicultura .....	165
4.3	Cultivo de consorcio de microalgas en agua residual de industria porcina.....	168
4.3.1	Tratamiento de las aguas residuales de la industria porcina con consorcio de microalgas.....	170
4.3.2	Aprovechamiento energético de la biomasa obtenida .....	184
4.3.2.1	Obtención de lípidos totales.....	184
4.3.2.2	Obtención de ácido grasos libres (AGL) .....	187
4.3.2.3	Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).....	188
a)	Método indirecto .....	188
b)	Método directo .....	192
5.	Conclusiones.....	197
6.	Bibliografía.....	203
7.	Anexos .....	224





## **Resumen de abreviaturas**

AE: acetato de etilo

AGI: ácidos grasos insaturados

AGL: ácidos grasos libres

AGS: ácidos grasos saturados

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

ARFP: Agua residual de faenamiento porcino

CM (1:2): cloroformo:metanol (1:2)

COD: carbono orgánico disuelto

COT: carbono orgánico total

DBO: demanda biológica de oxígeno

DEP: disolventes eutécticos profundos

DES: deep eutectic solvents – por sus siglas en inglés

DQO: demanda química de oxígeno

EDAR: estación depuradora de aguas residuales

ERO: especies reactivas de oxígeno

FAME: Ésteres metílicos de ácidos grasos

GEI: Gases de efecto invernadero

HRAP: High rate algal ponds – por sus siglas en inglés

IPCC: Intergovernmental Panel on Climate Change - por sus siglas en inglés

MAE: Ministerio de Ambiente de Ecuador

MAATE: Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica

MCH: metilciclohexano

NT: nitrógeno total

NTD: nitrógeno total disuelto

ODS: Objetivos de desarrollo sostenible

OLADE: Organización Latinoamericana de Energía

ONU: Organización de las naciones Unidas

PT: fósforo total

PTAR: plantas de tratamiento de aguas residuales

PTD: fósforo total disuelto

RMN-<sup>1</sup>H: Resonancia Magnética Nuclear de protón

SDBS: sodium dodecyl benzene sulfonate

SST: sólidos suspendidos totales

TRH: tiempo de retención hidráulico

TRS: tiempo de retención de sólidos

UV: ultravioleta

# RESUMEN



### Resumen

La sociedad de hoy en día ha crecido considerablemente y tiene como objetivo la mejora de la calidad de vida. Este crecimiento también ha traído como consecuencia un incremento en la demanda energética basada principalmente en el uso de fuentes no renovables de energía de origen fósil. Sin embargo, el impacto a nivel ambiental que ha tenido lugar ha obligado a idear e investigar otras fuentes energéticas más limpias para mitigar los impactos ambientales que la producción energética implica.

Desde hace más de 50 años se empezó a investigar en el uso de combustibles más verdes que presentasen la misma eficiencia de los combustibles de origen fósil, pero empleando materias primas de origen biológico para reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera; es así como se pensó en el biodiésel como una posible alternativa que con el paso de los años ha demostrado su potencialidad a nivel automotor y ambiental. Sin embargo, siguen siendo escasos los países que verdaderamente han cambiado su matriz energética y que han alcanzado a cubrir las metas de los Objetivos de Desarrollo Sostenibles (ODS) previstas para el 2030.

En la intensa búsqueda de materias primas para la obtención de biocombustibles, los microorganismos, y en especial las microalgas, se presentan como una alternativa de materia prima interesante por las múltiples ventajas asociadas a su fácil crecimiento en diferentes cuerpos de agua y condiciones climáticas; sin embargo, a escala industrial, las biorrefinerías basadas en microalgas presentan problemas en las diferentes etapas de la producción para obtener volúmenes de biocombustibles que puedan reemplazar la demanda que hoy en día se cubre con los combustibles de origen fósil. Además, los balances energéticos y económicos de las biorrefinerías basadas en microalgas presentan problemas en las diversas etapas implicadas que requieren de mucha energía y que globalmente, hacen que resulte un proceso más costoso en comparación con la refinería tradicional del petróleo.

La etapa de cultivo representa una fase crucial para la obtención de biomasa de microalgas; sin embargo, el uso de grandes volúmenes de agua potable ha hecho que se busquen alternativas de menor impacto ambiental. Este inconveniente ha sido parcialmente subsanado con el uso de aguas residuales que permite, además, abordar la biorremediación del agua empleada, lo que constituye por sí mismo un objetivo fundamental de sostenibilidad ambiental. Por otra parte, el secado constituye una etapa importante para la obtención de la biomasa de microalgas y la posterior extracción de productos de mayor valor añadido, pero su

## Resumen

---

elevado requerimiento energético afecta el balance energético de toda la biorrefinería. Pese a la búsqueda de opciones que limiten o sustituyan por completo la etapa de secado, las alternativas planteadas (secado solar, rotatorio, de flujo cruzado, por frío, asistido por microondas, etc.) siguen siendo costosas para la producción a escala industrial. Otras investigaciones han estudiado la opción de trabajar con la biomasa húmeda para evitar las etapas de secado; y, aunque a escala piloto han tenido buenos resultados, a escala industrial sigue siendo una opción que afecta el rendimiento de los productos de interés. En el caso estudiado de una biorrefinería para la obtención de biocombustibles líquidos como el biodiésel, será necesario la extracción de los lípidos; otro de los cuellos de botella en las biorrefinerías de microalgas se encuentra en el uso de disolventes orgánicos que son tóxicos para el hombre y el ambiente; por lo que se ha trabajado en la búsqueda de disolventes más respetuosos con el medioambiente e igualmente efectivos para la extracción de los lípidos.

En general, para que una biorrefinería de microalgas sea eficiente, se requiere de la obtención de la mayor cantidad posible de bioproductos de alto valor añadido para tratar de igualar en eficiencia, energía y coste a la refinería del petróleo; por ello el uso de la biomasa microalgal debe ser integral y orientado al aprovechamiento de toda la biomasa, y así reducir o eliminar por completo la generación de residuos con miras a la economía circular en este tipo de instalaciones.

Varios países de la Unión Europea y América del Norte han participado activamente en la investigación y desarrollo de las actuales biorrefinerías del mundo; sin embargo, en Latinoamérica la realidad es que el desarrollo de las biorrefinerías es incipiente, basado en el uso de biomasa de segunda y tercera generación. En Ecuador, la producción de energía a partir de fuentes renovables no convencionales se centra en el uso de bagazo de caña de azúcar, leña, palma aceitera y piñón, que representan tan solo el 2 % de la energía generada en el país.

El objetivo principal de este trabajo doctoral es desarrollar una biorrefinería basada en el uso de microalgas para el tratamiento de tres tipos de aguas residuales de origen industrial y la producción de biomasa de dos especies de microalgas en fotobiorreactores expuestos a la intemperie. Conectado con este objetivo, otro propósito fundamental del presente trabajo es la obtención de biodiésel a partir de los lípidos y ácidos grasos libres (AGL) extraídos de la biomasa algal para la valorización de dicha biomasa.

Para cumplir dichos objetivos, en primer lugar, se pretende usar como medios de cultivo dichas aguas residuales industriales, para reducir los costes asociados al uso de agua y

## Resumen

---

nutrientes durante la etapa de cultivo y, además, integrar esta etapa en el tratamiento de aguas residuales industriales. En esta etapa, se seleccionaron las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. y se cultivaron en aguas residuales de las industrias porcina, cervecera y de piscicultura, aprovechando los nutrientes que estas aguas poseen para así poder prescindir del uso de nutrientes comerciales. Una vez cosechada la biomasa, se analizaron los parámetros fisicoquímicos de los sobrenadantes para evaluar la capacidad de biorremediación de las especies de estudio sobre cada tipo de agua residual empleada, considerando la eliminación de macro y micronutrientes y metales pesados, y verificando el cumplimiento de los límites permisibles para el vertido al sistema de alcantarillado que establece la normativa ambiental ecuatoriana vigente según el Acuerdo Ministerial 097- A de noviembre del 2015.

De la etapa de cultivo cabe destacar que el crecimiento de microalgas en agua residual de industria porcina (específicamente el agua de la matanza de cerdos – o faenamiento porcino como se conoce en Ecuador), contó con micro y macronutrientes necesarios para el crecimiento de especies individuales *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp., alcanzando productividades de biomasa de 0,004-0,018 g/L-d y 0,02-0,037 g/L-d, respectivamente. Al cabo de 11-13 días se alcanzaron eliminaciones entre 50-60 % de NT, PT y COT, demostrando su potencial para la biorremediación de este tipo de aguas.

En el cultivo de microalgas con agua residual de la industria cervecera se alcanzaron productividades de biomasa de 0,0435 g/L-d y 0,0411 g/L-d para las especies individuales *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp., respectivamente. Los tiempos de los monocultivos de microalgas variaron entre 12-14 días con una buena eliminación de NT, pero bajas eliminaciones de PT y COT, por lo que su potencial para la biorremediación es limitado.

Por último, en el cultivo de microalgas en agua residual de piscicultura se alcanzaron productividades de biomasa de 0,0489 g/L-d y 0,0299 g/L-d para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp., respectivamente. Al cabo de 12-13 días se alcanzaron los valores más altos de eliminación de NT, PT y COT (> 90 %), por lo que su potencial para la biorremediación de este tipo de aguas es muy bueno; además, hubo eliminación de 57-77 % de Fe.

Posteriormente a esta etapa de cultivo, se realizó la extracción de lípidos de las biomásas cosechadas. Se trabajó con biomasa seca y biomasa húmeda de dichas microalgas para obtener y caracterizar su fracción lipídica en términos de lípidos totales y ácidos grasos libres (AGL). Para las microalgas crecidas con aguas residuales de la industria porcina, los mejores disolventes extractores de lípidos totales fueron la mezcla cloroformo:metanol (1:2) [CM(1:2)],



## Resumen

---

metilciclohexano y acetato de etilo (AE) con extracciones en el rango de 14-21 % de lípidos en los cultivos monoalgales. Para la extracción de AGL, el rango de extracción varía de 19-34 % con los mismos disolventes extractores para ambas especies. Para realizar una valorización de la biomasa obtenida en cada uno de los tratamientos de aguas residuales con las microalgas de estudio se realizó la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y así determinar el rendimiento y conversión hacia la obtención de biodiésel por gravimetría y mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H). Mediante la reacción de transesterificación se alcanzaron rendimientos de FAME en el rango de 44-89 % para la base seca a partir de las extracciones indirectas (de lípidos y AGL) en los cultivos monoalgales, con mejores porcentajes empleando la resina comercial CT-269 como catalizador. Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H confirmaron la presencia de picos característicos, con ausencia de picos de protones glicéridos entre 4,2-4,3 ppm y la presencia de picos característicos de grupos carbonil metilenos (-CH<sub>2</sub>-) a 2,2 ppm y picos de protones metoxi (CH<sub>3</sub>-) a 3,6 ppm en los cultivos monoalgales, presentando conversión a FAME en el rango de 70-98 % con mejores valores para la resina comercial CT-269.

Para las microalgas crecidas en aguas residuales de la industria cervecera, se observó que los mejores disolventes extractores de lípidos totales fueron la mezcla CM (1:2), metanol y etanol con extracciones en el rango de 10-19 % de lípidos en los cultivos a partir de la biomasa seca. La extracción de AGL varió entre 11-42 % con los mismos disolventes extractores para ambas especies. El rendimiento de FAME estuvo en el rango de 19-71 % para la base seca a partir de las extracciones indirectas (de lípidos y AGL) en los cultivos monoalgales, con mejores porcentajes empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador. El valor obtenido mediante RMN indicó una conversión a FAME en el rango de 46-98 % con mejores valores para la resina comercial CT-269.

Por último, para el crecimiento de microalgas crecidas en aguas residuales de la piscicultura, los mejores disolventes extractores de lípidos totales fueron la mezcla CM (1:2) y AE para *Chlorella vulgaris* con extracciones en el rango de 11-23 % de lípidos a partir de la biomasa seca. Para *Scenedesmus* sp. destacaron los alcoholes y la mezcla CM (1:2) con extracciones en el rango de 18-30 % de lípidos totales. Para la extracción de AGL, el rango de extracción varía de 38-46 % para *C. vulgaris* empleando la mezcla CM (1:2), AE y hexano como disolventes extractores; para *Scenedesmus* sp. el rango de extracción de AGL es similar con valores de 38-42 % para los disolventes CM (1:2), AE y metanol. El rendimiento a FAME estuvo en el rango de 19-89 % para la base seca a partir de las extracciones indirectas (de lípidos y

## Resumen

---

AGL) en *C. vulgaris* y de 11-67 % para *Scenedesmus* sp., con mejores porcentajes empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador. También se confirmó la conversión a FAME en el rango de 51-88 % con mejores valores para el catalizador homogéneo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Considerando que en el agua residual de la industria porcina se obtuvo un mejor panorama de obtención de biomasa, biorremediación de aguas y contenido de lípidos, posteriormente se seleccionó este tipo de agua residual para desarrollar un cultivo en consorcio de las dos especies de microalgas estudiadas. Además, se tuvo en cuenta que en Ecuador el agua residual resultante de la matanza de porcinos a escala artesanal y su vertido directo a cuerpos de aguas o alcantarillado constituye una actividad del alto impacto ambiental. Por estos motivos se procedió a realizar el cultivo de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en consorcio en este agua residual, alcanzando una productividad de biomasa de 0,0398 g/L·d. Pasados 13 días de cultivo se alcanzaron altos porcentajes de eliminación de macronutrientes NT, PT y COT (> 60 %) y más del 80 % del contenido de especies de Fe y Cr, por lo que su potencial para la biorremediación de este tipo de aguas de alta carga orgánica es bueno.

Para el cultivo en consorcio el mejor disolventes extractor de lípidos totales fue la mezcla CM (1:2) con extracciones de 21,02 ± 0,97 % de lípidos en los cultivos a partir de la biomasa seca. Para la extracción de AGL, el rango de extracción varió de 32-34 % para etanol, metilciclohexano y metanol como disolventes extractores. La reacción de transesterificación alcanzó rendimientos hacia FAME en el rango de 72-95 % a partir de las extracciones indirectas de AGL, con mejores porcentajes empleando la resina comercial como catalizador. La conversión a FAME a partir de AGL estuvo en el rango de 32-51 % con mejores valores para el catalizador heterogéneo.

# **INTRODUCCIÓN**

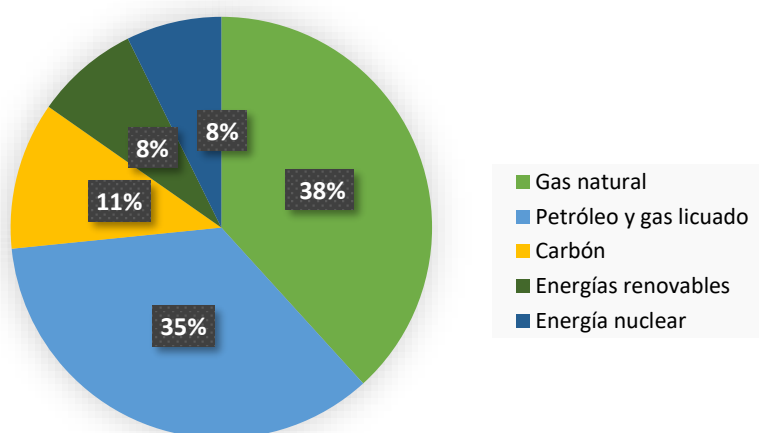


### 1. Introducción

#### 1.1 Panorama energético actual y objetivos de desarrollo sostenible

La energía es un requerimiento crucial en el desarrollo económico, tecnológico y social de todas las naciones [1]. La búsqueda de fuentes energéticas no renovables es constante, pero su producción no marcha a la misma velocidad y algunos de estos recursos no renovables están en déficit, lo que obliga a los países a establecer estrategias para diversificar sus fuentes energéticas.

Con el transcurso de los años, el crecimiento desbordado de la población y de las actividades industriales han incidido directamente en el consumo de energía y en las formas de producción de las mismas, siendo los combustibles fósiles la fuente primaria de obtención [2,3]. Su uso desmedido ha traído consigo la intensa búsqueda y explotación de espacios naturales que han afectado a varios ecosistemas a nivel mundial; además se conoce claramente que el uso de estas formas de energías genera gases de efecto invernadero (GEI) como el monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), cuyas emisiones están asociadas a daños ambientales y a la salud [1]. Muchos aspectos económicos, políticos, sociales y técnicos giran en torno a la explotación, uso y precios de los combustibles fósiles, variando constantemente y condicionando cada año la economía de todos los países y sus habitantes [4]. Sin embargo, pese al desarrollo de energías limpias, más del 80 % de la energía consumida en el mundo procede del petróleo, gas y carbón, como se muestra en la Figura 1.1 [5].



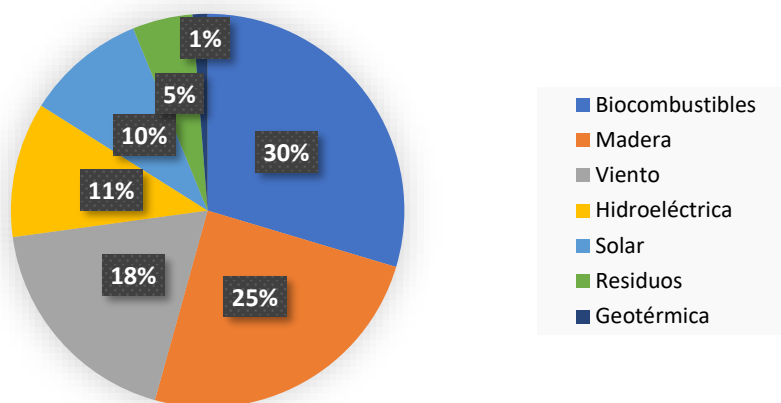
**Figura 1.1** Distribución de las fuentes de energía primaria mundial para octubre del 2023 [6].

El uso desmedido de dichas fuentes no renovables ha tenido un impacto muy grande desde el año 1980 sobre el medioambiente. Las emisiones de GEI produjo fenómenos ambientales

## Introducción

como el cambio climático y calentamiento global, cuyos efectos se sienten cada vez más en todo el mundo. Las medidas tomadas por algunos países en las reuniones de carácter mundial para decidir sobre el planeta (Protocolo de Kyoto, 1996; Acuerdo de París, 2015; entre otros), han logrado captar el compromiso de varios países para reducir sus emisiones y establecer estrategias para garantizar la seguridad energética de cada nación. Sin embargo, el último informe del Panel Intergubernamental del Cambio Climático (Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC por sus siglas en Inglés), reconoce la relación de las actividades humanas, industriales y el impacto del CO<sub>2</sub> y los gases tóxicos con el cambio climático y los efectos negativos sobre los ecosistemas y la biodiversidad, razón por la cual es inminente la aplicación de soluciones ecológicas y tecnologías verdes en los sectores productivos más importantes [2].

Hasta la fecha, diversos estudios soportan el uso de energías renovables o energías limpias que incluyen la energía solar, hidráulica, geotérmica, eólica, de la biomasa, entre otras; por ser respetuosas con el medioambiente, tener un mínimo impacto ambiental y soportar una economía neutral del carbono [1], pero estas apenas logran cubrir un 18 % de la demanda energética actual, siendo la energía generada a partir de los biocombustibles y residuos, el tipo de energía que aporta cerca del 10 % al consumo energético mundial [5,7]. Dentro de las energías renovables, desde hace algunos años destaca la energía procedente de la biomasa, llamando la atención de muchos investigadores dado su diversidad de fuentes y formas de aprovechamiento, además de ser la fuente más abundante de energía renovable hasta la fecha, aportando cerca del 30 % de la energía renovable consumida a nivel mundial [7].



**Figura 1.2** Distribución de las fuentes de energía renovable a nivel mundial para septiembre del 2023 [6].

La biomasa incluye diversos tipos de residuos orgánicos como los residuos postcosecha, residuos madereros, estiércol, microorganismos, etc. Éstos se producen en todos los países y

## Introducción

---

su uso ayuda a reducir la dependencia de importación de combustibles contribuyendo a la seguridad energética de las naciones. La energía procedente de la biomasa conocida como bioenergía, tiene la posibilidad de ser utilizada mediante consumos directos basados en la quema de biomasa para uso térmico residencial o industrial; e indirectos basados en la conversión a otros tipos de energía como térmica o eléctrica [1].

Entre las ventajas del uso de la biomasa destacan principalmente la disminución de las emisiones de GEI debido a la captura de CO<sub>2</sub> durante el proceso fotosintético, conduciendo a un ciclo de carbono neutro y actuando como un sumidero de carbono. También, ayuda a la fertilización de suelos. Sin embargo, algunos estudios indican que el uso de biomasa afecta negativamente al medioambiente por el deterioro ambiental que esta implica (deforestación, degradación de suelos y masas de agua, pérdida de biodiversidad), incluso incrementando el precio de los alimentos [7]. Por esta razón, desde hace algunos años se ha estudiado la utilización de la biomasa procedente de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y microalgas) por no presentar las desventajas asociadas a la biomasa procedente de cultivos o recursos madereros.

Entre los microorganismos que constituyen la biomasa, las microalgas se presentan como organismos de rápido crecimiento y productividad reconocidos ampliamente por ser, junto con el fitoplancton, la mayor fuente de oxígeno del planeta por su capacidad de fijar el CO<sub>2</sub> durante su actividad fotosintética [8], y de forma simultánea, actúan como sumidero de CO<sub>2</sub>, razón por la cual la obtención de biodiésel a partir de lípidos de microalgas es considerada como una forma de combustible neutro en carbono [2]. Diversos estudios sostienen que aunque requieren de grandes cantidades de agua fresca para sus cultivos a gran escala, pueden cultivarse en aguas salobres, marinas y residuales de diversa procedencia [3,9].

Ecuador es un pequeño país petrolero localizado en América del Sur conocido por su biodiversidad y atractivo turístico en diversas regiones del país (Amazonía, costa, sierra y región insular). También es conocido por ser exportador de petróleo, camarón, bananas y flores [10]. La producción de petróleo en Ecuador para el 2022 se estimó en 481 M barriles/día, de los cuales aproximadamente el 24,1 % se dedica a la transformación interna en refinerías para consumo energético nacional y el 62,3 % se destina a exportación [11].

Desde el punto de vista energético, Ecuador, al ser un país rico en petróleo, opta por el uso de fuentes de energía no renovables. Sin embargo, este país latinoamericano inició la producción de biodiésel a partir de la palma africana en el año 2005 con fines de exportación. A partir del 2013 se iniciaron las mezclas de 5 % biodiésel y 95 % gasolina que representan la

## Introducción

gasolina “Ecopaís” (5 % v/v - B5), la cual proporcionalmente se incrementaría hasta la mezcla 15 % v/v (B15); pero que, hasta la fecha, únicamente se comercializa en las regiones costeras del país por su baja eficiencia en motores de combustión en las regiones altas del Ecuador.

Otros proyectos a escala piloto se han desarrollado desde el año 2016 en las provincias de Galápagos y Santo Domingo de los Tsáchilas a partir de la transesterificación del piñón (*Jatropha curcas*) con fines de generación de electricidad autosostenible [4]. Con estas cifras, el uso de energías renovables en Ecuador representa cerca del 10 % de la energía que se produce en el país [11]. En Ecuador, se han identificado diversas microalgas y cianobacterias autóctonas en varios cuerpos de aguas de las diferentes regiones ecuatorianas; sin embargo, el estudio de biorrefinerías basadas en microalgas se encuentra únicamente en etapa de investigación a nivel de universidad.

Sin embargo, desde el año 2015 existe un compromiso adquirido por Ecuador y todos los países miembros de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), en el que se aprobaron 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (Figura 1.3) para trabajar hasta el año 2030 en una agenda que promueva acciones para poner fin a la pobreza y mejorar la calidad de vida de las personas con un enfoque sostenible en aspectos sociales, ambientales y económicos. Dentro de estos objetivos destacan algunos particularmente enfocados en la protección del planeta y recursos naturales como el agua [12]. Ecuador ha ratificado su compromiso con esta Agenda y desde su Asamblea Nacional, Gobiernos Autónomos Descentralizados, sector privado y academia han sumado esfuerzos para trabajar en conjunto por estas acciones incentivando al uso de energías renovables en los diversos sectores [13].



**Figura 1.3** Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Organización de las Naciones Unidas.

También, el gobierno ecuatoriano trabaja de la mano con algunas organizaciones como la Organización Latinoamericana de Energía (OLADE) uniendo esfuerzos para la integración



energética de la región, asesorando e impulsando la cooperación entre los países miembros para contribuir al desarrollo sostenible y seguridad energética en Latinoamérica, con proyectos de energía útil, eficiencia energética, electromovilidad, así como otros proyectos energéticos y de economía bajas en carbono, enmarcados en los ODS [14].

### 1.2 Biorrefinerías

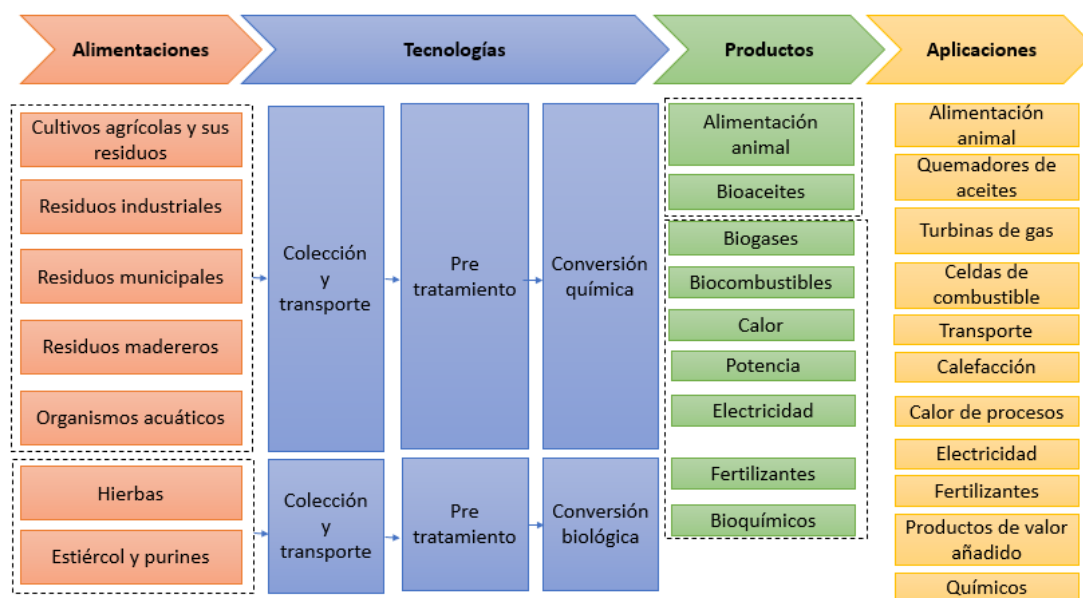
Se define como Biorrefinería a la instalación encargada de dar un procesamiento sostenible e integral a la biomasa para la obtención de bioproductos (pigmentos, colorantes, alimentos para humanos y animales, biomateriales, etc.) y bioenergía (biocombustibles, calor u otra forma de energía) [15,16]. Este término de biorrefinerías no es nuevo, sus primeros reportes datan de los años 80 en el que se publicó el primer artículo científico en incluir el término. Desde entonces se han desarrollado tecnologías para el aprovechamiento de la biomasa mediante la valorización de sus bioproductos, tomando en consideración aspectos económicos, sociales y ambientales [17]. La Figura 1.4 muestra diversas materias primas, tecnologías, bioproductos y aplicaciones de una biorrefinería. Dentro de las materias primas que pueden ser procesadas en una biorrefinería se encuentran los cultivos energéticos (caña de azúcar, remolacha, maíz, etc.), materiales lignocelulósicos (residuos madereros, agrícolas, residuos post cosechas, etc.), organismos acuáticos (macroalgas y microalgas), residuos industriales, municipales y animales. Estas materias primas pueden ser transformadas mediante procesos químicos y/o biológicos para la obtención de bioproductos y/o bioenergía [17].

Hasta la fecha, muchos investigadores han enfocado sus estudios hacia la reducción del impacto económico y ambiental que implica la transformación de la biomasa en bioproductos y/o biocombustibles probando tecnologías disponibles de la refinería o petroquímica, o desarrollando nuevas tecnologías más eficientes para esta transformación; sin embargo, pese a todos los esfuerzos y avances alcanzados, las biorrefinerías aún no están totalmente comercializadas debido a los problemas que implica la transformación de las diversas materias primas que constituyen la biomasa y que no le permiten competir a nivel productivo y económico con la industria petrolera [17].

En la actualidad, los conceptos de química verde, biorrefinería sostenible y economía circular están en boga en el mundo de las microalgas debido a la disminución de impactos ambientales que presenta este tipo de industrias y que en el marco de dichos conceptos se pueden resolver a la vez los numerosos cuellos de botella y retos que presentan las biorrefinerías basadas en biomasa de microalgas [18,19]. Para mejorar la eficiencia económica

## Introducción

y ambiental de las biorrefinerías de microalgas, el uso de aguas residuales urbanas, industriales o de ganadería son algunos ejemplos de aguas que se han usado como medios de cultivos de bajo coste para sustituir el uso de aguas frescas. Las microalgas son capaces de aprovechar los nutrientes que contienen dichas aguas residuales y a su vez biorremediarlas, para la producción de biomasa microalgal [20–22].



**Figura 1.4** Materias primas, tecnologías y productos de una biorrefinería [17].

### 1.3 Problemática actual de las aguas residuales industriales

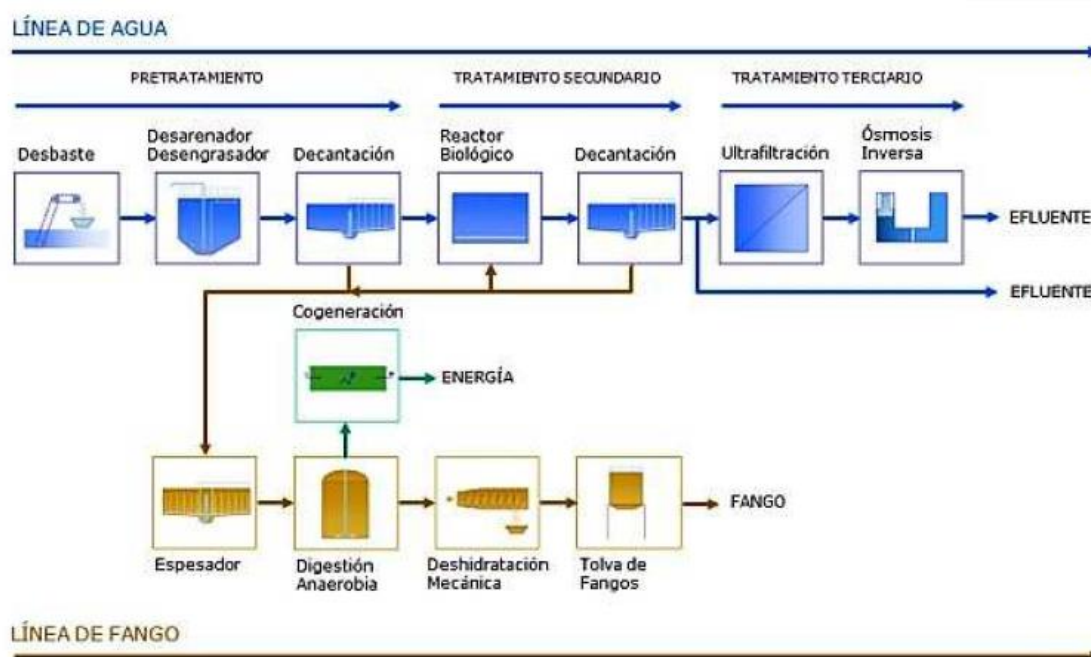
#### 1.3.1 Tratamientos de aguas residuales convencionales

Respecto de las aguas residuales, estas consisten en aguas generadas por diversas actividades de origen antropogénico que afectan a la calidad del agua y pueden provocar efectos negativos en el ambiente cuando son vertidas a cuerpos de aguas o sistemas de alcantarillado municipal sin ser tratadas previamente en una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) o plantas de tratamientos de aguas residuales (PTAR) como se conocen en Latinoamérica [23].

Tradicionalmente en las PTAR, se aplican procesos físicos y/o químicos para mejorar las características fisicoquímicas del agua residual, pero que implican operaciones unitarias de gran coste y mantenimiento por los volúmenes de aguas generados. La Figura 1.5 muestra algunos de los tratamientos convencionales que pueden encontrarse en una PTAR. Los tratamientos físicos convencionales se emplean principalmente para reducir sólidos suspendidos de diversos tamaños, grasas y aceites del agua residual mediante procesos como

## Introducción

el cribado, filtración, sedimentación o flotación por aire disuelto [24,25]. Dependiendo de la robustez de la PTAR, las operaciones de desbaste o filtración gruesa con rejillas o tamices pueden emplearse para eliminar sólidos voluminosos, arena y grasas como un pretratamiento a etapas posteriores que implican el uso de operaciones unitarias de flotación por aire disuelto (para eliminación de SST, DQO y DBO hasta un 80 %), sedimentación o decantación que son consideradas como tratamientos primarios [25].



**Figura 1.5** Esquema general de los tratamientos convencionales en una planta de tratamiento de aguas residuales [26].

Los tratamientos químicos incluyen operaciones unitarias para la adición de sustancias químicas que ayuden a regular parámetros como el pH, y otros químicos como floculantes y/o coagulantes inorgánicos que con agitación propicien la formación y crecimiento de flóculos para coadyuvar a la sedimentación; sin embargo, pese a su alta eficiencia, el uso de coagulantes tradicionales como el sulfato de aluminio y el cloruro férrico son perjudiciales para la salud humana y el medioambiente [23]. En una PTAR estas operaciones unitarias forman parte de los tratamientos primarios (según el tipo de PTAR) y con su aplicación se consigue eliminar PT (> 90 %), NT (> 80 %), SST (> 40 %) y DQO (> 70 %) [24,25]. Otra operación unitaria empleada es la electrocoagulación, tecnología que usa electrodos de Al, Fe, Pt, u óxidos de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y estaño ( $\text{SnO}_2$ ), ánodos de sacrificio en medios ácidos o alcalinos y corriente eléctrica (sin la adición de químicos) para eliminar carga orgánica, metales pesados, color e incluso algunos patógenos con eficiencias mayores al 90 %. Sin embargo, pese a la inversión

## Introducción

---

requerida para la adquisición de este equipo, es considerada una tecnología efectiva y rentable [25].

Algunas PTAR incluyen algún tratamiento biológico como tratamiento secundario para descomponer o reducir la carga orgánica de las aguas residuales; comúnmente se emplean procesos anaeróbicos que utilizan bacterias, procesos aeróbicos (lodos activados, biopelículas con microalgas, microalgas-hongos y otros consorcios, filtros percoladores, etc.) y lagunas facultativas para digerir la carga orgánica y reducir patógenos, DBO y DQO, principalmente [25,27]. En el caso de los procesos o sistemas aeróbicos, el tratamiento comúnmente utilizado por su alta efectividad y bajo coste es el de lodos activados en el que un efluente se pone en contacto con aire para que la carga orgánica sea degradada por bacterias y protozoarios en presencia de oxígeno; posteriormente se forman flóculos de materia orgánica soluble e insoluble que se eliminan mediante sedimentación en un decantador o clarificador; el tiempo de retención de este proceso varía entre 2-20 días dependiendo de la carga orgánica del efluente pero genera grandes volúmenes de lodos activados que requieren de una determinada disposición final [25,26].

Actualmente, las lagunas facultativas o de oxidación se usan cada vez menos debido al espacio requerido para su construcción y problemas relacionados a la generación de olores y atracción de vectores; sin embargo, fueron muy empleadas hace algunas décadas para el tratamiento de afluentes que ingresaban a la laguna por la parte inferior y permanecían entre 5-10 días en la laguna sin mezclado mecánico; normalmente se forma una capa de espuma en la superficie del agua que asegura las condiciones anaerobias para la degradación o estabilización de la carga orgánica del agua tratada pudiendo alcanzar eliminación de más del 95 % de DBO, DQO y SST [25].

Otros tratamientos biológicos incluyen la digestión anaerobia para la producción de biogás. La digestión anaerobia consiste en el uso de bacterias que degradan la materia orgánica en  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  en ausencia de oxígeno. Es el tratamiento biológico más usado por su alta eficiencia para la eliminación del 99 % de DQO, la baja producción de lodos (< 20 % en comparación con los sistemas aeróbicos), menores requerimientos energéticos y producción de biogás a un bajo coste [25].

También, en algunas PTAR se emplean tratamientos físicos de tecnologías de membranas como ósmosis inversa, nanofiltración, ultrafiltración y microfiltración que ayudan a la eliminación de más del 99 % de la demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO) y sólidos suspendidos totales (SST), así como concentraciones de iones de sodio

## Introducción

---

(Na<sup>+</sup>) y cloruros (Cl<sup>-</sup>) [26]. Este tipo de filtración fina es usado como tratamiento terciario en algunas PTAR para la eliminación de partículas pequeñas, coloides, macromoléculas, materia orgánica y dependiendo del tamaño del poro, también es posible la eliminación de bacteria y otros microorganismos. Aunque son tecnologías muy eficientes, son costosas y suelen presentar problemas de bioincrustaciones en las membranas, lo que acorta su tiempo de vida útil [24,25].

Algunas PTAR más modernas emplean procesos de oxidación avanzada como una alternativa complementaria a los tratamientos biológicos, pudiendo ser empleada como pretratamiento o postratamiento ya que estas técnicas permiten la inactivación de microorganismos sin la adición de grandes cantidades de químicos. Esto trae como ventaja reducción de costes y problemas ambientales asociados a la formación de subproductos como ocurre en procesos como la cloración, comúnmente empleada para la desinfección del agua. Entre estos tratamientos destacan la ozonización (aplicación de bajas concentraciones de ozono), radiación Gamma, radiación ultravioleta (UV) y combinación de UV/peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En estos procesos se producen radicales hidroxilos (OH<sup>-</sup>) en una primera etapa por acción del ozono, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la luz UV, que posteriormente reaccionan con la materia orgánica produciendo un precipitado. Estos tratamientos pueden combinarse entre sí e inactivar hasta el 99 % de los microorganismos presentes y ayudar a la eliminación de DBO, DQO, TOC y SST presentes en el agua residual después de los tratamientos primarios y secundarios [24,25].

Otro proceso de oxidación avanzada conocido es la oxidación Fenton, basada en la reacción Fenton en la que se combina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con sales de hierro (Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>) para producir radicales OH<sup>-</sup> altamente reactivos que reaccionan con la materia orgánica formando precipitados y reduciendo la concentración de color en los efluentes; también es un tratamiento efectivo para la eliminación de herbicidas, pesticidas y fármacos en aguas residuales. Aunque estas técnicas son muy efectivas, su rendimiento puede verse afectado por la turbidez, presencia de nitratos y el coste del tratamiento aumenta debido a la necesidad de mantener las relaciones estequiométricas de Fe<sup>+2</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reacción [24].

También es común el uso de carbón activado para la purificación de agua potable o aguas residuales industriales; con este tratamiento se lleva a cabo la adsorción de una variedad de compuestos orgánicos que incluyen aromáticos, azufrados, color y olor. Presenta una alta eficiencia de eliminación y muy bajos costes ya que no requiere energía eléctrica ni grandes

presiones de agua; sin embargo, es ineficiente para la reducción de contaminantes inorgánicos como Fe, Al, Ca, F<sup>-</sup> y sales [24].

### 1.3.2 Aguas residuales industriales

Tradicionalmente, el cultivo de microalgas a gran escala requiere de la utilización de agua como componente mayoritario del medio de cultivo a emplear, y el uso de agua fresca, un escaso ypreciado recurso, debe evitarse por temas económicos y ecológicos [28]. Diferentes autores estudiaron el uso de aguas residuales para la producción de biomasa y biocombustibles a partir de microalgas como un método de bajo coste comparado con los métodos de cultivos que emplean agua fresca; éstos autores mencionan ahorros en la adición de nutrientes, reducción total en el coste de los productos finales y biorremediación de aguas por la eliminación de macronutrientes como nitrógeno, fósforo y carbono, y eliminación de metales [20–22,29–32].

Las aguas residuales que se emplean en los cultivos de microalgas generalmente son pretratadas de forma parcial o total previo a su empleo como método de cultivo para mejorar las características del agua de cultivo. Entre los pretratamientos más usados resaltan la sedimentación, filtración o centrifugación para eliminación de partículas de gran tamaño e insolubles, y diluciones con agua potable o medios de cultivos comerciales para reducir turbidez, pH, color o cargas elevadas de nutrientes [28,30,33]. Para la eliminación de contaminantes y patógenos suelen usarse tratamientos térmicos como la esterilización por autoclave, tratamientos físicos como la exposición a luz UV para desactivar virus, esporas y otros microorganismos, y adición de químicos para control de pH o con fines de desinfección, siendo el hipoclorito de sodio (NaClO) la sustancia comúnmente empleada para la desinfección de aguas residuales [34]. En la actualidad, algunos autores sugieren el uso de las aguas residuales sin pretratamientos o sin diluciones, pues su uso ha arrojado mejores resultados en la eliminación de nutrientes en comparación con el uso de aguas residuales pretratadas [35–37].

En el presente trabajo doctoral se seleccionaron tres tipos de aguas residuales para ser empleadas como medio de cultivos con las especies de microalgas de estudio para analizar su capacidad de biorremediación de las aguas y la posterior valorización energética de la biomasa obtenida; estos tipos de aguas residuales se detallan a continuación.

### a) Aguas residuales de la industria porcina

La carne de cerdo es considerada una fuente importante de proteínas en la alimentación humana, siendo Ecuador el quinto país productor de cerdo en Latinoamérica [38]. La actividad porcina incluye la reproducción, cría, engorde y matanza de los cerdos; respecto de este último término, en Ecuador se utiliza la expresión “faenamiento” para referirse a la actividad del sacrificio del animal dentro de un matadero para la posterior obtención de cortes de carne para la venta. En esta actividad de faenamiento (término que se empleará en adelante en este trabajo doctoral) se generan aguas residuales que pueden ser una fuente de contaminación si no son tratadas en PTAR antes de su disposición [39]. Generalmente, las pequeñas o medianas empresas dedicadas a esta actividad en países en vía de desarrollo como Ecuador, no cuentan con PTAR, descargando sus efluentes directamente a cuerpos de agua, al suelo, o en el mejor caso, al sistema de alcantarillado. Adicionalmente, en estos países la legislación ambiental puede ser deficiente y no se tiene control sobre empresas familiares, pequeñas o mataderos clandestinos en sectores urbanos o rurales, representando además un problema de salud pública [40].

Durante el faenamiento de los cerdos se generan aguas residuales que normalmente contienen sangre del animal mezclada con agua, residuos sólidos como pelos, piel, grasa o residuos cárnicos del faenamiento [33,41]. Este tipo de agua posee una alta carga de nutrientes orgánicos e inorgánicos que incluyen diversas formas de nitrógeno, fósforo y carbono que pueden aprovechar las microalgas para su crecimiento; por ello, se han propuesto como una alternativa de medio de cultivo para producción de biomasa microalgal [42].

El uso de este tipo de agua residual se presenta como una opción de medio de cultivo para las microalgas y tiene preferencia sobre los cultivos convencionales con agua dulce o potable, ya que el crecimiento de microalgas implica la absorción de nutrientes que disminuyen la carga contaminante de las aguas residuales de industria porcina. El uso de aguas residuales de la industria porcina puede reducir la necesidad de fuentes de N y P hasta en un 65 % en sistemas de cultivos de microalgas a gran escala; por su parte las microalgas como microorganismos biorremediadores, son capaces de reducir concentraciones de demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), patógenos y metales pesados hasta un 60-80 %, por lo que una opción para que la producción de bioproductos en una biorrefinería a base de microalgas sea más rentable, es la integración del tratamiento de aguas residuales con la producción de biomasa de microalgas [43–45]. La Tabla 1.1 muestra las características fisicoquímicas de un agua de mataderos porcinos.

## Introducción

**Tabla 1.1** Características fisicoquímicas generales de un agua residual de mataderos porcinos [34,43,46,47].

Parámetro	Concentración original
pH	6,1-8,4
Sólidos suspendidos (mg/L)	4,7-492
Nitrógeno Total (mg/L N)	162-480
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	13-209
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	224-438
Demanda Química de Oxígeno (mg/L)	995-3700
Cobre (mg/L)	0,08-1,25
Cromo (mg/L)	0,03
Hierro (mg/L)	0,22-1,64
Molibdeno (mg/L)	0,02-0,1
Níquel (mg/L)	0,03-0,05
Plomo (mg/L)	0,04-0,05
Nitrógeno amoniacal (mg/L N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	4,5-367

### b) Aguas residuales de cerveza artesanal

La cerveza constituye una de las bebidas fermentadas más antiguas que existe; históricamente se conocen datos de elaboración de cerveza desde hace más de 5000 años y con el tiempo se ha convertido en un producto altamente demandado a nivel mundial [48]. Sus componentes esenciales son el agua, el lúpulo, la malta y levaduras, que se combinan en función de diferentes tipos de materias primas que una vez fermentadas, dan lugar a cientos de tipos de cervezas que resaltan por su aroma, sabor y color [49]. La cerveza se encuentra en el top cinco de las bebidas más consumidas a nivel mundial por lo que su producción tiene un importante impacto en el sector productivo y económico de los países [50,51], pero también es un producto biotecnológico que emplea grandes cantidades de agua potable en su proceso productivo, ya que por cada litro de cerveza, pueden generarse 3-10 L de aguas residuales, lo que representa un 70 % del agua empleada en la elaboración de la misma [23,50].

En los últimos años en Ecuador ha habido una tendencia creciente hacia la producción de cerveza artesanal, la cual es elaborada con recetas propias que emplea materias primas naturales, y en lo posible, sin la inclusión de aditivos o conservantes que comúnmente están presentes en las cervezas industriales. Estas cervezas artesanales se caracterizan por tener aromas, colores y estilos que son únicos y tienen especial aceptación en la población joven [52]. En función de la producción, el tratamiento de aguas residuales procedentes de la elaboración de cerveza artesanal tiene un alto coste para los pequeños y medianos



## Introducción

productores, y en el sector artesanal no hay respaldo de cerveceras artesanales que incluyen tratamientos de sus aguas residuales, por lo que éstas aguas generalmente son desechadas en el sistema de alcantarillado local [50].

Las aguas residuales de la elaboración de la cerveza artesanal o industrial generalmente poseen una alta carga orgánica (azúcares, almidón, etanol, ácidos grasos volátiles, etc.), color, sólidos en suspensión, pH variable y grandes concentraciones de nitrógeno y fósforo por la presencia de levaduras. Las aguas residuales de estas industrias se originan en el proceso de producción de malta y cerveza, y de la limpieza y desinfección de equipos, envases e instalaciones en general y algunos autores consideran que estas aguas conforman un medio de cultivo de bajo coste para la producción de lípidos a partir de microalgas. Usualmente no contiene cantidades significativas de metales pesados y no son tóxicas [24,50,53–57]. La Tabla 1.2 muestra las características fisicoquímicas de un agua residual de industria cervecera.

**Tabla 1.2** Características fisicoquímicas generales de un agua residual de industria cervecera [24,58,59].

Parámetro	Concentración original
pH	7,4-8,5
Sólidos suspendidos (mg/L)	2901-3000
Nitrógeno Total (mg/L N)	36-1238
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	19-95
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	< 16400
Demanda Química de Oxígeno (mg/L)	400-6700
Cobre (mg/L)	0,01-0,04
Cromo (mg/L)	N.D.
Hierro (mg/L)	0,03-0,08
Molibdeno (mg/L)	< 0,09
Níquel (mg/L)	N.D.
Plomo (mg/L)	< 0,0001
Nitrógeno amoniacal (mg/L N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,6-41

N.D. : no detectado

Los beneficios de cultivar en dicha agua residual son la reducción de costes en la producción de biomasa, menor demanda de energía, y optimización de la metodología de productividad y cosecha [60]. Desde hace algunos años, se ha descrito el crecimiento de microalgas en agua residual procedente de la industria cervecera como un proceso eficiente, rentable y sostenible para la remediación de éste tipo de aguas; el alto contenido de macronutrientes en forma de nitrógeno, fósforo, carbono y otras sustancias inorgánicas pueden ser aprovechadas por las microalgas para la obtención de biomasa con diversos fines, principalmente la producción de biocombustibles, bioplásticos y biofertilizantes [28].

### c) Aguas residuales de piscicultura

La piscicultura se refiere a las actividades relacionadas a la cría de peces a nivel industrial; en ocasiones también se refiere a esta actividad con el nombre de acuicultura, pero este término es más empleado para referirse al cultivo de plantas acuáticas, crustáceos y moluscos [61]. La piscicultura constituye una importante actividad en la producción mundial de alimentos ricos en proteínas, y para el año 2028 se prevé que el consumo de pescado y otros productos procedentes de la acuicultura superen el 58 % [62]. La importancia de este sector productivo radica en que puede prevenir la escasez de especies en el mercado, así como el incremento drástico de precios. Frecuentemente las especies en acuicultura son exportadas y esto representa un importante ingreso económico para algunos países, como Tailandia y Ecuador con la exportación del camarón [10,63].

Especies como la tilapia, trucha y carpa conforman el grupo más amplio de especies criadas en las piscícolas principales de la capital de Ecuador y durante la cría de éstas especies se generan una gran cantidad de aguas residuales caracterizadas por su concentración de compuestos orgánicos y otros nutrientes inorgánicos que constituyen una fuente de contaminación al ser descargadas a los ríos cercanos a los criaderos, pudiendo generar daños ecológicos y pérdida de biodiversidad; por esta razón, su remediación es fundamental [64,65].

En las piscinas de criaderos de peces suelen encontrarse concentraciones altas de compuestos químicos procedentes del alimento de peces no consumido (30 %), materia fecal (30 %), otros productos metabólicos, desechos por descomposición de materia, sólidos disueltos y floraciones algales, principalmente [66]. Para la eliminación de dichos nutrientes se han propuesto diferentes métodos para tratar el agua residual de origen acuícola, entre los que destacan el uso de humedales artificiales, biopelículas, diques ecológicos y biorremediación con microalgas como productores primarios [27,67].

Las aplicaciones que emplean microalgas tienen especial interés por su bajo coste y consumo energético, eficiencia comprobada en la eliminación de macro y micronutrientes y bajo mantenimiento trabajando como especies únicas o en consorcio con otros microorganismos. Además, la biomasa de microalgas cultivadas en aguas residuales tiene un excelente potencial dentro de la bioeconomía circular al ser utilizada como alimento acuícola, lo cual ayuda a alcanzar el desarrollo sostenible del sector [27,65,68,69].

El crecimiento óptimo de microalgas depende de la concentración de nitrógeno, fósforo y carbono disponibles en el medio de cultivo. La Tabla 1.3 muestra las características fisicoquímicas encontradas en aguas residuales de piscicultura. El agua residual de origen

## Introducción

piscícola contiene cantidades de nitrógeno, fósforo y materia orgánica que, al no ser tratado, puede ocasionar daños ambientales al ser descargados a cuerpos de agua o usado para riego de cultivos agrícolas, pudiendo afectar a la salud de humanos y animales que empleen dicha agua para el consumo [67]. Por ello, varios autores sostienen que el agua de piscicultura es capaz de proveer las condiciones favorables para el cultivo de diversas especies de microalgas asegurando la acumulación de biomasa [27,67–71].

**Tabla 1.3** Características fisicoquímicas generales de un agua residual de piscicultura [62,65,72].

Parámetro	Concentración original
pH	6,3 - 8,05
Sólidos suspendidos (mg/L)	0,7 - 1900
Nitrógeno Total (mg/L N)	36 - 180
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	2,2 - 70
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	< 700
Demanda Química de Oxígeno (mg/L)	41 - 618
Cobre (mg/L)	N.R.
Cromo (mg/L)	N.R.
Hierro (mg/L)	N.R.
Molibdeno (mg/L)	N.R.
Níquel (mg/L)	N.R.
Plomo (mg/L)	N.R.
Nitrógeno amoniacal (mg/L N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	6,6 - 41

N.R. : no reportado

En términos medioambientales, en Ecuador existe una legislación para la descarga a diferentes cuerpos de agua según el propósito de uso final cuyos límites máximos permisibles se recopilan en el Acuerdo Ministerial N.º 097-A de noviembre del 2015 expuesto por el Ministerio de Ambiente de Ecuador (MAE), hoy en día conocido con el nombre Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE) [73]. En este documento se muestran los criterios de calidad admisibles del agua para consumo humano y doméstico, preservación de la vida acuática y silvestre en aguas dulces, marinas y estuarios, para uso agrícola en riego, uso pecuario, fines recreativos, descargas al sistema de alcantarillado público, descargas a un cuerpo de agua dulce, agua marina, descargas industriales, así como límites máximos permisibles para descargas a suelos.

En el Anexo 2 se muestra la Tabla 8 del Acuerdo Ministerial N.º 097- A de noviembre del 2015 en las que se muestran los límites de descarga al sistema de alcantarillado municipal. En este trabajo doctoral se utilizarán estos límites de descarga para comparar si el tratamiento de

estas aguas residuales con microalgas cumple la normativa ambiental de Ecuador para descarga en el sistema de alcantarillado municipal, suponiendo que ninguna de las pequeñas y medianas empresas posean su propia PTAR. Sin embargo, pese a que existe esta legislación ambiental en el país, el MAATE desde hace algunos años no cuenta con los recursos económicos para cubrir toda la nación y poder realizar auditorías periódicas a todas las instalaciones familiares y pequeña y medianas industrias dedicadas a la matanza de cerdos, cervecerías artesanales y piscícolas en la nación, por lo que verdaderamente no se tiene un control estricto sobre el cumplimiento de éstos límites establecidos, pudiendo esta situación generar impactos ambientales que no son monitoreados, multados y/o controlados por el ente regulador. Por temas de confidencialidad no se reportan los nombres de los lugares o pequeñas empresas donde se realizó el muestreo de las aguas residuales empleadas en este estudio doctoral.

### 1.4 Microalgas

Se define como microalga a aquellos microorganismos fotosintéticos unicelulares y eucariotas que pertenecen a los reinos *Protista*, *Chromista* o *Plantae*., y aunque generalmente se emplea el término microalga para referirse a los microorganismos capaces de realizar la fotosíntesis, incluyendo a las cianobacterias; estas últimas son microorganismos fotosintéticos procariotas que constituyen un filo dentro del dominio Bacteria [74,75].

Las microalgas son microorganismos autótrofos con actividad fotosintética capaces de captar el CO<sub>2</sub> de la atmósfera y de sintetizar compuestos orgánicos a partir de la energía de la luz solar. Sin embargo, existen algunas especies que pueden tener un metabolismo heterótrofo al utilizar moléculas orgánicas complejas como fuente de energía [35,76]. Así mismo, tienen un papel importante en diferentes ciclos biogeoquímicos globales al ser consideradas unas de las principales productoras de oxígeno atmosférico [77]. Se caracterizan por tener un desarrollo rápido y simple que les proporcionan adaptabilidad a diversas condiciones medio ambientales. Entre las más importantes destacan las siguientes clasificaciones: algas verdes (*Chlorophyta*), algas verde-azules (*Cyanophyta*), algas rojas (*Rhodophyta*), y diatomeas (*Bacillario-phyta*) [70,75]. Su uso se remonta a los años 50 en investigaciones sobre el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales eliminando de manera eficiente nutrientes como nitrógeno y fósforo de las aguas residuales domésticas sedimentadas en un sistema simbiótico [74,78,79].

Su rápido crecimiento se debe a su alta eficiencia fotosintética, la cual puede llegar a ser 10 veces mayor a la de las plantas terrestres, y junto a su estructura unicelular sencilla, estos

microorganismos presentan una productividad de biomasa teórica por hectárea mayor a la de los cultivos tradicionales [80]. También, las microalgas gozan de una composición química muy diversa de carbohidratos, proteínas y lípidos cuya composición puede mejorarse considerando modificaciones en las condiciones de cultivo (temperatura, concentración de CO<sub>2</sub>, intensidad, tipo y color de luz, suministro de N y P, salinidad, acidez, condiciones de estrés, modificaciones a nivel genético, etc.) [69]. Entre las principales aplicaciones de las microalgas destaca su uso biorremediador en aguas residuales procedentes de la industria y el sector agrícola enfocados en la fijación de CO<sub>2</sub> y/o eliminación del contenido orgánico con el beneficio de la producción de biomasa y otros productos de valor añadido. Entre los usos más comunes que se reportan en la bibliografía se encuentran la fijación/secuestro de CO<sub>2</sub>, eliminación de nutrientes orgánicos e inorgánicos de N, P y C, eliminación de metales pesados, reducción de color y olor, entre otros; así como la obtención de proteínas, pigmentos y biomasa que las hacen idóneas para el sector de alimentos, farmacia, cosmética y energía [69,81,82].

### 1.4.1 Selección de las especies de estudio

Para fines de producción de biocombustibles a partir de microalgas cultivadas en aguas residuales es imprescindible seleccionar especies que sean robustas, esto implica varios factores como alta adaptabilidad a diferentes medios de cultivos y cambios en condiciones ambientales, alta tolerancia a contaminantes, tener una alta tasa de crecimiento, de producción de biomasa y de eliminación de nutrientes del medio [83].

Especies de los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Nitzschia*, *Oscillatoria*, *Ankistrodesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micratinium*, y *Golenkinia* son unos de los más empleados en cultivos en aguas residuales por su alta tolerancia a la contaminación y a cambios ambientales en comparación con otras especies [69,84,85]. *Chlorella* sp.; *Chlorella vulgaris*; *Scenedesmus* sp., *Scenedesmus obliquus*; *Neochloris* sp., *Chlorellaceae* sp. y *Coelastrella* sp., son algunas de las especies de microalgas que han sido cultivadas en aguas residuales con doble propósito: tratamiento del agua residual y producción de biomasa bajo diferentes condiciones de cultivo [84]. La Tabla 1.4 resume algunos trabajos con menos de cinco años de antigüedad que emplearon aguas residuales y especies de microalgas similares a las empleadas en la presente investigación.

En la presente tesis doctoral se ha trabajado con dos de esas especies de microalgas ampliamente cultivadas en aguas residuales de diversa procedencia: *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) y *Scenedesmus* sp. La principal razón de elección de estas especies es que han sido reportadas en el catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador, el cual

## Introducción

recopila los principales géneros y especies de microalgas encontradas en lagos, ríos y lagunas ubicadas en áreas protegidas de los Andes y Amazonía de Ecuador [86]. Por ello se consideraron especies que pudiesen crecer fácilmente en climas variados.

**Tabla 1.4** Biorremediación de aguas residuales de origen porcino, cervecero y de piscicultura empleando microalgas de publicación reciente

Tipo de agua residual	Detalles del agua residual	Especie de microalga	Contaminantes reducidos	Peso seco (g/L)	Productividad de biomasa (g/L·d)	Ref.
Industria porcina	Agua residual porcina filtrada	<i>Scenedesmus</i> sp.	DQO, N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , PT	0,41 ± 0,02	0,042 ± 0,001	[30]
	Agua residual porcino sin dilución ni esterilización	<i>Chlorella vulgaris</i>	NT, PT, DQO, N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,40 ± 0,01	0,04 ± 0,03	[36]
Industria cervecera	Agua residual artificial de cervecería	Consortios de <i>Scenedesmus</i> sp. 336, <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX1602 y <i>Chlorella</i> sp. L166	N-NH <sub>3</sub> , NT, PT, DQO	0,7	0,7908	[87]
	Efluente cervecero anaeróbicamente digerido a) esterilizado y b) no esterilizado	<i>Scenedesmus</i> sp.	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NT, PT, DQO	a) 0,99 b) 1,05	a) 0,06433 b) 0,06327	[88]
Piscicultura/Acuicultura	Agua residual de acuicultura filtrada	<i>Chlorella sorokiniana</i>	DQO, NO <sub>3</sub> -N, NO <sub>2</sub> -N, NH <sub>3</sub> -N, PO <sub>4</sub> -P, PT	1,93	0,22	[65]
	Agua residual pesquera filtrada y esterilizada	<i>Chlorella</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp.	NO <sub>3</sub> -N, PO <sub>4</sub> -P	C. sp. 0,87 S. sp. 0,83	-	[89]

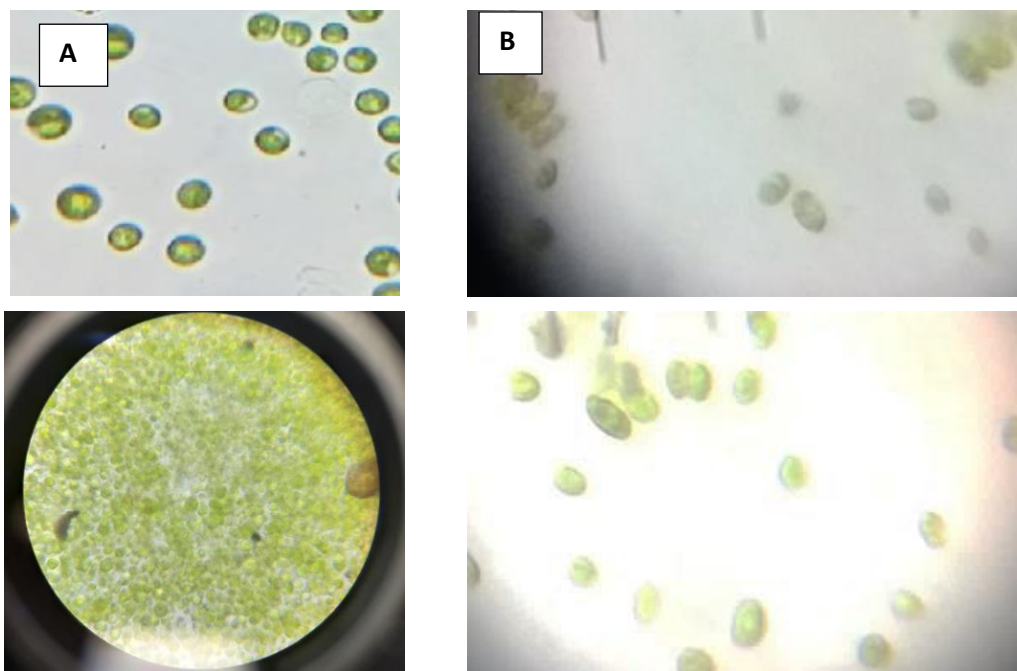
Cl: carbono inorgánico, COT: carbono orgánico total, DBO<sub>5</sub>: demanda biológica de oxígeno (5 días), DQO: demanda química de oxígeno, NT: nitrógeno total, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o NH<sub>4</sub>-N: nitrógeno en forma de ion amonio, N-NH<sub>3</sub>: nitrógeno amoniacal, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o NO<sub>3</sub>-N: nitratos, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> o NO<sub>2</sub>-N: nitritos, PT: fósforo total, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> o PO<sub>4</sub>-P: fosfatos/ortofosfatos

La Figura 1.6 muestra una imagen con la morfología de las microalgas de estudio de la presente tesis doctoral. La primera especie de estudio *Chlorella vulgaris*, es un organismo unicelular descubierto en 1890 por el microbiólogo y botánico holandés Martinus Willen

## Introducción

---

Beijerick [90]. Esta microalga fotosintética pertenece al reino Protista, su división es *Chlorophyta* del orden *Chlorococcales* y su familia corresponde a *Chlorellaceae* del género *Chlorella* [91], se caracteriza por su color verde brillante y su forma esférica con diámetros entre 2 y 10  $\mu\text{m}$  [92]. Esta especie es una de las más estudiadas en el ámbito experimental ya que se ha encontrado en aguas frescas, residuales, salobres, e incluso en suelos; lo que demuestra su adaptabilidad a diversos ambientes, razón por la cual es considerada como un recurso biológico prometedor [93].



**Figura 1.6** Imagen de las especies *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) empleadas en el presente estudio (Elaboración propia).

Además de ser una especie robusta, presenta una tasa de crecimiento elevado en comparación de otras especies y ha sido cultivada para usos en el sector alimenticio, cosmético y nutracéutico por su alto contenido proteico (43-58 % en base seca) y lipídico ( 5-58 % en base seca), el cual puede variar en función de las condiciones principales del cultivo (luz, temperatura, pH, salinidad, disponibilidad de nutrientes, etc.) [92,94].

Por su parte, la especie de estudio *Scenedesmus* sp. corresponde a la división *Chlorophyta*, clase *Chlorophyceae* y orden *Sphaeropleales* y fue identificada por primera vez por Meyen en 1829 [80]. Este género de microalgas puede encontrarse en forma individual y en colonias, y suelen estar agrupadas por su lado longitudinal, de 2 a 32 células, siendo común las agrupaciones de 4-8 células con un tamaño variable entre 3-78 x 2-10  $\mu\text{m}$ , con formas esféricas, elipsoidales alargadas o fusiformes [80]. *Scenedesmus* sp., ha sido descrita como una

## Introducción

de las especies de microalgas más adecuada para la biomitigación de CO<sub>2</sub> por su alta producción de biomasa y capacidad de fijación de carbono [70,95]. La Tabla 1.5 muestra la información taxonómica de las dos especies de estudio en el presente trabajo [80,94].

**Tabla 1.5** Información taxonómica de las microalgas del presente estudio

<b>Parámetro</b>	<b><i>Chlorella vulgaris</i></b>	<b><i>Scenedesmus sp.</i></b>
Jerarquía	Beijerinck 1890	Meyen 1819
Reino	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridiplantae</i>	<i>Viridiplantae</i>
División	<i>Chlorophyta</i>	<i>Chlorophyta</i>
Subdivisión	<i>Chlorophytina</i>	<i>Chlorophytina</i>
Clase	<i>Trebouxiphyceae</i>	<i>Trebouxiphyceae</i>
Género	<i>Chlorella</i>	<i>Scenedesmus</i>
Familia	<i>Oocystaceae</i>	<i>Scenedesmaceae</i>
Orden	<i>Chlorellales</i>	<i>Sphaeropleales</i>

### 1.4.2 Cultivo de microalgas

Junto a la selección de un medio de cultivo apropiado y la definición de una o varias cepas de microalgas robustas, el cultivo de microalgas constituye una de las etapas primarias para la obtención de biomasa de microalgas con diversos fines, considerando todo un conjunto de variables y condiciones de cultivo que influyen directamente sobre la biomasa microalgal [96].

Las condiciones de cultivo pueden clasificarse en cuatro grupos: fotoautotróficas, heterotróficas, mixotróficas y fotoheterotróficas. El cultivo fotoautótrofo implica un cultivo basado en el uso de la luz derivada de la fotosíntesis o luz artificial, así como el uso de fuentes inorgánicas de carbono. Es considerado una condición de cultivo de bajo coste al emplear luz natural y puede usarse con cultivos abiertos (lagunas) o cerrados (fotobiorreactores). El cultivo heterótrofo no requiere luz y emplea compuestos orgánicos como la glucosa como fuente de energía y de carbono. Normalmente se considera de coste moderado ya que requiere de fermentadores convencionales para el aprovechamiento del sustrato (glucosa). El cultivo mixotrófico puede ser tanto autótrofo (microorganismos que producen su propio alimento) como heterótrofo (microorganismos consumidores que no producen su propio alimento) que emplean compuestos orgánicos e inorgánicos como fuentes de carbono y de energía, y también luz natural o artificial. Son considerados de alto coste y suele emplearse fotobiorreactores para este tipo de cultivo. Los cultivos fotoheterotróficos son aquellos que hacen uso de azúcares como fuente de carbono orgánico y de energía, al igual que hacen uso de luz natural o artificial; de forma análoga al cultivo anterior, son considerados métodos de



## Introducción

---

alto coste por el uso de fotobiorreactores [97–100]. Para todos los casos hay riesgo de contaminación que afectará a la concentración celular del cultivo [101].

De acuerdo con el modo de operación, los cultivos pueden clasificarse también en continuos, discontinuos, semicontinuos e inmovilizados. El cultivo en continuo presenta como característica principal una entrada continua y controlada de nutrientes al medio de cultivo y la salida continua de biomasa, con la ventaja de una alta producción de biomasa de composición constante. En cambio, en el cultivo discontinuo (también llamado por lotes o batch), se fijan unas condiciones de alimentación en la entrada al proceso y se desarrolla hasta que se consume uno de los reactivos en el medio. El modo de cultivo semicontinuo es una combinación de los procesos anteriores en el que se da un aporte continuo de nutrientes al medio de cultivo, pero no se retira biomasa del reactor hasta su cosecha. Finalmente el cultivo inmovilizado tiene la finalidad de proporcionar un espacio estable para fijar el microorganismo sobre una matriz polimérica o película que permite obtener mejores tasas de crecimiento celular [96].

Actualmente destacan dos sistemas de cultivos de microalgas principales: sistemas abiertos y sistemas cerrados. Los sistemas abiertos tienen su fundamento en las lagunas artificiales o estanques de oxidación empleados en el tratamiento de aguas residuales; pueden tener varias formas (redondos o rectangulares), el estilo más empleado es el tipo “raceway” o estanque de carreras con paletas acopladas a un motor para promover la circulación del medio a través del circuito. Son sencillos y de bajo coste de construcción y operación; sin embargo, presenta como desventajas el requerimiento de grandes espacios para su construcción (dependiendo de la escala), pérdidas de agua por evaporación y salpique, pobre uso de la luz, difusión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, contaminación por otros microorganismos consumidores de microalgas y baja eficiencia en el proceso de agitación del medio lo que disminuye la eficiencia fotosintética de los cultivos [101–103].

Los sistemas cerrados surgieron como una opción para contrarrestar las desventajas que presentan los sistemas abiertos, surgiendo el término “fotobiorreactor”, el cual hace referencia a cualquier recipiente con facilidad de iluminación, de entrada y salida de nutrientes y aireación para cultivos que requieran luz como fuente de energía, evitando así zonas oscuras al proveer un paso más uniforme de la luz que se traduce en mejoras en la transferencia de masa y en la eficiencia fotosintética de las microalgas. Normalmente se componen de una fase sólida (microalgas), una fase líquida (medio de cultivo), una fase gaseosa (para la transferencia

de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) y se construyen con materiales de color claro o transparentes que permitan el paso de la luz.

Con los avances tecnológicos se han desarrollado diferentes tipos de fotobiorreactores pudiendo encontrar algunos tipos clasificados según la superficie iluminada en: planos, tubulares y de columna; según la forma en la que fluye el líquido: agitados, columnas de burbujeo y tipo “airlift” o reactor de transporte aéreo. También pueden ser verticales u horizontales. En todos los casos se trata de recipientes con barreras transparentes o semitransparentes contruidos con vidrio, plexiglás o metacrilato, policarbonato, bolsas plásticas, etc. [102,103]. De forma general con este tipo de sistema se presentan beneficios como el alto crecimiento celular y mayor productividad de la biomasa asociada a un mejor control en el suministro de nutrientes, CO<sub>2</sub> y luz; además de que ahorran espacio y pueden emplearse en condiciones internas de laboratorio o a la intemperie [101,104].

### 1.4.3 Tratamiento de aguas residuales con microalgas

Diversos autores afirman que las microalgas son uno de los tratamientos biológicos más eficaces para la absorción de nutrientes en aguas residuales y su conversión en biomasa. Durante su tratamiento, nutrientes ricos en nitrógeno, fósforo y carbono son absorbidos por las microalgas para su crecimiento. A través de su actividad fotosintética la microalga libera O<sub>2</sub> que puede ser aprovechado por bacterias en el agua residual (si las hubiera) fijando CO<sub>2</sub> o asimilando iones de bicarbonatos (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) durante la respiración celular. Sin embargo, sus aplicaciones habían estado limitados a usos en laboratorio hasta hace algunos años cuando se han aplicado las tecnologías de estanques tipo “raceway” y fotobiorreactores para el tratamiento de aguas residuales a gran escala [24].

A través de los años se ha demostrado que algunas especies de microalgas tienen la capacidad de eliminar más del 99 % de N, P y C de diversos tipos de aguas residuales procedentes de industrias avícola, porcina y bovina, industrias cervecera y láctea, y aguas municipales, en cortos periodos de tiempo con crecimiento sustancial de la biomasa [59,105,106]. Pese a sus altas eliminaciones de diversos nutrientes presentes en las aguas residuales, normalmente presentan limitaciones en términos de eliminación de sales, olor y color; y dependiendo del propósito final del tratamiento, en algunos casos será necesario acompañarlas de otras tecnologías como las tecnologías de membranas para la etapa de adecuación o purificación final del agua tratada [24].

En comparación con el tratamiento de aguas residuales convencionales, el tratamiento con microalgas se considera efectivo y de bajo coste de capital [17]; aunque etapas posteriores de aprovechamiento de la biomasa (cosechado, secado, transformaciones posteriores, etc.) pueden presentar costes muy elevados asociados a requerimientos energéticos y de materiales. Otra ventaja es la notable reducción de lodos formados durante el tratamiento convencional de aguas residuales asociados al uso de sustancias químicas, los cuales requieren de un tratamiento especial debido a su potencial peligro y riesgos a la salud y el ambiente [107]. Otro beneficio es la reducción de GEI gracias a la fijación de 100-200 toneladas de CO<sub>2</sub> por ML, tanto si el tratamiento del agua residual se basa netamente en tratamiento biológico con microalgas o si es integrado a PTAR; esto hace a esta tecnología más respetuosa con el medioambiente [108].

Los tratamientos de aguas residuales basados en microalgas generan como subproducto la biomasa de microalgas que puede tener varios usos al ser transformada en una biorrefinería de microalgas. Entre los diferentes bioproductos se encuentran la obtención de biofertilizantes de plantas, ya que esta biomasa puede mejorar la composición mineral del suelo y ayudan a la fijación de N de suelos de uso agrícola, lo que permitirá mejorar la fertilidad de los suelos de una manera sustentable [109]. Esta biomasa también puede ser transformada en alimento para animales, como por ejemplo en la industria acuícola dada su alto contenido nutricional (39-70 % de proteínas, 10-57 % de carbohidratos) y ser de fácil digestión para especies como camarones y peces [110]. Sin embargo, esta aplicación recibe muy poco uso debido a las regulaciones en alimentación animal de la mayoría de los países. La biomasa de microalgas es considerada por algunos autores como una fuente prometedora en la producción de biocombustibles; esta aplicación se detalla a continuación.

### **1.5 Aprovechamiento energético de la biomasa microalgal generada**

#### **1.5.1 Producción de biocombustibles a partir de microalgas**

Los biocombustibles son combustibles derivados de compuestos u organismos biológicos muy variados; éstos pueden ser líquidos como el biodiésel, bioetanol y otros bioalcoholes; gaseosos como el biogás y bio-hidrógeno y sólidos como el carbón vegetal, la madera y el serrín. Se han usado desde principios de la humanidad para la generación de calor y posteriormente para la generación de electricidad. El déficit de fuentes de energías no renovables propició la búsqueda y desarrollo de los biocombustibles al presentarse como una opción respetuosa con el medioambiente que pudieran servir para el transporte.

## Introducción

---

Estos combustibles se agrupan según el tipo de biomasa de procedencia, es así como la primera generación de biocombustibles corresponde a biomasa de origen vegetal de tipo alimenticio con altos contenidos de azúcares y grasas o aceites, como el maíz, caña de azúcar y semillas oleaginosas como girasol, oliva, canola, etc. La biomasa de segunda generación es aquella que se obtiene de los residuos postcosecha del sector agrícola (tallos, ramas, etc.) y que se caracterizan por tener un alto contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. También entran en esta generación, los aceites usados de cocina [8]. La biomasa de tercera generación es la procedente de microorganismos como hongos, levaduras, bacterias y microalgas, con alto contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos y que no compite con la alimentación humana ni animal. La cuarta generación de biomasa se trata de organismos genéticamente modificados para la producción de azúcares y lípidos [111].

Para que un biocombustible sea considerado una fuente de energía sostenible, debe provenir de fuentes abundantes de biomasa y tener una buena productividad de lípidos (para el caso del biodiésel) ; éstos dos aspectos son parámetros importantes que pueden satisfacer las microalgas [8]. Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procariontes y eucariotes con crecimiento autótrofo o heterótrofo capaces de captar el CO<sub>2</sub> atmosférico, nutrientes y luz y transformarlo en O<sub>2</sub> y biomasa. Todas las especies presentan un rápido crecimiento incluso en condiciones poco óptimas por lo que se consideran organismos resilientes que pueden encontrarse en una gran variedad de ecosistemas acuáticos e incluso terrestres [111].

Se ha reportado la existencia de más de 50.000 especies de microalgas, pero solo unos pocos miles han sido estudiados. Se agrupan de formas diversas: según sus estructuras, la composición de sus pigmentos, compuestos bioquímicos que las conforman, su ciclo de vida, etc. [8]. Se ha demostrado que la producción de biomasa a partir de microalgas supera 50 veces la producción de biomasa de las plantas terrestres, e incluso pueden llegar a producir más litros de aceite por hectárea que el aceite de palma africana y la soja [112].

Varias especies de microalgas han sido estudiadas para la obtención de biocombustibles a partir de su biomasa pero deben cumplir con algunas condiciones para que sean aptas para la producción de biocombustibles como el biodiésel; entre algunas de esas condiciones se encuentran: tener un contenido de lípidos entre 20-50 % en peso seco, una alta tasa de crecimiento, alta adaptabilidad a cambios en el medio de cultivo o de las condiciones atmosféricas y facilidad para flocular o sedimentar [113–115].

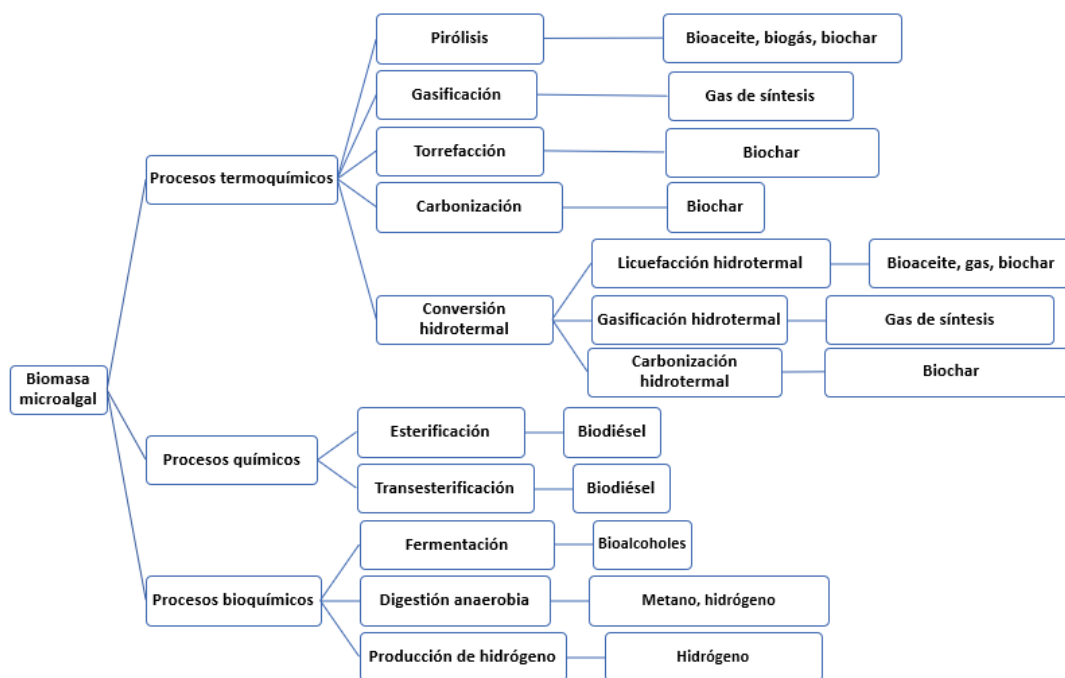
Si el enfoque del uso de microalgas es la obtención de lípidos, en la etapa posterior de extracción de estos generalmente se produce una cantidad considerable de biomasa residual

que incluye las proteínas, carbohidratos y restos celulares no aprovechados. Bibliografía reciente sobre biorrefinerías basadas en microalgas mencionan que este residuo puede ser usado como una fuente de macromoléculas para bioproductos de bajo valor añadido como biofertilizantes, bioestimulantes, bio-aceites, biogás, etc. Hoy en día, el concepto de biorrefinería sostenible es objeto de estudio en el campo de las microalgas con el propósito de obtener productos de valor añadido al dar uso a la biomasa residual que generan algunos procesos individuales de la extracción de lípidos [19,116]. En este tipo de biorrefinería, además de obtener nuevos productos y reducir impactos ambientales, se aplican los principios de la economía circular que contribuyen a reducir los numerosos cuellos de botella y retos asociados a las refinerías de algas [17,117].

En la mayoría de propuestas de biorrefinerías basada en microalgas se presentan esquemas de procesos que permiten la obtención de productos químicos o productos de alto valor añadido que tradicionalmente se obtienen del petróleo; sin embargo, la comercialización de estos esquemas es complejo y costoso debido a la variedad de materias primas y tecnologías aplicables [17]. El uso de material residual es una de las prácticas de mayor uso. En este sentido, se emplean materiales residuales sólidos, líquidos o gaseosos que son tratados para otorgarles las características de acondicionamiento necesarias para su uso dentro de la refinería. Entre los materiales residuales más utilizados se encuentran restos de la actividad agrícola, residuos municipales, aguas y gases residuales [15]. En este trabajo doctoral se planteó el uso de aguas residuales de tres tipos de industrias como medio de cultivo de microalgas en biorrefinerías basadas en esta tecnología y la posterior valorización energética de la biomasa obtenida.

Entre las aplicaciones de las microalgas que acumulan lípidos resalta la obtención de biocombustibles a partir de dicha biomasa. Empleando ciertas biomoléculas extraídas de la biomasa microalgal pueden obtenerse productos de interés, tales como biodiésel a partir de lípidos extraídos con procesos de esterificación/transesterificación, o bioalcoholes a partir de carbohidratos extraídos con procesos de fermentación e hidrólisis [96]. En cambio, cuando se emplea la biomasa completa o directa de microalgas, se producen ésteres metílicos de ácidos grasos de composición similar a la que se encuentra en el biodiesel a través de reacciones de transesterificación. Otros productos importantes que pueden obtenerse son biogás mediante la aplicación de digestión anaerobia y bioaceites con procesos de licuefacción hidrotermal o pirolisis. La Figura 1.7 resume los distintos procesos y biocombustibles que pueden obtenerse a partir de biomasa de microalgas.

## Introducción



**Figura 1.7.** Producción de biocombustibles a partir de biomasa de microalga (modificado de [96,118]).

De la Figura anterior, los procesos de transformación bioquímica son los que presentan menor consumo energético y son más respetuosos con el medioambiente; sin embargo, en el momento actual no son del todo rentables por presentar bajas conversiones. Los procesos de transformación termoquímicos son rentables, eficientes y de los más usados al momento, incluso con residuos de microalgas. Sin embargo, para obtener biocombustibles como el biodiésel, es necesario recurrir a transformaciones químicas que a la fecha presentan limitaciones de rentabilidad económica y energética; por lo que los estudios actuales se enfocan a estrategias para mejorar la eficiencia de los procesos de transformación de biomasa de microalgas en una biorrefinería [118].

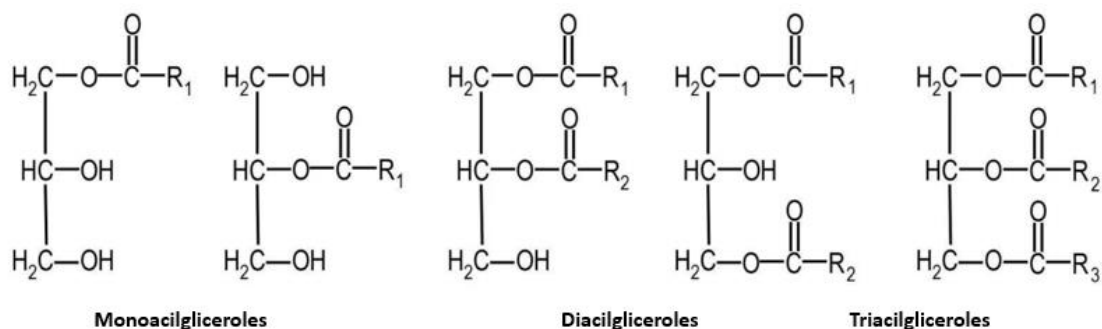
Dentro del proceso de extracción de lípidos es común el uso de biomasa seca de microalgas; sin embargo, la etapa de secado representa un punto de gran consumo energético dentro del proceso; por ello algunos autores han tratado de optimizar los procesos empleando biomasa húmeda de microalgas para reducir los costes asociado a la etapa del secado [112,119–121].

### 1.5.2 Obtención de lípidos y ácidos grasos libres

Considerando que los lípidos de las microalgas son las biomoléculas implicadas en la producción de biodiésel, es necesario la obtención de estos. Se clasifican según su polaridad en lípidos neutros (glicéridos y ácidos grasos libres) que tienen función de almacenamiento de energía, y lípidos polares (fosfolípidos, esfingolípidos y glicolípidos) encargados de formar

## Introducción

membranas celulares. Los lípidos tienen ácidos grasos libres formando parte de su estructura. Dentro de los lípidos neutros, se encuentra un tipo de ácido graso conocido como acilglicerol que presentan un enlace éster unido a un glicerol, y según el número de ácidos grasos se clasifican en triacilglicerol, diacilglicerol y monoacilglicerol; la Figura 1.8 muestra las estructuras características de los acilglicerol. Pero no todos los lípidos neutros son útiles para la obtención de biodiésel; aquellos que no contienen ácidos grasos como hidrocarburos, esteroides o pigmentos, no se pueden convertir en biodiésel [118,122].



**Figura 1.8.** Estructuras de los acilglicerol (tomado de [118])

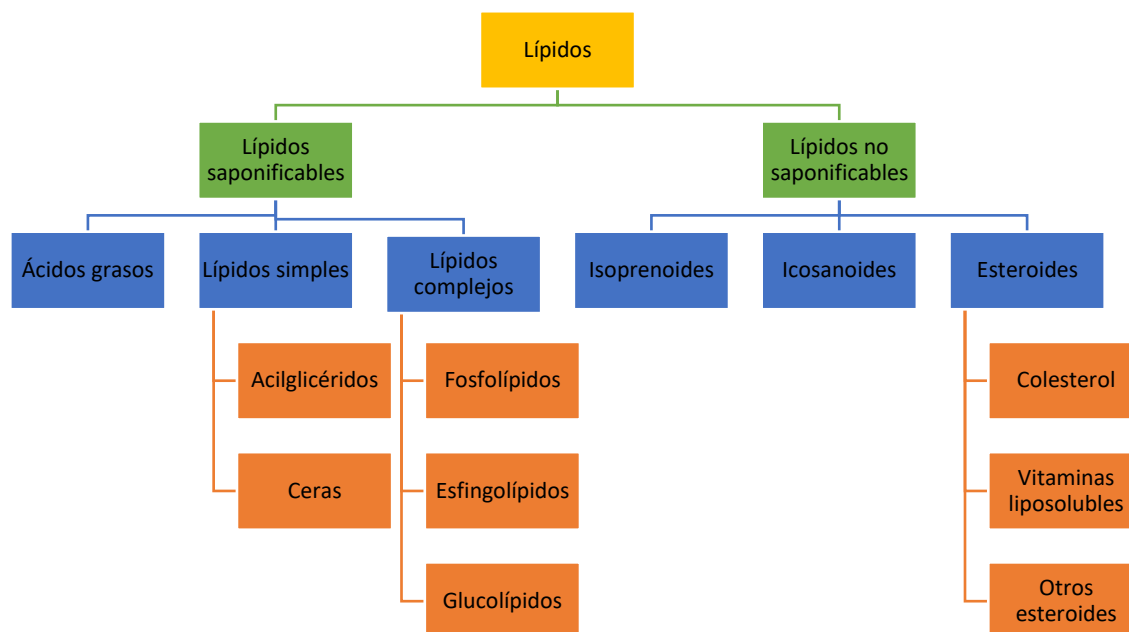
Los lípidos pueden también clasificarse según su estructura molecular en saponificables e insaponificables. Los lípidos saponificables tienen un grupo funcional éster que puede hidrolizarse en condiciones básicas. Los lípidos no saponificables, no tienen ácidos grasos en su estructura por lo que no pueden saponificarse con una base (terpenos y esteroides) [123]. A su vez, los lípidos saponificables se clasifican en simples y complejos; los simples contienen un solo C, H y O (acilglicéridos, los céridos, ésteres de esteroide y ácidos grasos libres). Los complejos además de C, H y O, pueden contener N, P, S o un glúcido (fosfolípidos, glucolípidos y esfingolípidos) [124]. La Figura 1.9 muestra un esquema de la clasificación de los lípidos según su estructura molecular.

Para la producción de biodiésel se requiere de la obtención de ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos que se obtienen a partir de las reacciones de transesterificación o esterificación mencionadas anteriormente. Por ello, a veces es necesario realizar la extracción de lípidos y ácidos grasos previamente a través de métodos de extracción convencionales (mecánicos, físicos, químicos o combinaciones de ellos), métodos catalíticos (catalizadores químicos o enzimáticos), por microondas o con el uso de fluidos supercríticos [125].

Entre los métodos de extracción de lípidos convencionales destacan el método de extracción Soxhlet (1879), el método de Folch, Lees y Stanley (1957), y Bligh y Dyer (1959), que hacen uso de disolventes químicos para extraer los lípidos contenidos en diversas materias

## Introducción

primas, siendo las técnicas de extracción de lípidos más usadas y citadas en los últimos cien años, pero presentan como desventaja el uso de disolventes de alta toxicidad para humanos, animales y medioambiente [126].



**Figura 1.9.** Clasificación de los lípidos según su estructura molecular [123,124].

El método Soxhlet (1879) fue desarrollado originalmente para la determinación de grasa en la leche por el químico alemán Franz von Soxhlet; en este método de extracción híbrido (continuo y semicontinuo), la muestra se coloca en un dedal de celulosa y “se lava” continuamente con un disolvente fresco condensado de una destilación, tradicionalmente se emplea hexano. Cuando en el equipo de extracción Soxhlet el líquido alcanza un volumen excedente, un sifón aspira el soluto del dedal y lo descarga nuevamente en la destilación, llevando los analitos al disolvente. Entre las ventajas de esta técnica resalta su simplicidad y alto rendimiento sin importar la matriz de la muestra; sin embargo, entre las desventajas resalta el largo tiempo requerido para la técnica, la gran cantidad de disolvente que requiere (tóxico y nocivo al medioambiente) y la posibilidad de descomposición térmica de los compuestos de interés ya que se trabaja a la temperatura de ebullición del disolvente [127].

El método de Folch, Lees y Stanley (1957) se desarrolló para la extracción y purificación de lípidos totales de tejidos animales e implica el uso de volúmenes de la mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v) con la biomasa a tratar y aplicación de agitación mecánica por cierto tiempo para promover la ruptura de la pared celular; posteriormente se centrifuga el material y se realiza la separación de fases. Este método ha sido modificado para optimizar el rendimiento de la extracción y las cantidades de disolventes y biomasa a usar [128].



El método de Bligh y Dyer (1959), es considerado como un método estándar para la determinación de lípidos totales a partir de tejidos biológicos; en este método se añade cloroformo, metanol y agua a las muestras en dos procesos de extracción, con la adición de un volumen de KCl para separar lípidos que hayan quedado en la fase acuosa; y después de una separación de fases, los lípidos se cuantifican en la fase orgánica mediante secado a peso constante [126].

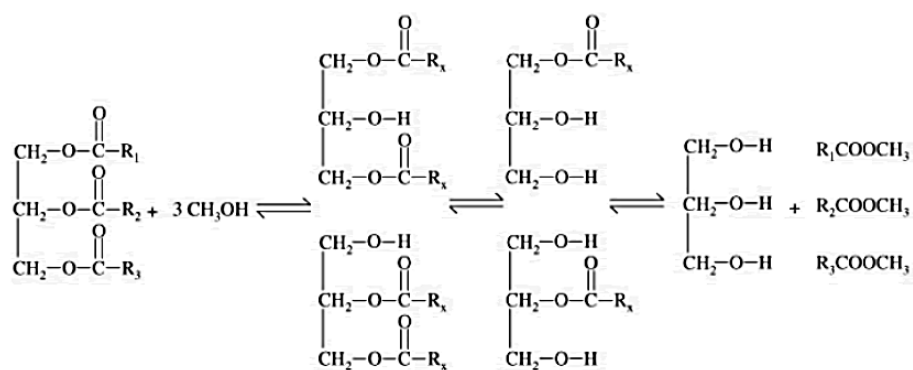
Sin embargo, pese al desarrollo tecnológico en el campo de biorrefinerías de microalgas, actualmente la relación coste-eficiencia, el rendimiento de lípidos en la etapa de extracción y la evaluación de impactos ambientales, constituyen un cuello de botella en la extracción de lípidos con fines de obtención de biocombustibles, enfocando los estudios en el desarrollo de métodos sostenibles y más respetuosos con el medioambiente [129]. El cambio a disolventes más respetuosos con el medioambiente para sustituir el uso de cloroformo y metanol, ha sido estudiado y se ha propuesto en su lugar el uso de mezclas de acetato de etilo y etanol como opciones de disolventes menos tóxicos [126]. En este trabajo doctoral se seleccionó el método de extracción tradicional mecánico y químico para la extracción de lípidos y ácidos grasos; esto implica la ruptura de la pared celular de las microalgas por medios físicos con el uso de técnicas de vórtex o sonicación, seguido de un proceso químico que implica el contacto con uno o varios disolventes empleados comúnmente en la extracción de lípidos.

Para la obtención de ácidos grasos libres se realiza la reacción de saponificación con biomasa de microalgas (seca o húmeda) y el uso de un disolvente (metanol) y de un catalizador básico (NaOH o KOH). La mezcla se lleva a reflujo constante cerca de 1-4 horas con agitación y temperatura próxima a 60-70 °C [130]. La esterificación puede llevarse a cabo sin la adición de catalizadores debido a la débil acidez de los propios ácidos carboxílicos, pero la reacción es extremadamente lenta y requerirá de varios días para alcanzar el equilibrio en condiciones de reacción típicas [131].

### **1.5.3 Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos**

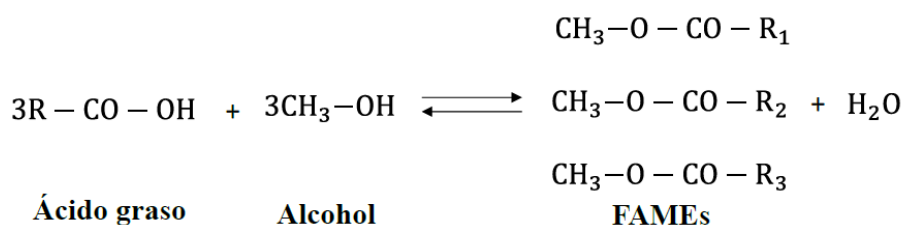
El biodiésel es una molécula conformada por ésteres monoalquílicos de ácidos grasos que puede obtenerse a partir de transformaciones químicas que implican reacciones de transesterificación de lípidos saponificables (triglicéridos, fosfolípidos, glucolípidos y esfingolípidos) con un alcohol (normalmente metanol, pero también puede emplearse etanol) y que produce un éster de ácido graso y glicerol (Figura 1.10). Otra opción es la reacción de esterificación de ácidos grasos y alcohol, que produce también ésteres metílicos de ácidos grasos que conforman el biodiésel (Figura 1.11).

## Introducción



**Triglicéridos    Metanol    Diglicéridos    Monoglicéridos    Glicerol    Ésteres metílicos**

**Figura 1.10.** Esquema de la reacción general de transesterificación de los triglicéridos a éster metílico de ácido graso (tomado de [118]).



**Figura 1.11.** Esquema de la reacción general de esterificación de ácidos grasos a éster metílico de ácido graso (tomado de [118]).

En ambas reacciones es posible emplear o no un catalizador. Para poder desarrollar la transesterificación de los lípidos saponificables o la esterificación de los ácidos grasos libres se requiere de la extracción de los lípidos de las microalgas; este proceso es conocido como un proceso indirecto; aunque también es posible tener un proceso directo combinando la extracción de lípidos con la etapa de reacción al utilizar biomasa seca de microalgas, un alcohol como disolvente de extracción y reactivo de la reacción, lo que hace al proceso más sencillo y económico [118].

La producción de ésteres metílicos de ácidos grasos como los que se encuentran en el biodiésel se realiza con la reacción de transesterificación, una reacción química común en la que un alcohol primario reacciona con triglicéridos de ácidos grasos, en presencia de un catalizador. El alcohol empleado es metanol, pero pueden obtenerse ésteres etílicos o butílicos empleando etanol o butanol, respectivamente. El catalizador puede ser básico o ácido. Además de los ésteres metílicos, se produce glicerol como subproducto de la reacción, y puede ser utilizado en la industria del jabón [132].

## Introducción

---

La reacción de transesterificación presenta como ventajas el ser uno de los métodos más utilizados por su simplicidad y bajo coste para convertir aceites de origen vegetal en combustibles como el biodiésel. Respecto del catalizador, pueden usarse catalizadores homogéneos básicos (NaOH, KOH), homogéneos ácidos ( $H_2SO_4$ , HCl, HI), catalizadores heterogéneos (resinas sulfónicas comerciales), catalizadores enzimáticos (lipasas), entre los más reportados en la bibliografía [133–135]; la reacción requiere de agitación continua a diferentes temperaturas de operación que varían desde la temperatura ambiente hasta los 90 °C . Al finalizar la reacción se deja enfriar el producto y se obtendrá la separación de las dos fases; el glicerol, que es más denso que el biodiésel se encontrará en la parte inferior del embudo de separación después de un tiempo de decantación. Sin embargo, existen algunos parámetros que tienen efecto sobre la reacción y su rendimiento puede verse limitado por la temperatura, tiempo y agitación de la reacción, el tipo y concentración de catalizador, las proporciones de los reactivos utilizados, etc.; por ello, es común la optimización de los parámetros de reacción para mejorar el rendimiento [135].

Muchos investigadores de este campo de estudio enfocan los estudios de biocombustibles hacia opciones y tecnologías más respetuosas con el medioambiente implementando mejoras en el diseño de biorreactores, las técnicas de recolección de biomasa para evitar o reducir el coste asociado a la etapa de secado, los disolventes de extracción de lípidos y la propia reacción de transesterificación que constituye el paso más importante para producir un combustible más limpio; por ello el uso de enzimas alcalinas o ácidas y lipasas se ha propuesto como una opción más limpia. Sin embargo, el coste de las lipasas es alto, por esto y algunas otras dificultades para alcanzar incrementos en rendimiento y cantidades producidas de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos a partir de microalgas, aún no es factible que el biodiésel obtenido pueda competir con el combustible diésel convencional [136].

# **OBJETIVOS**



### 2. Objetivos

Por lo expuesto anteriormente, las microalgas se presentan como una opción prometedora para la obtención de productos de alto valor añadido tras su paso por una biorrefinería; sin embargo, diversos problemas técnicos y económicos aún no le permiten competir directamente con la industria petrolera para suplir la energía requerida por la sociedad. Por ello, se siguen buscando opciones para reducir todos los requerimientos energéticos y de materiales posibles que inciden directa o indirectamente en los costes de capital de una biorrefinería de microalgas con el propósito de hacerla rentable, eficiente y sustentable en todas sus etapas.

En este sentido, y considerando los problemas ambientales asociados al vertido de aguas residuales a cuerpos de agua, suelos o sistemas de alcantarillado sin tratamientos previos en una PTAR en Ecuador, en esta tesis doctoral se planteó hacer uso de aguas residuales de industria porcina, industria cervecera artesanal y piscicultura como medio de cultivo de dos especies de microalgas de forma individual en los tres tipos de aguas residuales; y en consorcio con el agua residual más compleja, en fotobiorreactores expuestos a la intemperie aprovechando las condiciones climáticas de la ciudad de Quito, para ello se plantearon los siguientes objetivos:

#### Tratamiento de aguas residuales industriales con microalgas

- Recolectar las aguas residuales de interés: aguas residuales de la industria porcina, industria cervecera y piscicultura.
- Determinar la viabilidad del cultivo de las especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en las aguas residuales seleccionadas en este estudio: agua residual de la industria porcina, de la industria cervecera y de piscicultura mediante caracterización fisicoquímica para su tratamiento.
- Obtener biomasa microalgal de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en fotobiorreactores planos de 60 L expuestos a la intemperie en las condiciones climáticas de Quito, usando las aguas residuales industriales de estudio como medio de cultivo para la obtención de parámetros cinéticos.
- Determinar la eliminación de nutrientes en cada agua residual de estudio mediante la comparación de la caracterización fisicoquímica antes y después de cada cultivo y la verificación del cumplimiento de la normativa ecuatoriana vigente para la descarga de dichas aguas tratadas al sistema de alcantarillado municipal.

## Objetivos

---

- Evaluar la viabilidad del cultivo de un consorcio microalgal de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en el agua residual con mejor comportamiento en los objetivos anteriormente planteados.
- Determinar la reducción de nutrientes en el agua residual seleccionada lograda a partir del cultivo del consorcio de microalgas mediante la comparación de la caracterización fisicoquímica antes y después de cada cultivo. Se verificará el cumplimiento de la normativa ecuatoriana vigente para la descarga de dichas aguas tratadas al sistema de alcantarillado municipal.

### Valorización energética de la biomasa obtenida

- Extracción y caracterización de la fracción lipídica de la biomasa microalgal cosechada en los tres tipos de aguas residuales empleando seis disolventes extractores diferentes en términos de lípidos totales y ácidos grasos libres.
- Producir ésteres metílicos de ácidos grasos a partir del método directo (a partir de la biomasa microalgal completa seca y húmeda) y métodos indirectos (a partir de lípidos y AGL previamente extraídos) para la determinación del rendimiento gravimétrico de la reacción y la conversión a biodiesel mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H). Se evaluarán distintos tipos de catálisis para comparar el rendimiento y conversión obtenidos.

# **METODOLOGÍA**





### 3. Metodología

En este apartado se incluyen los materiales, instalaciones y procedimientos experimentales desarrollados para el alcance de los objetivos planteados en este estudio doctoral. Este estudio doctoral se desarrolló bajo el convenio existente entre la Universidad Rey Juan Carlos en España y la Universidad Internacional SEK de Ecuador. El 70 % del trabajo experimental se desarrolló en Ecuador para aprovechar las condiciones climáticas de Quito y el resto de la experimentación se desarrolló en las instalaciones del Grupo de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos en el campus de Móstoles.

#### 3.1 Tratamiento de aguas residuales de origen industrial mediante microalgas

##### 3.1.1 Recolección de aguas residuales a tratar

Se recolectaron aproximadamente 200 L de cada uno de los tipos de aguas residuales a emplear. La Figura 3.1 muestra una imagen referencial de las aguas residuales seleccionadas. En el caso del agua residual de industria porcina la recolección se realizó en una pequeña empresa familiar dedicada al faenamiento de cerdos en la ciudad de Latacunga, Ecuador. El agua residual de industria cervecera se recolectó en una pequeña empresa dedicada a la elaboración de cerveza artesanal en la ciudad de Quito, Ecuador. El agua residual de piscicultura se recolectó en criaderos de especies comerciales en Nanegalito, Ecuador.



**Figura 3.1** Aguas residuales seleccionadas para su tratamiento con microalgas: industria porcina (A), industria cervecera (B) y piscicultura (C).

Para todos los casos se realizó una breve mezcla de cada agua para homogeneizar y suspender los nutrientes depositados en la parte inferior de los tanques de almacenamiento de las aguas residuales. Las aguas recolectadas se almacenaron en recipientes plásticos de 20 L, limpios, sellados, etiquetados y almacenadas a 4 °C hasta su uso posterior; lo cual implicó una filtración multicapas (diámetro de poro de 0,6 a 1,6 mm) y esterilización en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 30 minutos previa a cada cultivo. Ninguna de las empresas poseía PTAR.

### 3.1.2 Obtención del inóculo

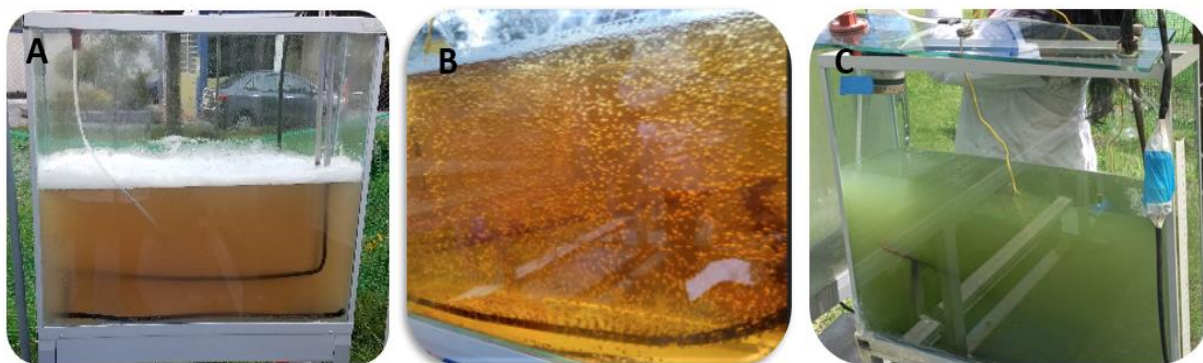
Para este estudio se emplearon cepas de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. procedentes del Banco Español de Algas que se preservaron en la ciudad de Quito, Ecuador en el Laboratorio de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK en medio comercial Bold's Basal Medium (BBM) [137,138]. El BBM se preparó con 10 g de NaNO<sub>3</sub>, 3 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g de NaCl, 3 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. Como elementos traza en solución se añadieron 8,82 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,44 g de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,71 g de MoO<sub>3</sub>, 1,57 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,49 g de Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 11,42 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 50 g de EDTA, 31 g de KOH, 4,98 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado [139]. Dichos compuestos fueron diluidos en agua destilada hasta completar un volumen de 1 L conforme a cada stock establecido en la receta del medio BBM y se autoclavaron previo a su uso como medio de cultivo.

### 3.1.3 Preparación del medio de cultivo e inóculo

Cada inóculo se mantuvo en reactores conformados por botellas autoclavables de 1 L con medio de control BBM durante 7 días hasta alcanzar una concentración celular adecuada ( $\sim 10^5$  cel/mL). Los reactores se adaptaron con filtros de entrada y salida de aire (diámetro de poro de 0,45  $\mu$ m), a temperatura ambiente y bajo condiciones controladas de irradiancia lumínica con luz artificial blanca constante a 150  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup> y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas en el laboratorio [140]. Aunque no se realizaron pruebas moleculares para garantizar cultivos monoalgales, mediante observación al microscopio se trató de verificar morfológicamente que los cultivos fueran de una única especie; y en caso de detectar contaminación o mezcla de las especies, se guardaba el inóculo para conformar los consorcios.

### 3.1.4 Siembra en fotobiorreactores

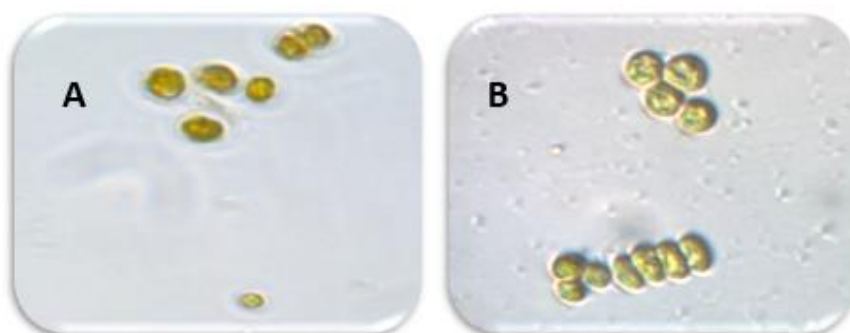
Todos los cultivos se sembraron en fotobiorreactores de vidrio templado (71,3 cm de largo x 8,8 cm de ancho x 61 cm de alto), acoplado a termopares para el monitoreo, con control de la temperatura en 28 $\pm$ 2 °C y mangueras de aireación conectadas a un compresor para mantener el cultivo en suspensión constante con un flujo de aire de 4,2 L/min. La concentración de los cultivos se realizó en proporción 1:10 v/v de microalga:agua residual y se mantuvieron a la intemperie bajo condiciones atmosféricas de la ciudad de Quito con control diario de pH. Cada cultivo de agua residual para cada cepa se realizó por triplicado y contó con su respectivo control en medio BBM para su comparación. La Figura 3.2 muestra los colores que presentaba cada tipo de agua residual previo a la siembra de microalgas.



**Figura 3.2** Aguas residuales en fotobiorreactores previo a la siembra de las microalgas: agua residual de industria porcina (A), agua residual de cervecería artesanal (B) y agua residual de piscicultura (C).

### 3.1.5 Crecimiento celular y peso seco

Para cada tipo de agua residual y especie de microalga sembrada en los fotobiorreactores se recolectaron muestras diarias de 150 mL en botellas de plástico previamente lavadas y desinfectadas bajo luz UV. Las muestras se refrigeraron durante 24 horas a 4 °C para ralentizar el crecimiento celular [141].



**Figura 3.3** Microalgas *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) cultivada en agua residual de piscicultura observada desde un microscopio con objetivo de 100X.

La determinación del crecimiento se realizó por conteo celular y peso seco. El conteo celular se hizo en cámara de Neubauer usando un microscopio óptico marca Leica para poder visualizar las células a 40X y 100X [142]. En la Figura 3.3 se muestra un ejemplo para las especies de microalgas de estudio durante un conteo celular al microscopio a 100X. En las muestras con gran concentración de microalgas se realizaron diluciones 1:10 o 1:100 para facilitar el conteo por triplicado. La concentración celular se determinó con la Ecuación (1).

La determinación de la concentración de biomasa microalgal o peso seco se realizó por gravimetría [143]; para cada caso se dejó secar 1 mL de cada muestra sobre papel de filtro

## Metodología

---

previamente pesado de 125 mm de diámetro en una estufa a 60 °C durante 24 horas. Se llevaron a un desecador durante un tiempo de 30 min y una vez a temperatura ambiente, se pesó cada muestra hasta obtener un peso constante [144]. El peso seco se calculó a partir de la Ecuación (2) por diferencia de pesos. En cada cultivo y para cada especie se determinó la productividad total de la biomasa obtenida con la Ecuación (3), la cual relaciona la biomasa total en gramos (g) para el volumen total de cada cultivo expresado en litros (L) y el tiempo final del cultivo en días (d).

$$\text{Concentración celular} \left( \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{núm. células} \left( \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) \cdot 10.000}{\text{núm. cuadros}} \cdot \text{dilución} \quad (\text{Ec. 1})$$

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

$$\text{Productividad total} = \frac{\text{Biomasa total} (\text{g})}{\text{Volumen} (\text{L}) \cdot \text{Tiempo} (\text{d})} \quad (\text{Ec. 3})$$

### 3.1.6 Caracterización elemental de la biomasa microalgal

Al finalizar cada cultivo, el contenido de los fotobiorreactores se cosechó y centrifugó a 4000 rpm en tres series hasta obtener una pasta concentrada de microalgas. Una parte de la biomasa se secó en estufa durante 24 h a 100 °C para posteriormente ser pulverizada manualmente y así obtener la biomasa seca. Otra parte se mantuvo húmeda y en refrigeración para poder realizar el análisis de lípidos totales en base húmeda y su respectiva comparación en base seca. También se reservaron 4 L del líquido sobrenadante de cada cultivo para pruebas de análisis por adsorción atómica en laboratorios externos. La biomasa seca se caracterizó a nivel elemental (H, C, N, S, O) usando un Analizador elemental Vario EL III (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany).

### 3.1.7 Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales

La caracterización fisicoquímica de todos los tipos de aguas residuales se realizó tanto para las aguas residuales previas al cultivo, como al sobrenadante obtenido posterior al cosechado con los métodos estandarizados expresados en el Anexo 1, que incluyen nitrógeno total, fósforo total, carbono orgánico total, DQO, metales (Ca, Cu, Cr, Fe, Mo, Ni, Pb, K y Na), nitrógeno amoniacal y oxígeno disuelto. Las muestras de aguas residuales se centrifugaron de

acuerdo con el tiempo establecido en cada protocolo y se determinó la concentración y el porcentaje de eliminación de todos los parámetros analizados con la Ecuación (4) que relaciona la diferencia entre la concentración inicial del nutriente ( $C_I$ ) y la concentración final del mismo ( $C_F$ ) para la misma concentración inicial del nutriente ( $C_I$ ) por 100 % que determinará el grado de eliminación de un determinado nutriente en el agua residual.

$$\text{Eliminación de nutrientes (\%)} = \frac{(C_I - C_F)}{C_I} \cdot 100\% \quad (\text{Ec. 4})$$

Se analizó la concentración final de cada parámetro fisicoquímico para ser comparado con los límites de descarga al sistema de alcantarillado municipal vigente que establece el Acuerdo Ministerial N° 097-A de Calidad Ambiental del Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica de fecha marzo de 2015 y que sustituye al libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio de Ambiente (TULSMA) (Anexo 2).

### 3.2 Aprovechamiento energético de la biomasa obtenida

#### 3.2.1 Extracción de lípidos totales

Para la extracción de lípidos totales se empleó la biomasa microalgal húmeda y seca de las microalgas usadas en el presente estudio. El método de extracción de lípidos seleccionado fue el propuesto por Bligh y Dyer modificado [145–147], [148], incluyendo el lavado con NaCl al 0,58 % para incrementar la pureza de la muestra y centrifugaciones a 4000 rpm para homogenizar la extracción. Adicionalmente, este procedimiento se acompañó con la técnica de sonicación para romper la pared y la membrana de las microalgas [149]. La extracción de lípidos se llevó a cabo por triplicado con la mezcla cloroformo: metanol (1:2), hexano, acetato de etilo, metilciclohexano, metanol y etanol como disolventes orgánicos extractores. La selección de disolventes se realizó en base a la revisión bibliográfica realizada [150].

El porcentaje de lípidos totales de cada disolvente extractor se determinó por gravimetría con la Ecuación (5), donde  $P_L$  es el peso del frasco con el contenido lipídico extraído y seco en gramos, y  $P_B$  al peso de la biomasa microalgal seca o húmeda en gramos, siendo el porcentaje representado en % m/m [146,151]. La productividad total volumétrica de lípidos se calculó a partir de la Ecuación (6), donde  $M_L$  representa la masa de los lípidos, ( $V$ ) el volumen del cultivo expresado en litros, y ( $t$ ), el tiempo cultivo expresado en días [152]. Todas las muestras se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como el promedio con su desviación estándar.

$$\text{Lípidos totales(\%)} = \frac{P_L}{P_B} \cdot 100 \% \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\text{Productividad Total Volumétrica de lípidos} \left( \frac{g}{L \cdot d} \right) = \frac{M_L}{V \cdot t} \quad (\text{Ec. 6})$$

### 3.2.2 Extracción de ácidos grasos libres (AGL)

La extracción de ácidos grasos libres se realizó con 0,5 gramos de biomasa seca de cada especie de microalga mediante la saponificación de biomasa con 20 mL de metanol y 0,1 g de KOH como catalizador básico. La muestra se mantuvo a reflujo constante durante un tiempo de 4 horas a 300 rpm y 60 °C en un baño térmico como se muestra en la Figura 3.4 (A) [153]. El material extraído se filtró con una bomba de vacío y se ajustó el pH con HCl 1 M; seguidamente se pasó a un embudo de decantación para lograr la separación de fases, una fase orgánica que contiene los ácidos grasos y otra inorgánica compuesta por residuos contaminantes no lipídicos (Figura 3.4 B) para la purificación de la muestra [154]. El porcentaje de ácidos grasos se midió por gravimetría considerando el peso del frasco vacío ( $T_1$ ) y el peso del frasco con ácidos grasos libres ( $T_2$ ) en gramos, dividido por el peso inicial de biomasa utilizada para la extracción ( $W$ ) con la Ecuación (7) [152].

$$\text{AGL (\%)} = \left( \frac{T_2 - T_1}{W} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 7})$$



**Figura 3.4** A) Equipo de reflujo empleado para la extracción de los ácidos grasos libres. B) Imagen de la etapa de separación bifásica posterior a la extracción de ácidos grasos libres.

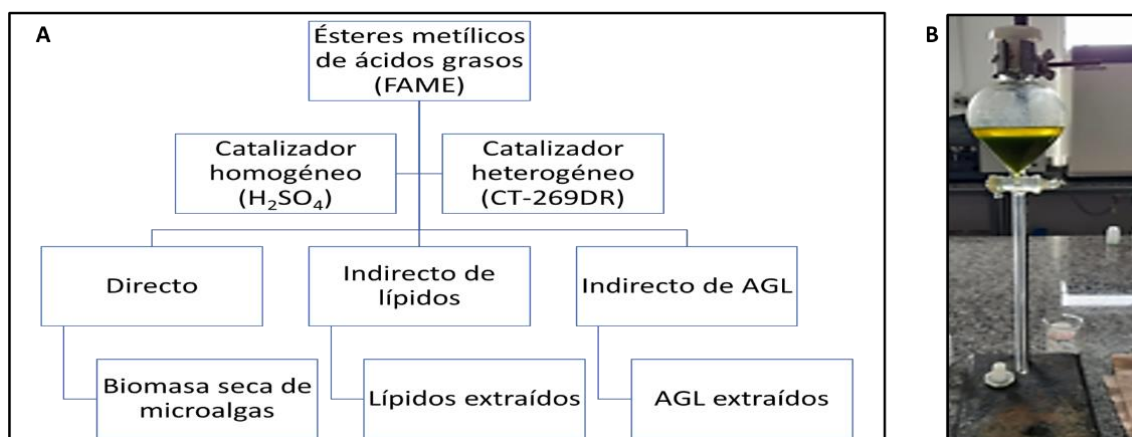
### 3.2.3 Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

La obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se realizó siguiendo el esquema de trabajo que se muestra en la Figura 3.5 A, considerando el método directo como la reacción de transesterificación a partir de biomasa completa, y el método indirecto como la obtención de FAME a partir de los lípidos y ácidos grasos libres extraídos en las etapas previas (3.2.1 y 3.2.2). La reacción de transesterificación fue catalizada empleando dos catalizadores ácidos;

## Metodología

uno homogéneo (ácido sulfúrico -  $H_2SO_4$ ) y uno heterogéneo (resina comercial CT-269DR). La reacción directa se realizó con una relación entre catalizador, disolvente y biomasa de (1,74:15:1) (m:m:m) para el  $H_2SO_4$  y de (1,1:70:1) (m:m:m) para la resina, colocando 0,1 g de biomasa seca. Para la reacción por el método indirecto se usó una relación entre catalizador, disolvente y lípidos de (1,74:15:1) (m:m:m) para el  $H_2SO_4$  y de (1,1:70:1) (m:m:m) para la resina empleando 0,01 g de lípidos o AGL extraídos. Ambos casos a una temperatura constante de 90 °C durante 4 horas en tubos de vidrio que actuaron como reactores y agitadores magnéticos sumergidos en un baño térmico a 400 rpm [135,150]. Finalizado el tiempo de reacción, las muestras se filtraron a vacío para retener las impurezas y se lavaron con 5 mL de agua ultrapura y 2 mL de la mezcla hexano: dietiléter (80:20), se pasaron a un embudo de decantación hasta alcanzar la separación de fases (Figura 3.5 B). La fase orgánica que contiene los FAME se extrajo con una pipeta Pasteur y se llevó a una estufa de secado a 60 °C hasta alcanzar peso constante. Se cuantificó el porcentaje de ésteres metílicos por gravimetría a partir de la Ecuación (8), en donde se determina el porcentaje por la diferencia de pesos entre el frasco con los FAME producidos ( $T_2$ ) y el frasco vacío ( $T_1$ ), dividido para la biomasa usada ( $W$ ) en gramos [152]. Todas las extracciones se realizaron por triplicado y los resultados se muestran en % m/m.

$$\text{Producción de FAME (\%)} = \left( \frac{T_2 - T_1}{W} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 8})$$



**Figura 3.5** A) Flujo de trabajo para la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos a partir de biomasa directa, lípidos y AGL extraídos. B) Imagen referencial de la etapa de separación para la obtención de biodiésel a partir de biomasa microalgal cultivada en aguas residuales del presente estudio.



## Metodología

---

Para analizar si las muestras de FAME presentaban características próximas al biodiésel, se disolvieron las muestras secas de FAME en cloroformo deuterado (cloroformo-d) y se analizaron con la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de protón en estado líquido (RMN- $^1\text{H}$ ), con la que se puede relacionar el área de las señales generadas por los protones de los grupos metilo de los ésteres ( $A_{\text{ME}}$ ) con las señales de los protones de metilenos de triglicéridos y ácidos grasos libres que no han reaccionado ( $A_{\alpha\text{CH}_2}$ ) a 2,2 ppm de acuerdo a la ecuación (9) para determinar la conversión a FAME [155,156].

$$\text{Conversión a FAME (\%)} = \frac{2 \cdot A_{\text{ME}(3.6 \text{ ppm})}}{3 \cdot A_{\alpha\text{-CH}_2}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 9})$$

Para los datos obtenidos en la determinación del crecimiento celular (conteo celular y peso seco) y los parámetros fisicoquímicos nitrógeno total, carbono orgánico total y fósforo total se realizaron por triplicado comparando las medias de los valores obtenidos por las pruebas analizadas por Kruskal Wallis, con el programa IBM SPSS Statistics versión 25 siendo, dichas diferencias, significativas cuando el valor  $p$  sea mayor a 0,05 ( $p > 0,05$ ).

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Tratamiento de aguas residuales de origen industrial mediante microalgas

#### 4.1.1 Caracterización del agua residual antes y después del cultivo de microalgas

##### a) Agua residual de la industria porcina

El agua residual de industria porcina, una vez recogida, se analizó en términos de la concentración de macronutrientes como el nitrógeno total, fósforo total, carbono orgánico total y pH. También, se realizó la determinación del contenido de metales presentes. Como se ha comentado anteriormente, el medio de control empleado para la comparación de valores de macronutrientes fue el medio Bold's Basal Medium (BBM). A través de una comparación directa de los parámetros analizados, se verificó la viabilidad del agua residual de la industria porcina como medio de cultivo para las microalgas de estudio. En la Tabla 4.1.1 se muestran los resultados de la caracterización inicial del agua residual de industria porcina y del medio de control BBM.

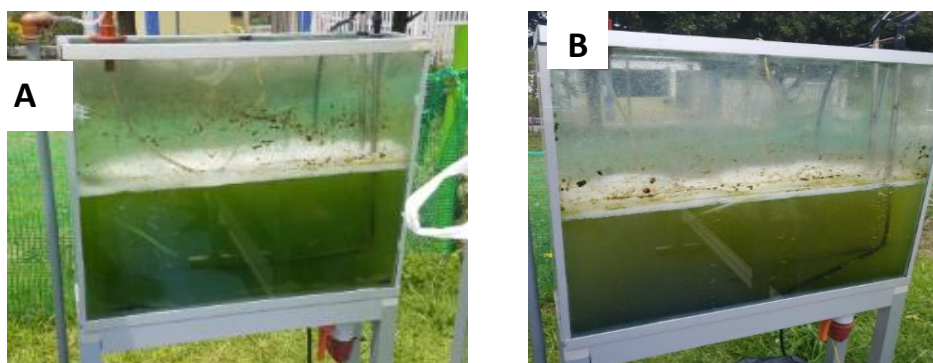
**Tabla 4.1.1** Concentración inicial de macronutrientes principales, metales y otros parámetros fisicoquímicos presentes en el agua residual de industria porcina y el medio BBM previo al cultivo de las especies de microalgas de estudio.

Parámetros Fisicoquímicos	ARFP para <i>Chlorella vulgaris</i>	ARFP para <i>Scenedesmus sp.</i>	BBM
Nitrógeno Total (mg/L N)	95 ± 0,9	75 ± 0,4	34,5 ± 2,83
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	60 ± 1,2	99,9 ± 0,6	127,8 ± 0,42
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	421 ± 0,8	438 ± 1,3	4 ± 0,01
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	464 ± 16	416 ± 6	255,05 ± 9,5
Calcio (mg/L)	23,89 ± 0,72	21,22 ± 0,67	9,43 ± 0,57
Cobre (mg/L)	0,059 ± 0,004	0,055 ± 0,002	0,014 ± 0,001
Cromo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05 LC	< 0,02 LD
Hierro (mg/L)	1,88 ± 0,11	1,86 ± 0,15	0,19 ± 0,01
Molibdeno (mg/L)	< 0,1 LC	< 0,1 LC	< 0,1 LD
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	71,97	69,17	1,23
Níquel (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05 LC	< 0,05 LC
Plomo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05 LC	< 0,004 LD
Potasio (mg/L)	25,1 ± 1,7	23,4 ± 1,1	95,70 ± 6,98
Sodio (mg/L)	50,3 ± 3,2	53,3 ± 2,4	105,95 ± 7,72
Turbidez (NTU)	473	455	0,15
pH	7,02 ± 0,6	6,7 ± 0,5	7,01 ± 0,2

LD: Límite de Detección. LC: Límite de cuantificación

Para la recolección del agua residual se realizaron dos muestreos en diferentes fechas, razón por la cual las características de las aguas residuales presentaron pequeñas diferencias en las concentraciones de sus macronutrientes pese a haber sido recolectadas en el mismo lugar. A excepción del fósforo total, cuyo contenido en el agua residual es menor a la concentración existente en el medio BBM, los otros macronutrientes presentan un contenido de nitrógeno total y carbono orgánico total más alto respecto del medio BBM, un medio de cultivo sintético de amplio uso en cultivos de microalgas. Al constatar por simple comparación la existencia de nutrientes en el agua residual, se procedió a iniciar los cultivos en los fotobiorreactores. Dichos cultivos se realizaron entre los meses de octubre de 2020 y enero de 2021, expuestos a las condiciones ambientales de la ciudad de Quito en Ecuador. Los fotobiorreactores empleados tenían una capacidad de 60 L de cultivo, empleando el 60-80 % de su volumen para dejar el espacio necesario para mantener un volumen de gas y/o la posible formación de espumas por el suministro de aireación.

En los fotobiorreactores se añadieron conjuntamente inóculo de microalgas y agua residual de faenamiento previamente esterilizada en una proporción 1:10 en volumen. Se mantuvo una aireación constante proporcionada por un compresor y diariamente se realizó control de pH y toma de muestras para el análisis de la cinética de crecimiento y peso seco. Con el fin de reducir costes en la etapa de cultivo, no se realizó reposición de medio durante el tiempo de cultivo. La Figura 4.1.1 muestra los fotobiorreactores para las dos especies al sexto día de cultivo.



**Figura 4.1.1** Imagen de los fotobiorreactores al sexto día de la siembra de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) en agua residual de industria porcina.

Finalizados los cultivos, se realizó la cosecha de estos y el exceso de agua se eliminó con sucesivas centrifugaciones hasta obtener una pasta concentrada de microalgas. El líquido sobrenadante se almacenó para ser analizado y evaluar la capacidad de biorremediación de las microalgas con la eliminación de nutrientes y metales del medio. En la Tabla 4.1.2 se observan los porcentajes de eliminación de los parámetros analizados del agua residual de la industria

porcina al inicio del cultivo y en el sobrenadante final para las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

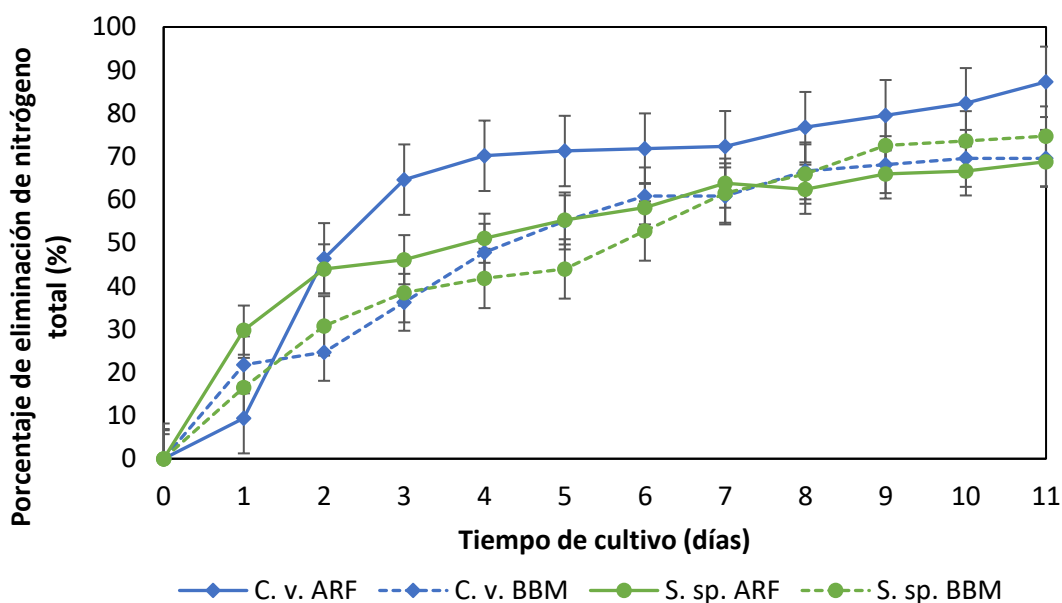
**Tabla 4.1.2** Eliminación de nutrientes en agua residual de la industria porcina por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

<b>Especie de microalga: <i>Chlorella vulgaris</i></b>			
<b>Parámetros Físicoquímicos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Eliminación Total (%)</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	90,5 ± 0,9	11,5 ± 1,12	87,29
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	49,55 ± 1,2	22,85 ± 0,37	53,88
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	371 ± 0,8	96,5 ± 0,01	73,99
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	464 ± 16	103 ± 4	77,8
Calcio (mg/L)	23,89 ± 0,72	9,1 ± 0,05	61,91
Cobre (mg/L)	0,059 ± 0,004	0,19 ± 0,03	-
Cromo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,01 LD	80
Hierro (mg/L)	1,88 ± 0,11	0,07 ± 0,08	96,28
Molibdeno (mg/L)	< 0,1 LC	< 0,05	50
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	71,97	5,10 ± 0,64	92,91
Níquel (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05	*
Plomo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05 LD	*
Potasio (mg/L)	25,1 ± 1,7	11,75 ± 1,02	53,19
Sodio (mg/L)	50,3 ± 3,2	8,79 ± 2,52	82,52
<b>Especie de microalga: <i>Scenedesmus</i> sp.</b>			
<b>Parámetros Físicoquímicos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Eliminación Total (%)</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	70,5 ± 2,12	22 ± 1,41	68,79
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	98,45 ± 0,35	39,05 ± 1,63	60,34
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	368,5 ± 14,85	144 ± 1,41	60,92
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	411 ± 7	97 ± 5	76,4
Calcio (mg/L)	20,19 ± 0,12	8,3 ± 0,08	58,89
Cobre (mg/L)	0,061 ± 0,03	0,11 ± 0,06	-
Cromo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,01 LD	80
Hierro (mg/L)	1,78 ± 0,21	0,09 ± 0,01	94,94
Molibdeno (mg/L)	< 0,1 LC	< 0,05	50
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	65,27	7,10 ± 0,34	89,12
Níquel (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05	*
Plomo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05 LD	*
Potasio (mg/L)	20,1 ± 1,6	33,7 ± 1,31	-
Sodio (mg/L)	50,3 ± 3,2	44,00 ± 3,56	12,52

LD: Límite de Detección. LC: límite de cuantificación \*Valores fuera de rango. -Sin eliminación

Conforme a los resultados de la Tabla 4.1.2, los análisis realizados para los macronutrientes nitrógeno, fósforo y carbono orgánico total de ambas especies de microalgas muestran porcentajes de eliminación de nutrientes superiores al 50 % al finalizar el cultivo en el agua residual de la industria porcina para ambas especies. En términos generales se observa que hubo eliminación de DQO, calcio, cromo, hierro, molibdeno, nitrógeno amoniacal, potasio y sodio del medio de cultivo. Para el cobre y el potasio, en el cultivo de la especie *Scenedesmus* sp., se observó un incremento de concentración probablemente debido al cobre y potasio presentes en el inóculo de las microalgas cultivado en medio BBM, medio que contiene estos metales en su composición; mientras que para el níquel y el plomo no fue posible calcular el porcentaje de eliminación ya que las concentraciones estuvieron fuera del rango de sensibilidad de la técnica empleada (menores a 0,05 mg/L).

La Figura 4.1.2 muestra el porcentaje de eliminación de nitrógeno total (NT) para ambas especies de microalgas al final de su cultivo. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar correspondiente. Para la especie *Chlorella vulgaris* se observa una eliminación de nitrógeno total de 87,29 % en el día 11, correspondiente a una concentración final de nitrógeno total de  $11,5 \pm 1,12$  mg/L N. Por su parte el medio BBM alcanzó una eliminación del nutriente del 69,57 %, correspondiente a una concentración final de  $10,5 \pm 3,54$  mg/L N.



**Figura 4.1.2** Porcentaje de eliminación de nitrógeno total (NT) vs. tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en agua residual de industria porcina (ARFP) y medio de control BBM.

En cuanto al NT eliminado por esta especie puede indicarse que el valor alcanzado en el presente estudio es mayor en el agua residual de la industria porcina en comparación con el medio de control. La literatura respecto a la reducción de nutrientes en aguas residuales procedente de mataderos de cerdos es escasa; sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo son mejores a los reportados por otros autores para el cultivo de la misma especie de microalga en agua residual de una granja porcina esterilizada y sin dilución, en la que se alcanzó un 61,66 % de reducción de NT en un ciclo de cultivo por lotes al cabo de 13 días, también en condiciones de exposición a la intemperie [37].

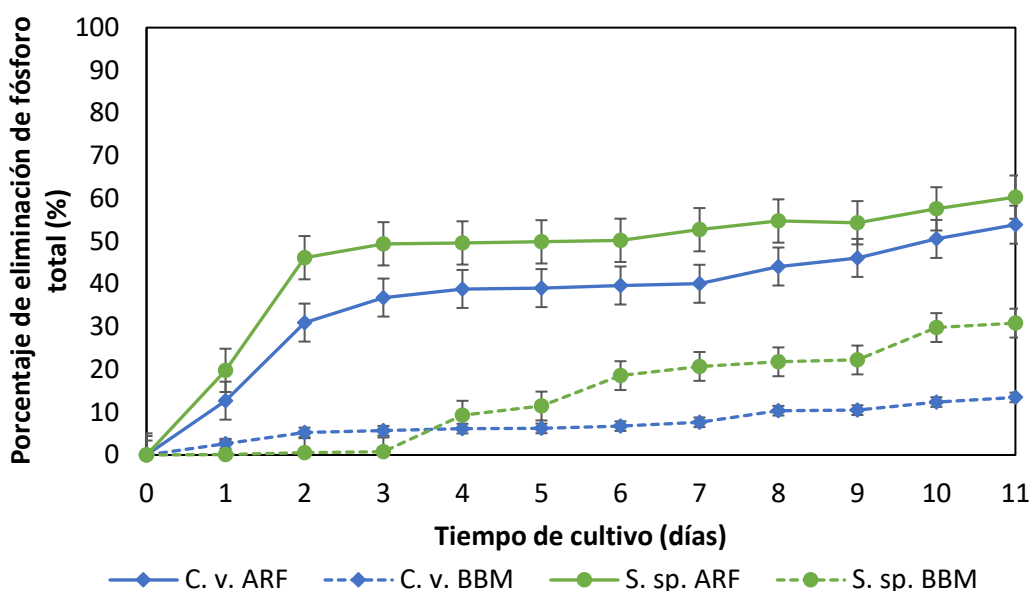
Para la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en ARFP y su control en medio BBM se observa que la eliminación de nitrógeno total fue de 68,79 % en el día 11, correspondiente a una concentración final de nitrógeno total de  $22 \pm 1,41$  mg/L N, mientras que su control en medio BBM alcanzó una eliminación del nutriente del 74,73 %, correspondiente a una concentración final de  $11,5 \pm 0,71$  mg/L N. Pese a que el medio de control presentó una reducción mayor respecto del ARFP, se observa en la Figura 4.1.2 que la eliminación del NT en el ARFP es mayor que el medio de control hasta el séptimo día, en el cual mejora el porcentaje de eliminación para el medio BBM. De forma análoga a la especie anterior, es escasa la literatura relacionada a la reducción de nutrientes en ARFP; sin embargo, al comparar con aguas residuales de naturaleza similar a las de este estudio se aprecia que la reducción de NT (68,79 %) es baja comparada con los valores reportados para *Scenedesmus* sp. cultivada en el medio comercial BG-11 durante 20 días (91 %), y también mayor al cultivarse en un digestato líquido (fracción líquida resultante de la producción de biogás), en el que la eliminación de NT fue de 90,07 % [157].

Comparando ambas especies, se aprecia que *Chlorella vulgaris* presentó una mayor reducción de NT en comparación con *Scenedesmus* sp. en el agua residual y en el medio control, lo que habla de su eficacia como especie para cultivos con aguas residuales con alta carga orgánica.

En cuanto a la eliminación del fósforo total la Figura 4.1.3 muestra el porcentaje de eliminación de fósforo al cabo de 11 días de cultivo para ambas especies. Como puede observarse en la Figura 4.1.3, la especie *Chlorella vulgaris* logró reducir 53,88 % del fósforo total, equivalente a una concentración de  $22,85 \pm 0,35$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$  de fósforo. Sin embargo, para el medio de control BBM se alcanzó una reducción de 13,78 %, correspondiente a una concentración de  $95,7 \pm 0,99$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ . La reducción de PT en el agua residual duplica a la obtenida en el medio de control; sin embargo, la eliminación alcanzada en este trabajo es baja comparándola con los resultados reportados en la bibliografía para la misma microalga cultivada



en agua residual porcina esterilizada procedente de una granja de cría de cerdos, en la que se alcanzó una eliminación de 74,3 % de PT tras 15 días de cultivo [158]. Puede inferirse que tiempos de cultivos más largos y condiciones alcalinas en el medio podrían conducir a una mayor eliminación de PT.



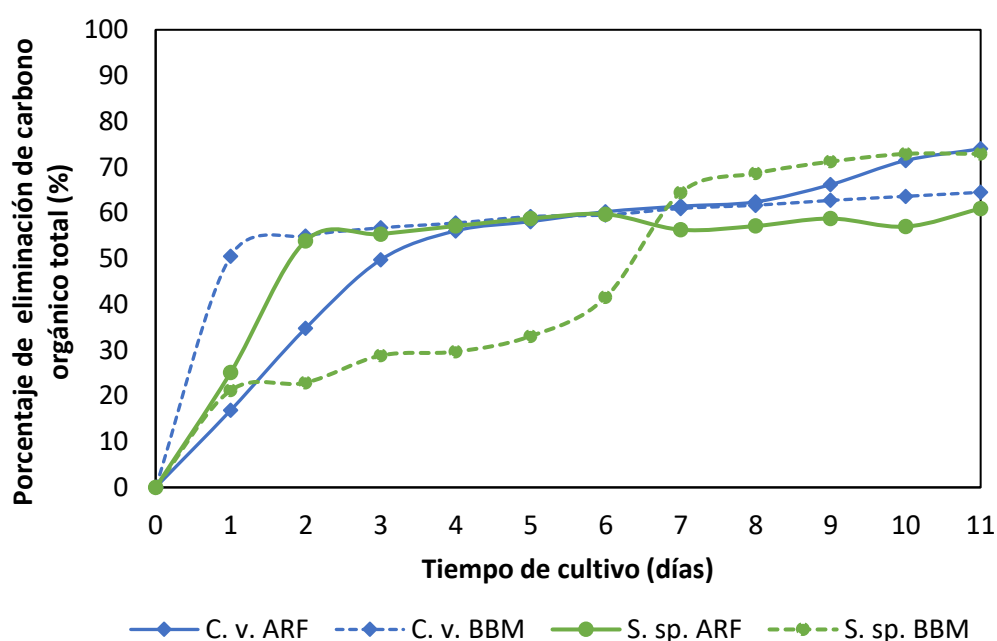
**Figura 4.1.3.** Porcentaje de eliminación de fósforo total (PT) vs. tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en agua residual de industria porcina (ARFP) y medio de control BBM.

Para la especie *Scenedesmus* sp. se observa una eliminación de 60,34 % del fósforo total, equivalente a una concentración de  $39,05 \pm 1,63 \text{ mg/L PO}_4^{-3}$  de fósforo en el ARFP; mientras que con el medio de control BBM la reducción es menor, con solo un 30,85 %, correspondiente a una concentración de  $80,25 \pm 0,07 \text{ mg/L PO}_4^{-3}$ . De forma análoga a la especie anterior, se aprecia que la reducción de PT en el agua residual duplica a la obtenida en el medio de control. Los valores de eliminación de PT encontrados para *Scenedesmus* sp. son bajos respecto a lo reportado por otros autores para la misma especie cultivada en un medio ideal para el crecimiento de esta microalga como lo es el medio BG-11 (95,6 %), o la eliminación alcanzada en un digestato líquido (95,68 %) [157]; pese a la diferencia de valores, puede decirse que la especie fue capaz de biorremediar el agua residual de industria porcina.

La eliminación de carbono se hizo respecto del carbono orgánico total (COT) presente en los medios de cultivos de cada especie. La Figura 4.1.4 muestra la eliminación del COT. Como se puede observar, la especie *Chlorella vulgaris* logró eliminar el 73,99 % del COT presente en el ARFP porcino, correspondiente a una concentración de carbono final de  $96,5 \pm 2,12 \text{ mg/L C}$ . En

el medio de control (BBM) se observó una eliminación del 64,49 % del carbono orgánico en el medio, dejando una concentración en el medio de  $100,5 \pm 6,36$  mg/L C. En la Figura puede verse que el medio control, aunque tuvo menor eliminación final, en los días 1 y 2 fue capaz de eliminar el 50 % del contenido de COT, mientras que el agua residual presentó una reducción más prolongada del nutriente.

El porcentaje de eliminación de la especie *Chlorella vulgaris* en el ARFP del estudio es similar a la reportada en la bibliografía para un cultivo de la misma especie cultivada en agua residual artificial enriquecida con nitrógeno en un proceso en condiciones mixotróficas por 180 días con una eliminación de TOC del 77,6 % [159]. Otros autores investigaron el efecto de combinar tratamientos de adsorción-eliminación con acidificación en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y la eliminación de nutrientes de aguas residuales porcinas alcanzando una eliminación de 85,54 % en cultivos de 12 días con pH 6 [160]; un valor superior al obtenido en el presente trabajo con un pH neutro. Este incremento en el valor puede estar asociado al hecho de que la acidificación del agua residual pueda descomponer compuestos orgánicos complejos en moléculas de nutrientes más pequeñas que pueden ser fácilmente asimiladas por las microalgas, lo que explica una mayor eficiencia en la eliminación de fuentes de carbono [161].



**Figura 4.1.4** Porcentaje de eliminación de carbono orgánico total (COT) vs. tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en agua residual de industria porcina (ARFP) y medio de control BBM.

La eliminación de COT de la especie *Scenedesmus* sp. en el ARFP del presente estudio fue del 60,92 % (Figura 4.1.4), equivalente a una concentración de COT en el medio de  $144 \pm 1,41$  mg/L C. En el medio de control BBM la eliminación de COT fue del 74,58 % ( $15 \pm 0,0$  mg/L C); mayor en comparación con el agua residual para las condiciones de cultivo de esta investigación. Al comparar este resultado con la literatura, la reducción del contenido de COT en el ARFP porcina es baja comparada con la eliminación alcanzada por la misma especie cultivada durante 13 días en aguas residuales urbanas y porcinas no estériles en un proceso heterótrofo, en el que se reporta la eliminación del 81,6 % de COT presente en el medio. Los autores sugieren que las condiciones heterótrofas y no estériles del cultivo influyeron en la eliminación de la materia orgánica y no descartan que dicha eliminación se deba a la interacción bacterias- microalgas [162].

Las Figuras anteriores (4.1.2, 4.1.3 y 4.1.4) demuestran como las microalgas fijaron nutrientes para crecer y mantenerse durante el tiempo de cultivo; como se mencionó en la metodología, y no requirió la reposición de nutrientes en los cultivos. Para todos los casos con uso de agua residual, la eliminación de macronutrientes fue superior al 50 %, lo que sugiere que estas especies de microalgas pueden ser una opción de biorremediación de agua residual de la industria porcina, especialmente para NT y COT. En la revisión bibliográfica no se encontraron publicaciones con agua residual estrictamente de mataderos de cerdos que expresara eliminación de nutrientes en términos de NT, PT y COT para estas microalgas; sin embargo, se encontraron resultados para cultivos de microalgas en aguas residuales porcinas asociadas a la cría de cerdos y tratamiento de purines.

Es importante mencionar que existe evidencia bibliográfica de estudios que alcanzan reducción del 100 % de nutrientes y esto puede lograrse con tiempos de cultivo más extensos; en el presente estudio doctoral los cultivos se mantuvieron por 11-13 días y se cosecharon justo antes de la fase de muerte celular para garantizar la conservación de los productos de valor añadido (en este caso, lípidos) dentro de las células y así garantizar la viabilidad celular. Kumar et al., (2024) desarrollaron un nanocompuesto para mejorar la eficiencia en la recolección de biomasa en pH ácidos a escala industrial; los autores resaltan que esto es necesario para tener células viables con fines de extracción de luteína y lípidos. Mediante la tinción celular con azul de tripán, se verificó la existencia de pocas células muertas/dañadas, lo cual es consistente con el hecho de alcanzar una alta eficiencia en la recuperación de la luteína y lípidos [163].

Bajo este principio de trabajo con células viables con el fin de conservar moléculas de valor añadido en el interior de la célula, los cultivos se cosecharon antes de la fase de muerte celular

en la que la pared celular se ve afectada y el contenido intracelular se pierde. Esta consideración de cosechar los cultivos antes de alcanzar la fase de muerte celular se aplicó para todos los cultivos realizados en el presente trabajo doctoral.

#### **Eliminación de otros parámetros fisicoquímicos y metales pesados en ARFP**

La Tabla 4.1.2 muestra también la eliminación de otros parámetros fisicoquímicos comúnmente analizados en el tratamiento de aguas residuales. La eliminación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de este estudio (77,8 %) resultó ser mayor a lo reportado en la bibliografía para el cultivo de *C. vulgaris* en agua residual porcina durante 10 días de cultivo, con una eliminación de 33,33 % de DQO en el agua porcina esterilizada en condiciones bajo techo (indoor) y notando un incremento en la DQO para cultivos realizados en el agua residual porcina no esterilizada. Esta eliminación puede estar asociada a la existencia de bacterias que usan la DQO para su crecimiento, o bien por la muerte celular de las microalgas [36]. Otros autores reportan una eliminación de DQO de 70,50 % al emplear tratamientos de adsorción-eliminación con acidificación pH de 6 en aguas residuales porcinas [160].

En cuanto a la eliminación de metales y micronutrientes, en los resultados de la Tabla 4.1.2 se aprecia una eliminación apreciable para el calcio, un micronutriente importante para funciones indispensables para *C. vulgaris* en su pared celular [164], así como en la floculación de microalgas durante el proceso de cosechado [165]. Esta eliminación de calcio está asociada al uso de parte de la microalga para el crecimiento celular; asimismo un estudio con la especie *C. vulgaris* reporta que el calcio participa como un modificador de superficie biosorbente que aumenta la capacidad de adsorción de metales como el estroncio [166]. Para el caso del cromo, el presente estudio muestra una alta eliminación de este metal (80 %), un valor menor al reportado por otros autores que cultivaron la especie *Chlorella* sp. en un fotobiorreactor durante 20 días en efluentes de curtiduría con una eliminación del 95,59 % del cromo [167].

El cultivo de *C. vulgaris* en el ARFP del presente estudio fue capaz de eliminar el 96,28 % del hierro presente en el medio, similar a los resultados reportados para el cultivo de la misma microalga en un medio de cultivo con nutrientes especificados según la guía de Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) que contiene una lista de nutrientes con cantidades especificadas ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), elementos traza ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hierro ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ); los autores reportan una eliminación en el rango de 90,22–94,05 % del hierro adicionado [168].

Bajo las condiciones de cultivo del presente estudio, se alcanzó una eliminación del 50 % del molibdeno presente en el agua residual de la industria porcina, equivalente a 0,05 mg/L; otros autores reportan mayor eliminación de este metal presente en aguas residuales; por ejemplo, el trabajo de Tambat et al., (2023) indica que la especie *Chlorella sorokiana* alcanzó la mayor eliminación de 98,43 mg/L de molibdeno de un agua residual industrial bajo unas condiciones óptimas de pH de 3 y temperatura de 35 °C [169]. El porcentaje de eliminación de potasio (53,19 %) en el agua residual de industria porcina de parte de la especie *C. vulgaris* es ligeramente menor al reportado para otras especies del género *Chlorella*, como es el caso de la especie *Chlorella fusca* que fue capaz de reducir hasta 61,9 % de potasio al ser cultivada en agua de mar sin diluir durante 15 días [170]; en cuanto al sodio, se alcanzó un 82,52 % de eliminación, un valor mayor al reportado para la misma especie cultivada en medio G 11 durante 26 días (21,35 % de eliminación de Na); siendo este elemento un factor limitante o de estrés para el crecimiento microalgal, pues incrementos en la concentración de sodio en el medio de cultivo disminuyen la tasa de crecimiento celular de estos microorganismos [171].

También la Tabla 4.1.2 muestra una eliminación de nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) del 92,91 % en el ARFP. Xie et al., (2022) reportan una eliminación de  $\text{N-NH}_4^+$  del 86,67 % para la misma especie cultivada en agua residual porcina durante 10 días [36]. Para la especie *Chlorella vulgaris* cultivada durante 12 días en agua residual de faenamiento avícola con pH alcalino (entre 9-11), Sinmaz et al., (2023) reportan reducciones de  $\text{N-NH}_4^+$  de 92 % y 99 % para pH de 10 y 10,5, respectivamente [172]. Los resultados de esta investigación indican que, para el caso del cobre, no hubo eliminación alguna de este metal; mientras que para níquel y plomo no fue posible cuantificar la eliminación por encontrarse fuera del límite de detección o cuantificación de la técnica analítica empleada, similar a lo reportado por Silva et al., (2022) para esta especie cultivada en agua residual de la industria aceitera en la que no hubo determinación de la eliminación de éstos metales [171]. Sin embargo, Yousefi et al., (2023) reportan que la microalga sí es capaz de eliminar cobre en rangos del 98,25-99,9 % en forma de suspensión y biopelícula al ser cultivada en un medio de cultivo con nutrientes especificados según la guía de Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE); también este estudio indica que *C. vulgaris* resultó ser más vulnerable ante la toxicidad de este metal [168].

La eliminación de DQO de la especie *Scenedesmus* sp. en el ARFP del presente estudio (76,4 %) es baja comparada con la eliminación alcanzada por la misma especie cultivada durante 13 días en aguas residuales urbanas y porcinas no estériles en un proceso heterótrofo, en el que Montaña et al., (2022) reportan reducciones del 83,7 % de DQO. Los autores sugieren que las

condiciones heterótrofas y no estériles del cultivo influyeron en la eliminación de la materia orgánica y no descartan que dicha eliminación se deba a la interacción bacterias-microalgas [162]. Otras especies del género *Scenedesmus* reportan eliminaciones de DQO en el rango de 40-90 %; este fue el caso para la especie *Scenedesmus acutus* cultivada durante 16 días en agua residual municipal filtrada y autoclavada [173].

La eliminación del calcio en el ARFP con la microalga (58,89 %) es superior a lo reportado en la bibliografía para la misma especie cultivada en una mezcla de aguas residuales (residencial, industrial y agua de lluvia) con una eliminación de Ca de 44,75 % [174]. En el presente estudio no se pudo medir la eliminación de cobre de la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en el agua residual de industria porcina pues los resultados demuestran un incremento en la concentración del metal al finalizar el cultivo. Se sospecha que este incremento se deba al Cu presente en el inóculo de la microalga que se encontraba en medio BBM antes de la siembra, también se sospecha de la liberación de iones de Cu derivado de los termopares del fotobiorreactor que estaban contruidos de cobre; sin embargo, Pham (2019) comprobó que esta especie *Scenedesmus* sp. es capaz de eliminar hasta el 89,5 % del metal cuando se cultivó en concentraciones próximas a 2 mg/L en el medio COMBO durante 7 días. El autor indica que a mayores concentraciones de cobre, la eliminación es baja [175]. La especie *Scenedesmus obliquus* reporta eliminaciones de cobre en el rango de 98,75-99,1 % en un medio de cultivo con nutrientes especificados según la guía de Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) [168].

Respecto de otros metales pesados como el cromo, la microalga estudiada presentó una eliminación de cromo menor a las cantidades reportadas por otros autores con la misma especie, con reducción del 92,89 % del cromo hexavalente [Cr(VI)] de forma espontánea mediante biosorción del metal en aguas residuales próximas a minas de cromita [176], pero otras especies del género *Scenedesmus* han presentado mayores valores para la eliminación del Cr (VI); tal es el caso de la especie *Scenedesmus quadricauda* que consiguió reducir aproximadamente un 99,4 % del Cr(VI) de aguas residuales sintéticas en condiciones autótrofas y heterótrofas, demostrando así el potencial de biorremediación de la especie [177]. Para el caso del hierro, la eliminación de la especie de estudio en el agua de industria porcina es alto y se encuentra dentro del rango de valores reportados para la especie *Scenedesmus quadricauda* con valores de eliminación de hierro del 85,68-99,19 % al ser cultivada en un medio de cultivo con nutrientes especificados según la guía de Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) [168]. Un estudio realizado sobre el potencial de fitorremediación de la

especie *Scenedesmus* sp. cultivada en aguas de lodo municipal (combinación de aguas residuales residenciales, efluentes industriales y aguas de lluvias) reporta una eliminación del 68 % del hierro presente [174].

La eliminación del  $\text{N-NH}_4^+$  del presente estudio (89,12 %) es más alta en comparación a lo reportado por otros autores usando la misma especie en un cultivo heterótrofo no estéril de aguas residuales urbanas y porcinas en el que solo se reporta un 31 % de eliminación del  $\text{N-NH}_4^+$  presente en el medio [162]. Para el ARFP la microalga de estudio no registró eliminación de níquel ni plomo; mientras que hubo una ligera eliminación de sodio y molibdeno. Por el contrario, el potasio incrementó su concentración posiblemente asociado al K presente en el inóculo de la microalga que se encontraba en medio BBM; sin embargo, hay evidencias de que esta especie es capaz de eliminar estos metales en aguas residuales, así lo demuestra un estudio en el que la microalga *Scenedesmus* sp. se cultivó en una mezcla de aguas residuales (residenciales, industriales y aguas de lluvias) reportando una eliminación del 58,94 % de Ni, 43,8 % de Pb, 42,74 % de K y 36,55 % de Na presentes en el medio de cultivo [174].

Por otra parte, aunque no se analizó el zinc en la presente investigación, Oliveira et al., (2023) indican que la microalga *Scenedesmus* sp. es capaz de crecer en medios de aguas residuales porcinas con altas concentraciones de zinc (hasta 55 mg Zn/L) sin afectar el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos de la especie, esto gracias al potencial de las microalgas de inmovilizar zinc por acumulación intracelular [178]. Para el caso del molibdeno, no se encontró bibliografía que demuestre la eliminación de este metal por la microalga de estudio.

De forma general, las microalgas usan los micronutrientes y metales pesados reportados en la Tabla 4.1.2 para sus funciones celulares, como parte de procesos fisiológicos y metabólicos mediante biosorción. La pared celular de las microalgas contiene proteínas, polisacáridos y lípidos con cargas electronegativas de algunos grupos funcionales (carboxilatos, fosforilo, hidroxilo, éster, amino, sulfónico, etc. ) que proveen cargas negativas a la superficie celular generando enlaces fuertes con cationes de metales pesados [171].

En los últimos años ha habido un cambio en el tratamiento de las aguas residuales enfocándose en el saneamiento del agua y la eliminación y/o recuperación de nutrientes; esto ha implicado el desarrollo de tecnologías más efectivas y energéticamente más eficientes que incluye a las microalgas o consorcios microalgas-bacterias en los tratamientos biológicos. Las microalgas pueden mejorar la actividad bacteriana liberando ciertos compuestos extracelulares, mientras que el crecimiento bacteriano puede mejorar el metabolismo de las microalgas al

reducir la cantidad de O<sub>2</sub> en el medio y degradar otros compuestos para las microalgas [47,72]. Un sistema integrado puede contribuir a las aplicaciones de economía circular al hacer uso de los nutrientes disponibles en las aguas residuales porcinas (purines, aguas de lavado de jaulas, aguas de faenamiento, etc.) como parte del tratamiento primario, posteriormente el efluente será materia prima para procesos de digestión anaeróbica, y si la legislación nacional lo permite, la biomasa de microalgas podrá usarse para nutrición animal como forma de reducir/eliminar la generación de residuos [152].

La legislación ambiental ecuatoriana vigente en el Acuerdo Ministerial N° 097-A (noviembre, 2015) establece que los desechos generados en las instalaciones destinadas al faenamiento, engorde y crianza de bovinos, porcinos, ovinos y caprinos deben recibir tratamiento adecuado y no pueden ser vertidos a cuerpos hídricos receptores. Sin embargo; únicamente las medianas y grandes instalaciones dedicadas a las actividades de matanza de cerdos cuentan con plantas de tratamientos de aguas residuales para dar cumplimiento a la legislación vigente; por lo que los mataderos de clandestinos y pequeñas empresas familiares no dan cumplimiento a la normativa ambiental.

Además, por los frecuentes cambios de gobierno y recortes presupuestarios, el Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica, cada vez cuenta con menos recursos para mantener la periodicidad de las auditorías a todas las empresas a nivel nacional y esta situación provoca que no se sancionen a las instituciones con actividades que son perjudiciales al medioambiente.

En la Tabla 4.1.3 se muestran los valores de los límites máximos permitidos por la legislación ambiental ecuatoriana para el vertido al sistema de alcantarillado municipal. En cuanto a la calidad del sobrenadante del ARFP posterior al tratamiento aplicado con las microalgas, puede observarse que se da cumplimiento a la normativa ambiental para la mayoría de los parámetros fisicoquímicos que reporta el acuerdo ministerial para descargas al sistema de alcantarillado público para ambas especies, siendo el fósforo total (PT) el único parámetro que no cumple la normativa.

Una alternativa para reducir el contenido de fósforo remanente en los cultivos con las especies de estudios es prolongar el tiempo de cultivo y trabajar con pH alcalino en el rango de 9-11, pudiendo alcanzar eliminación de este parámetro entre 85-96 % sin tener repercusiones sobre la biomasa obtenida [172]. En bibliografía se demuestra que el pH alcalino mejoró la producción de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico



(C18:3) en cultivos de microalgas en aguas residuales, y esto es de especial interés con miras a la valorización energética de la biomasa mediante la producción de FAME [172].

**Tabla 4.1.3** Comparación de límites de descarga de la normativa ambiental ecuatoriana vigente con la concentración final de parámetro fisicoquímicos posteriores al tratamiento de agua residual de industria porcina con las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

<b>Especie de microalga: <i>Chlorella vulgaris</i></b>			
<b>Parámetros Fisicoquímicos</b>	<b>Límite de descarga</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Cumplimiento de normativa ambiental</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	60,0	11,5 ± 1,12	Si
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	15,00	22,85 ± 0,37	No
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	N.R.	96,5 ± 0,01	-
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	500	103 ± 4	Si
Calcio (mg/L)	N.R.	9,1 ± 0,05	-
Cobre (mg/L)	1,00	0,19 ± 0,03	Si
Cromo (mg/L)	0,5	< 0,01 LD	Si
Hierro (mg/L)	25,00	0,07 ± 0,08	Si
Molibdeno (mg/L)	N.R.	< 0,05	-
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	N.R.	5,10 ± 0,64	-
Níquel (mg/L)	2,00	< 0,05	Si
Plomo (mg/L)	0,5	< 0,05 LD	Si
Potasio (mg/L)	N.R.	11,75 ± 1,02	-
Sodio (mg/L)	N.R.	8,79 ± 2,52	-
<b>Especie de microalga: <i>Scenedesmus</i> sp.</b>			
<b>Parámetros Fisicoquímicos</b>	<b>Límite de descarga</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Cumplimiento de normativa ambiental</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	60,0	22 ± 1,41	Si
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	15,00	39,05 ± 1,63	No
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	N.R.	144 ± 1,41	-
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	500	97 ± 5	Si
Calcio (mg/L)	N.R.	8,3 ± 0,08	-
Cobre (mg/L)	1,00	0,11 ± 0,06	Si
Cromo (mg/L)	0,5	< 0,01 LD	Si
Hierro (mg/L)	25,00	0,09 ± 0,01	Si
Molibdeno (mg/L)	N.R.	< 0,05	-
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	N.R.	7,10 ± 0,34	-
Níquel (mg/L)	2,00	< 0,05	Si
Plomo (mg/L)	0,5	< 0,05 LD	Si
Potasio (mg/L)	N.R.	33,7 ± 1,31	-
Sodio (mg/L)	N.R.	44,00 ± 3,56	-

N.R.: no reportado

## b) Agua residual de industria cervecera

Inicialmente el agua residual de la industria cervecera se analizó en el laboratorio en función de la concentración de macronutrientes (NT, PT y COT) y pH. Posteriormente, en un laboratorio externo certificado en el análisis de aguas se analizó el contenido de metales presentes en el medio. Análogamente al agua residual anterior, se empleó el medio comercial BBM como medio de control para la comparación de valores de macronutrientes y así, verificar la viabilidad del agua residual de la industria cervecera como medio de cultivo para las microalgas de estudio. La recolección del agua residual se realizó en una fecha única y los resultados de la caracterización inicial del agua residual y del medio control se muestran en la Tabla 4.1.4 (los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.)

**Tabla 4.1.4** Concentración inicial de macronutrientes principales, metales y otros parámetros fisicoquímicos presentes en el agua residual de industria cervecera y el medio BBM previo al cultivo de las especies de microalgas de estudio.

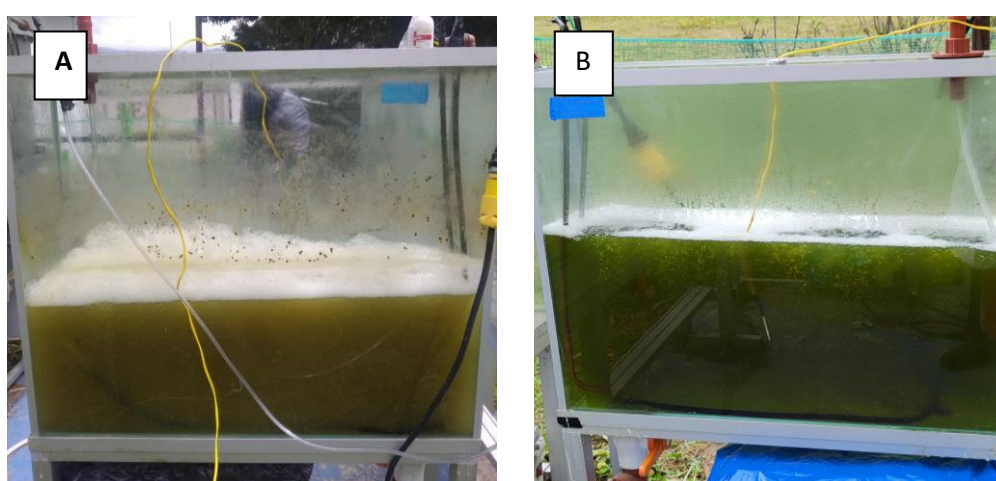
Parámetros Fisicoquímicos	Agua residual	BBM
Nitrógeno Total (mg/L N)	45,5 ± 1,90	34,5 ± 2,83
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	191,7 ± 4,10	127,8 ± 0,42
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	896,5 ± 11,60	4 ± 0,01
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	9929 ± 607	255,05 ± 9,5
Calcio (mg/L)	11,76 ± 0,05	9,43 ± 0,57
Cobre (mg/L)	0,04 ± 0,002	0,014 ± 0,001
Cromo (mg/L)	< 0,01 LD	< 0,02 LD
Hierro (mg/L)	0,020 ± 0,001	0,19 ± 0,01
Molibdeno (mg/L)	< 0,04	< 0,1 LD
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	10,24 ± 0,61	1,23
Níquel (mg/L)	< 0,05	< 0,05 LC
Plomo (mg/L)	< 0,05 LD	< 0,004 LD
Potasio (mg/L)	71,10 ± 4,41	95,70 ± 6,98
Sodio (mg/L)	3,72 ± 0,30	105,95 ± 7,72
Turbidez (NTU)	8,6	0,15
pH	7,19 ± 0,4	7,01 ± 0,2

LD: Límite de Detección, LC: límite de cuantificación

La Tabla anterior muestra que el contenido de los macronutrientes presentes en el agua residual de la industria cervecera es mayor respecto del medio BBM, especialmente el contenido de COT. Respecto de los micronutrientes se constató la presencia de cantidades mayores de calcio, aunque menores cantidades en sodio y potasio respecto del medio comercial. Una vez analizada la existencia de nutrientes en el agua residual, se iniciaron los cultivos en los

fotobiorreactores entre los meses de abril y junio de 2021, expuestos a las condiciones ambientales de la ciudad de Quito en Ecuador.

Estos cultivos presentaron particularmente mucha formación de espuma durante los primeros tres días. En los fotobiorreactores se realizó la siembra del inóculo de microalgas y agua residual de la industria cervecera previamente esterilizada en una proporción 1:10 v/v, manteniendo aireación constante proporcionada por un compresor. Diariamente se realizó control de pH y la toma de muestras para el análisis de parámetros fisicoquímicos, cinética de crecimiento y peso seco. Durante el tiempo de cultivo no se realizó reposición de medio para reducir costes en la etapa de cultivo.



**Figura 4.1.5** Imagen de los fotobiorreactores al cuarto día de la siembra de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) en agua residual de la industria cervecera.

Conforme a la metodología indicada, al finalizar los cultivos se realizó la cosecha y se redujo el exceso de agua mediante centrifugaciones sucesivas hasta obtener una pasta concentrada de microalgas. El sobrenadante se recolectó y almacenó para su posterior análisis de eliminación de macro y micronutrientes y así determinar la capacidad de biorremediación de las microalgas en este medio residual. La Tabla 4.1.5 muestra los porcentajes de eliminación de los parámetros fisicoquímicos analizados para el agua residual de la industria cervecera al inicio del cultivo y en el sobrenadante final, desde el día 0 hasta el día 14 para ambas especies. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

Los valores de la tabla anterior para los macronutrientes NT, PT y COT muestran porcentajes de eliminación de nutrientes muy bajos a lo largo de los 14 días de cultivo para la especie *Chlorella vulgaris* (7-23 % en peso) respecto de *Scenedesmus* sp. (39-72 % en peso). En el caso de la bajísima eliminación de COT para *Chlorella vulgaris*, que es menor al 8 %, esta podría estar

causada por el exceso de COT que se encontraba originalmente en este tipo de agua residual y que pudo haber afectado a esta especie.

**Tabla 4.1.5** Eliminación de nutrientes en agua residual de industria cervecera por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

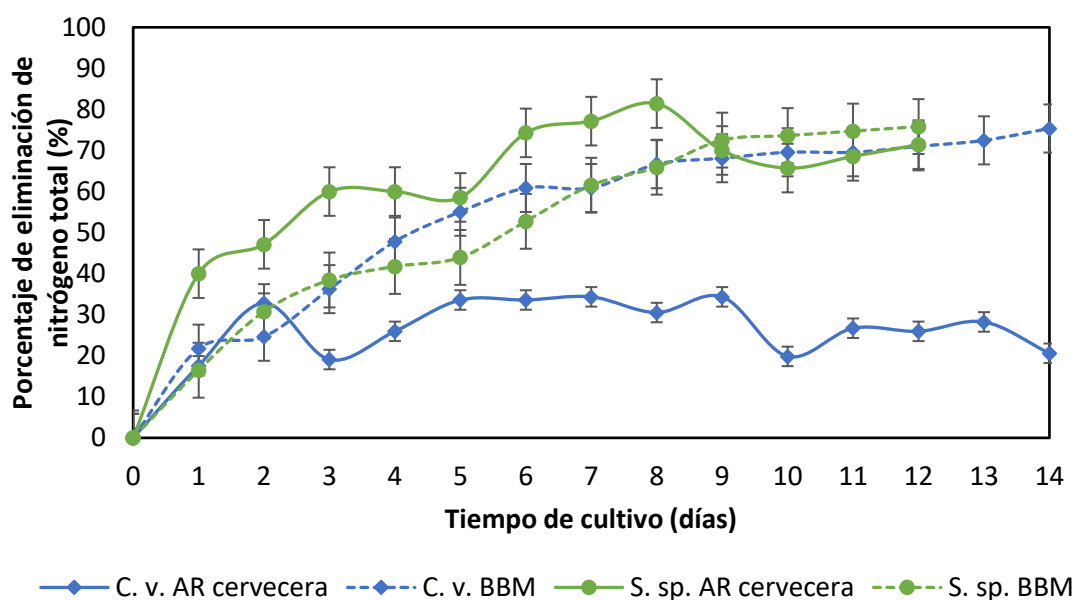
<b>Especie de microalga: <i>Chlorella vulgaris</i></b>			
<b>Parámetros Físicoquímicos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Eliminación Total (%)</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	65,5 ± 4,95	52 ± 5,67	20,61
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	260,7 ± 4,10	201,2 ± 0,57	22,82
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	896,5 ± 0,71	825 ± 0,01	7,98
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	9929 ± 607	2103 ± 4	78,82
Calcio (mg/L)	11,76 ± 0,05	7,5 ± 0,05	36,22
Cobre (mg/L)	0,04 ± 0,002	0,07 ± 0,03	-
Cromo (mg/L)	< 0,01 LD	< 0,01 LD	*
Hierro (mg/L)	0,020 ± 0,001	0,21 ± 0,08	-
Molibdeno (mg/L)	< 0,04	< 0,04	*
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	10,24 ± 0,61	3,10 ± 0,66	69,73
Níquel (mg/L)	< 0,05	< 0,05	*
Plomo (mg/L)	< 0,05 LD	< 0,05 LD	*
Potasio (mg/L)	71,10 ± 4,41	75,05 ± 1,04	-
Sodio (mg/L)	3,72 ± 0,30	38,79 ± 2,52	-
<b>Especie de microalga: <i>Scenedesmus</i> sp.</b>			
<b>Parámetros Físicoquímicos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Eliminación Total (%)</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	35 ± 1,41	10 ± 1,41	71,43
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	154,2 ± 4,10	51,2 ± 4,24	66,8
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	864,5 ± 0,71	524,5 ± 9,19	39,33
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	9929 ± 607	1922 ± 25	80,64
Calcio (mg/L)	11,76 ± 0,05	13,44 ± 0,06	-
Cobre (mg/L)	0,04 ± 0,002	0,06 ± 0,003	-
Cromo (mg/L)	< 0,01 LD	< 0,01 LD	*
Hierro (mg/L)	0,020 ± 0,001	0,31 ± 0,03	-
Molibdeno (mg/L)	< 0,04	< 0,04	*
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	10,24 ± 0,61	6,92 ± 0,41	32,42
Níquel (mg/L)	< 0,05	< 0,05	*
Plomo (mg/L)	< 0,05 LD	< 0,05 LD	*
Potasio (mg/L)	71,10 ± 4,41	73,95 ± 4,58	-
Sodio (mg/L)	3,72 ± 0,30	35,59 ± 4,58	-

LD: Límite de Detección. \*Valores fuera de rango. -Sin eliminación

En cuanto a la remoción de otros parámetros físicoquímicos, en la Tabla 4.1.5 también se observa una eliminación de DQO y nitrógeno amoniacal del medio de cultivo. Para cobre, hierro,

potasio y sodio se observó un incremento de concentración; probablemente asociado a las trazas de dichos metales en el medio BBM en el que se mantuvo el inóculo. Para cromo, molibdeno, níquel y plomo no fue posible calcular el porcentaje de eliminación ya que las concentraciones se encontraban fuera del rango de sensibilidad de la técnica empleada (menores a 0,01; 0,04; 0,05 y 0,05 mg/L, respectivamente).

La Figura 4.1.6 muestra el porcentaje de eliminación de nitrógeno total (NT) de ambas especies cultivadas en el agua residual de la industria cervecera y del medio BBM como control desde el día 0 hasta finalizar el cultivo. De forma general, comparando la reducción de NT en ambas especies del presente estudio, puede observarse que en el agua residual de la industria cervecera la especie *Scenedesmus* sp. presentó mayor reducción de dicho nutriente respecto de la especie *Chlorella vulgaris*.



**Figura 4.1.6** Porcentaje de eliminación de nitrógeno total (NT) vs. tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de industria cervecera y medio de control BBM.

Para la especie *Chlorella vulgaris* la reducción de NT fue de 20,61 % en el día 14, correspondiente a una concentración de  $52 \pm 5,67$  mg/L N; mientras que el medio BBM alcanzó una eliminación de NT de 75,36 %, correspondiente a una concentración final de  $8,5 \pm 0,71$  mg/L N y evidenciando una mayor eliminación de NT en comparación con el agua residual. La bibliografía consultada sobre tratamientos de agua residual de la industria cervecera empleando microalgas presenta grandes diferencias en la caracterización fisicoquímica de este tipo de agua residual, reportando rangos muy diversos en función del momento del muestreo del agua

residual, ya que en algunos estudios el muestreo se realizó con aguas afluentes o efluentes de tratamientos primarios, secundarios e incluso de etapas de digestión anaerobia; así es como el rango de NT puede encontrarse entre 7-48 mg/L [53,59,179].

La reducción de NT para la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en el agua residual de la industria cervecera en la presente investigación es menor a los reportados en la bibliografía; por ejemplo, Choi (2026) empleó la misma especie de microalga en aguas residuales de la industria cervecera reportando una reducción del 83,74 % de NT en cultivos sin luz, 82,05% de NT en cultivos con luz, y 90,11 % de NT en cultivos con aireación en agua residual de cerveza con control de pH en 7,3 durante 16 días [53]. Otras especies del género *Chlorella* también se han cultivado en aguas residuales de la industria cervecera con una alta eliminación de varios nutrientes, incluyendo NT con un 100 % de eliminación y alcanzando un crecimiento sustancial en la microalga *Chlorella* sp. [59]. Farooq et al., (2013) compararon el crecimiento de dos especies del género *Chlorella* en agua residual de industria cervecera (*Chlorella* sp. y *Chlorella vulgaris*) en un sistema de dos etapas fotoautotrófico y fotoheterotrófico/mixotrófico con el fin de maximizar la productividad de lípidos. El estudio reporta una eliminación mayor a 80 % de NT durante la primera etapa de cultivo para las dos especies cultivadas [179].

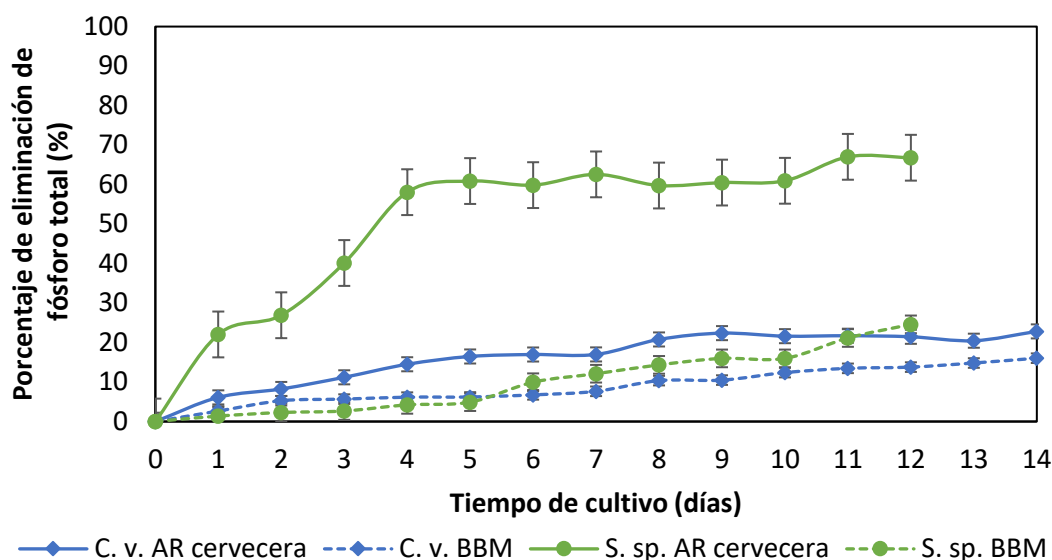
El porcentaje de eliminación de NT del presente estudio es próximo al reportado por los autores citados, considerando que cada agua residual de la industria cervecera fue tratada de forma diferente y presentaba diferencias en los valores de sus parámetros fisicoquímicos previo al cultivo de la microalga; además, las condiciones en cada cultivo puede incidir en los valores de eliminación alcanzados [179].

El uso de aguas residuales de la industria cervecera se ha extendido entre los investigadores como un medio de cultivo con suficiente carga de nutrientes para microalgas y como medio que ayuda a evitar/reducir el uso de agua potable [105]. Algunas microalgas del género *Scenedesmus* han demostrado crecer muy bien en este tipo de agua residual con el aprovechamiento de nutrientes y simultánea biorremediación del agua hasta valores por debajo de los límites permitidos por la ley [60]. Para la especie *Scenedesmus* sp., la Figura 4.1.6 muestra que la reducción de NT fue de 71,43 % correspondiente a una concentración de  $10 \pm 1,41$  mg/L en el agua residual de la industria cervecera y de 75,82 % en el medio de control BBM, equivalente a una concentración de  $11 \pm 0,71$  mg /L al cabo de 12 días de cultivo. Los resultados demuestran que la especie *Scenedesmus* sp. presentó una mejor eliminación de nutrientes en el medio de control respecto del agua residual de la industria cervecera.

En cuanto a la eliminación de NT en agua residual de la industria cervecera para la especie *Scenedesmus* sp. algunos autores reportan reducciones de 95,95 % y 87,6 %, respectivamente [180] [181]; valores superiores a la eliminación encontrada en el presente estudio; estas mejoras pueden estar relacionadas a controles de pH más estrictos y tiempos de cultivos más extensos. Otros autores reportan eliminación de NT próximos al encontrado en el presente estudio; tal es el caso de la investigación de Zhou et al., (2012) que reporta que la reducción NT con la especie *Scenedesmus* sp. en agua residual de cerveza fue de 72,81 % al cabo de 18 días de cultivo con entrada de CO<sub>2</sub>, mencionando que se puede aumentar la eliminación de este nutriente al inyectar concentraciones del 1-5 % v/v de CO<sub>2</sub> [182].

Respecto de la eliminación de PT, la Tabla 4.1.5 muestra que al cabo de 14 días de cultivo la reducción alcanzada por la especie *Chlorella vulgaris* fue del 22,82 % del PT presente en el medio correspondiente a una concentración de 201,2 ± 0,57 mg/L PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> de fósforo; por su parte el medio BBM tuvo una reducción de 16,04 % de PT, correspondiente a una concentración de 93,2 ± 1,56 mg/L PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. Autores que han usado agua residual de la industria cervecera para el cultivo de microalgas suelen presentar las características fisicoquímicas del agua residual reportando para PT valores en el rango de 4-33 mg/L según si procede de tratamientos primarios, secundarios, etapas de digestión anaerobia, etc. [53,59,179]. El agua residual de la industria cervecera empleada en la presente investigación tuvo valores de PT fuera del rango reportado en la bibliografía (Tabla 4.1.4).

La Figura 4.1.7 representa el porcentaje de eliminación de fósforo total (PT) frente al tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de la industria cervecera, comparándolo con el medio de control BBM. Como se puede observar en dicha figura, en el cultivo de la especie *Chlorella vulgaris* se obtuvo una mayor reducción de PT en el agua residual de la industria cervecera en comparación con el control en medio BBM; algunos autores reportan que la eliminación de PT está relacionada con la presencia de algunos iones ya que el fósforo puede unirse con facilidad a algunos iones de carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) y hierro (Fe<sup>3+</sup>) resultando en su precipitación y evitando la disponibilidad del nutriente para ser absorbido por las microalgas [183]. También, un pH alcalino en el medio ayuda a esta precipitación [182]. En estudios que analizan la eliminación de nutrientes de agua residual de cerveza tratados con *Chlorella vulgaris* se reportaron reducciones de PT de 54,69 %, 54,32 %, 62,34 % y 66,18 % en cultivos sin luz, con luz, con aireación y con aireación y luz, respectivamente durante 15 días [53]. Estos valores son mayores a los del presente estudio que empleó condiciones de aireación y luz en fotoperiodos de 12 h.



**Figura 4.1.7** Porcentaje de eliminación de fósforo total (PT) vs. tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en agua residual de industria cervecera y medio de control BBM.

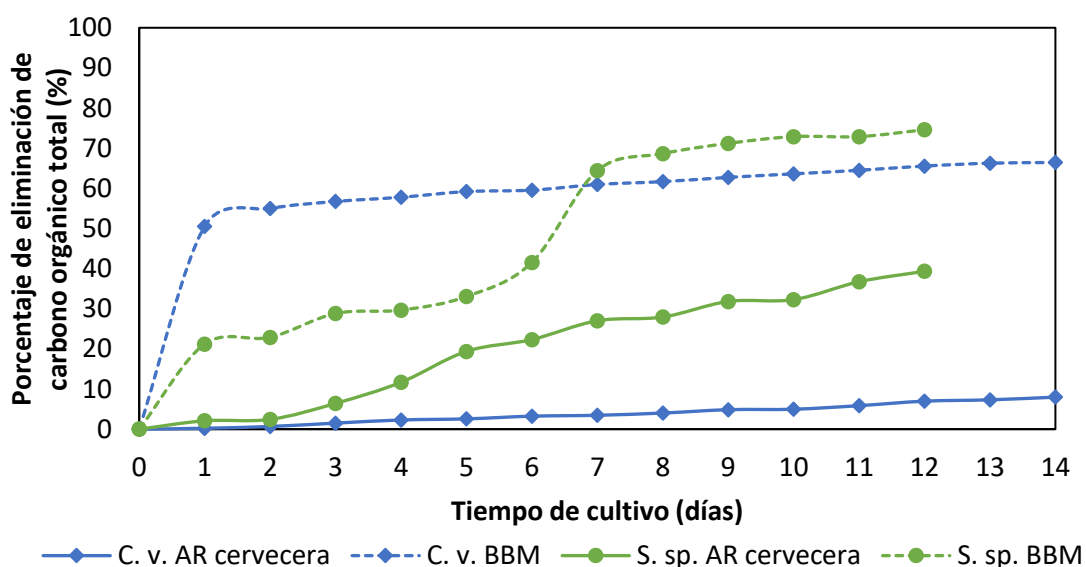
La Figura 4.1.7 muestra también que la especie *Scenedesmus* sp. presentó mayor eliminación de PT en comparación con *Chlorella vulgaris* tanto en el agua residual como en el medio de control. Al cabo de 12 días de cultivo, *Scenedesmus* sp. tuvo una reducción de 66,8 % de PT correspondiente a una concentración de  $51,2 \pm 4,24$  mg/L; mientras que el control en medio BBM presentó un 24,60 % de eliminación, correspondiente a una concentración de  $87,5 \pm 4,95$  mg/L. Los compuestos de fósforo que se encuentran en el agua son normalmente aprovechados por las plantas acuáticas, pero en concentraciones excesivas causan sobreabundancia de algas que incrementan riesgos de eutrofización en los cuerpos de agua [58]. El PT es un parámetro de fácil reducción en el agua residual de la industria cervecera, es así como algunos autores reportan que la microalga *Scenedesmus* sp. es capaz de eliminar hasta el 95 % del PT presente en aguas residuales de este tipo de industria, y además producir otros productos de valor añadido como pigmentos, carbohidratos y biomasa [184].

Han et al., (2021) elaboraron un agua sintética con características fisicoquímicas similares a la industria cervecera al emplear concentraciones medias de parámetros como DQO (2100 mg/L), NT (45 mg/L), N- NH<sub>3</sub> (23 mg/L), PT (7 mg/L) y pH de 6,8. En este tipo de agua sintética de la industria cervecera se han reportado reducciones de PT mayores a 90 % tan solo en el segundo día en cultivos en consorcios de *Scenedesmus* sp. 336, *Chlorella sorokiniana* UTEX1602 y *Chlorella* sp. L166, alcanzado una eliminación final de PT de 96,73-98,69 % [87].



Otras especies del género *Scenedesmus* también han demostrado su alto potencial de biorremediación tanto en cultivo de manera individual como en consorcio con bacterias; reportando reducciones de PT de 77,8 % y 75,6 % para la microalga *Scenedesmus obliquus* en monocultivo y en consorcio alga-bacteria, respectivamente al cabo de 4 días de cultivo [54]. También para *S. obliquus* cultivada en agua residual procedente del tratamiento secundario de una industria cervecera se reportan eliminaciones de PT en el rango de 6,1-40,8 % al usar tiempos de retención hidráulica de 2,1-10,4 días [106]. Del mismo modo, la especie *Scenedesmus dimorphus* fue capaz de eliminar el 99 % de PT presente en un agua residual de industria cervecera, correspondiente a concentraciones de 1,4-5,5 mg/L y 0,2 mg/L, al inicio y al final del cultivo de 12 días, respectivamente [105].

Otro macronutriente analizado fue el carbono orgánico total (COT) para ambas especies de microalgas en el agua residual de industria cervecera. La Figura 4.1.8 muestra la reducción de COT para las dos especies cultivadas en agua residual de la industria cervecera. En el cultivo de la especie *Chlorella vulgaris*, la eliminación de COT después de 14 días fue de tan solo 7,98 %, equivalentes a una concentración de carbono final de  $825 \pm 0.01$  mg/L C que es un valor alto para este nutriente en el medio; para el medio BBM se observó una eliminación de 66,43 % del COT, correspondiente a una concentración de  $95 \pm 1,41$  mg/L C.



**Figura 4.1.8** Porcentaje de eliminación de carbono orgánico total (COT) vs. tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en agua residual de la industria cervecera y medio de control BBM.

El carbono es un nutriente muy importante en el crecimiento de las microalgas y constituye más del 50 % de la biomasa microalgal [59], y en este tipo de agua residual se reportan

concentraciones de COT entre 180-1500 mg/L [53,59,179]. Las microalgas pueden crecer en condiciones diversas aprovechando diversas formas de carbono orgánico e inorgánico; sin embargo, pese a que en el presente estudio no se alcanzó una reducción importante de este nutriente en el agua residual, otros autores reportan que la especie *Chlorella vulgaris* (UTEX 265) es capaz de reducir más del 90 % del COT presente en aguas residuales de industria cervecera en 14 días [179].

Otras especies del género *Chlorella* también presentan altas reducciones de COT; por ejemplo, la especie *Chlorella* sp. MM3 es capaz de eliminar el 100 % del COT presente en un agua residual de agua cervecera al cabo de cuatro días de cultivo [59]. La baja reducción de COT en el presente estudio se comprobó con los análisis del laboratorio externo para descartar errores en el laboratorio de la universidad, pero el resultado fue similar; se sospecha que a nivel bioquímico existió alguna inhibición por parte de la microalga para la eliminación de este nutriente en el agua residual, ya que en el medio de control sí hubo una reducción importante de COT.

La eliminación de COT para el agua residual de la industria cervecera de la microalga *Scenedesmus* sp. fue del 39,33 % de este parámetro ( $524,5 \pm 9,19$  mg/L) al cabo de 12 días de cultivo; para el control en medio BBM se observó una eliminación de 74,58 %, correspondiente a una concentración de  $15 \pm 1,41$  mg/L. Estos resultados demuestran que la especie *Scenedesmus* sp. presentó una mejor eliminación de nutrientes en el medio control respecto del agua residual de la industria cervecera, y a su vez mejor reducción del COT respecto de la especie *Chlorella vulgaris*.

Además de la alta reducción de NT y PT que presentan generalmente las microalgas para la síntesis de biomasa, algunas algas son capaces de aprovechar fuentes de carbono como azúcares, almidón, alcoholes, etc., tanto en procesos mixotróficos como heterotróficos que conducen a la eliminación de nutrientes orgánicos del medio de cultivo que se emplea [105]. Algunos autores reportan que la especie *Scenedesmus* sp. 336 cultivada en agua residual simulada de la industria cervecera (DQO: 2100 mg/L, NT: 45 mg/L, N- NH<sub>3</sub> : 23 mg/L, PT: 7 mg/L y pH de 6,8) redujo 48,76 % del COT disponible en el medio después de 10 días de cultivo; mientras que al utilizar un consorcio de microalgas de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella sorokiniana* UTEX1602 en proporción 1:1, la eliminación de COT fue de solo 41,38 % [87]. Otras microalgas del género *Scenedesmus* también han sido cultivadas en agua residual de la industria cervecera, y por ejemplo para la especie *Scenedesmus dimorphus*, se reporta una eliminación del 65 % del

COT presente en un medio de cultivo compuesto por mezclas de agua residual de industria cervecera y medio BG-11 [105].

Es importante considerar que la tasa de eliminación de COT estará asociada a la disponibilidad de las fuentes de carbono orgánico, las cuales a su vez son determinantes en el rendimiento de la biomasa y de lípidos [179]; razón por la cual para mejorar dichos rendimientos algunos autores recomiendan el enriquecimiento del agua residual con medio de cultivos comerciales como BG-11 [105], o bien el suministro de CO<sub>2</sub> para asegurar que no exista la condición de limitación de carbono durante los cultivos, siempre manteniendo un control estricto sobre el pH, ya que el suministro de CO<sub>2</sub> puede causar bajos niveles de pH en el medio que a su vez pueden acarrear limitación en la capacidad fotosintética de algunas especies [106].

#### **Eliminación de otros parámetros fisicoquímicos y metales pesados en AR de industria cervecera**

La Tabla 4.1.5 presenta también la eliminación de algunos parámetros fisicoquímicos analizados en el agua residual de la industria cervecera antes y después de la inoculación con *C. vulgaris* (sobrenadante sin microalga). En estudios realizados en agua residual de industria cervecera se reportan rangos de DQO muy amplio del agua entre 100-6000 mg/L, según donde se haya realizado el muestreo del agua, el cual puede tratarse de un influente o efluente de etapas de proceso o tratamiento del agua [24,50,54,55,60]. En estudios que emplearon *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales de industria cervecera se reportan reducciones de DQO 71,44 % (con luz) y 82,04 % (sin luz) tras 15 días en cultivos con aireación, que corresponden a concentraciones de 224,5 mg/L y 357 mg/L, para los tratamientos con luz y sin luz, respectivamente [53].

La variabilidad en las características del agua, están asociadas especialmente al aprovechamiento del tipo de azúcares y DQO por parte de la levadura usada en cada planta de procesamiento, y esto podrá ser limitante en la reducción de la carga orgánica incluso después del tratamiento de este tipo de aguas [50]. El agua de la industria cervecera empleada en el presente estudio tenía un valor de DQO mayor al rango reportado por otros autores (> 9900 mg/L) y al finalizar el cultivo se logró la eliminación del 78,82 % de DQO presente en el agua residual original, y aunque porcentualmente se encuentra dentro del rango de valores reportados por otros autores, la concentración final de este parámetro se mantiene por encima de los 2000 mg/L. Un estudio de *C. vulgaris* cultivada en agua residual de industria cervecera con un alto valor de DQO (18300 mg/mL) y pH de 6,5 indica que estas condiciones fueron suficientes para lograr el cultivo de la especie con una productividad de 0,280-0,47 g/L·d; los

autores resaltan la contribución de este trabajo indicando que fue la primera vez en la que no se observó inhibición de crecimiento en concentraciones tan altas de DQO [185].

En esta investigación también se determinó la eliminación de algunos metales (Tabla 4.1.5). Para el caso del calcio se observó una reducción de 36,22 %, y aunque no se encontró bibliografía que reporte eliminación de calcio en cultivos de *C. vulgaris* en agua residual de la industria cervecera, se sabe que el calcio es importante en cuanto a funciones de la pared celular y floculación de las microalgas [164,165].

En cuanto al cobre, hierro, potasio y sodio no hubo eliminación sino incrementos en las concentraciones de estos nutrientes; se cree que este aumento pudo deberse a las concentraciones de estos metales en el inóculo de las microalgas en medio BBM. No se encontró bibliografía que reporte eliminación de cobre en aguas residuales de la industria cervecera, pero otros estudios indican que aunque este metal es importante para el transporte de electrones en el medio [164], aunque concentraciones mayores a 2 mg/L pueden afectar negativamente a la pared celular microalgal [186]. Tampoco se encontró bibliografía que sustente la eliminación de hierro en aguas residuales de industria cervecera; sin embargo, se conoce su importancia como cofactor necesario para varios procesos enzimáticos relacionados con el crecimiento de la microalga [187]. También, la concentración de hierro en el agua residual empleada en el presente estudio, es menor a valores reportados para este metal en aguas residuales de la industria cervecera (0,54 mg/L) [179].

Para el caso del potasio, un estudio que empleó agua residual de la industria cervecera para el cultivo de la especie *Chlorella* sp. en sistemas de dos etapas (fotoautotrófico-fotoheterotrófico/mixotrófico) reporta concentraciones iniciales de potasio de 22,38 mg/L en el medio de cultivo [179]. Otro estudio reporta concentraciones de 14-21 mg/L de potasio en el agua residual de la industria cervecera [59]. Ambos valores son más bajos respecto de la concentración de potasio hallada en el presente trabajo. También, este incremento en K puede estar asociado al uso del bicarbonato presente en el medio como fuente de carbono, provocando un incremento en la concentración del metal y la alcalinización del medio [188]. También, algunos autores mencionan que se han observado incrementos en las concentraciones de sodio asociadas al uso de medios de desinfección de bajo coste, tal es el caso de soluciones de hipoclorito de sodio o detergentes en las etapas de lavados de recipientes durante la elaboración de cerveza, especialmente a gran escala [50].

Considerando que pueden producirse entre 3-10 L de agua residual por cada 1 L de cerveza, algunos autores han implementado principios de economía circular al emplear este tipo de agua

como sustrato para la producción de lípidos de microalgas y bioproductos a partir de levaduras oleaginosas. Un estudio reporta un 73 % de eliminación de nitrógeno amoniacal al emplear aguas residuales procedentes del tratamiento primario y secundario de la industria cervecera sin ningún tipo de suplementos para la especie *Chlorella vulgaris* [50]. Este valor de eliminación es próximo al encontrado en la presente investigación en la que no se usó reposición de medio ni suplementos durante el tiempo de cultivo.

En cuanto a las concentraciones de cromo, níquel, plomo y molibdeno, no fue posible determinar eliminaciones o incrementos en el medio dado que sus concentraciones se mantuvieron fuera del rango de detección de la técnica analítica empleada, lo que indica concentraciones mínimas de estos metales en el agua residual de industria cervecera analizada. Sin embargo, diversos estudios soportan la importancia de la presencia de trazas de estos elementos para el crecimiento microalgal [189,190].

Para la especie *Scenedesmus* sp. se observó una baja eliminación de nitrógeno amoniacal y en cuanto a los metales analizados, no hubo eliminación de ninguno sino valores que se encontraban fuera del rango de medición de la técnica de análisis empleada o ligeros incrementos en sus concentraciones que pudieran estar asociados a la presencia de estos metales en el medio BBM, donde se mantenían los cultivos de microalgas antes de ser inoculados en el agua residual. Para esta especie, la DQO presentó una eliminación de 80,64 %, el cual se encuentra dentro del rango de eliminación reportado por otros autores usando medios de cultivos compuestos por aguas residuales no esterilizadas [162]. Otras especies del género *Scenedesmus* cultivadas también en agua residual de la industria cervecera presentan eliminación de DQO más bajas; por ejemplo, para la especie *Scenedesmus obliquus* se reportan en la literatura reducciones de DQO de 62 % y 74 %, con y sin adición de 10 % de CO<sub>2</sub> v/v al medio de cultivo, respectivamente [106]. Incluso, otros autores han demostrado que la introducción de CO<sub>2</sub> al medio de cultivo, si bien provee carbono inorgánico para el crecimiento de la microalga, puede generar un mecanismo de competitividad con el carbono orgánico existente en el agua de la industria cervecera y provocar así una disminución en la tasa de eliminación de DQO [184].

Esta microalga presentó una eliminación de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) un tanto más baja que lo reportado para la misma especie en aguas de la industria cervecera (32,42 %), pudiendo eliminar casi el 60 % del N-NH<sub>3</sub> presente en el medio [58]; en otro estudio, la misma especie fue capaz de eliminar el 94 % del N-NH<sub>3</sub> presente en el medio con un suministro del 15 % de CO<sub>2</sub> al cultivo [87]; sin embargo, es importante recalcar que tal y como se mencionó anteriormente,

existen diferencias en las concentraciones iniciales de nutrientes en las aguas residuales de la industria cervecera y esto puede impactar en el porcentaje de eliminación final de cada nutriente. Otras especies del género *Scenedesmus* cultivadas también en agua residual de la industria cervecera lograron reducciones mayores de N-NH<sub>3</sub>, tal es el caso de la especie *Scenedesmus obliquus* que redujo 91 % y 87 % de N-NH<sub>3</sub> con y sin adición del 10 % de CO<sub>2</sub> al medio de cultivo, respectivamente [106].

En el caso de los metales analizados para la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en agua de la industria cervecera no se encontró eliminación de metales sino aumento en las concentraciones de calcio, cobre, hierro, potasio y sodio en el líquido sobrenadante tras la cosecha del cultivo; también otros metales se encontraron fuera del límite de medición de la técnica analizada (cromo, molibdeno, níquel y plomo). Sin embargo, algunos trabajos confirman que la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en agua de la industria cervecera es capaz de eliminar 85,44 % de cromo, 95,71 % de níquel, 79,53 % de plomo, 64,08 % de cadmio, 72,17 % de zinc y 88,89 % de arsénico; lo cual comprueba su efectividad para la absorción de metales pesados [58]. Aunque en el presente estudio no se apreció eliminación para el molibdeno, hay evidencia de dicha eliminación por parte de la especie *Scenedesmus chlorelloides* en sistemas acuosos [82].

Cobre, hierro, manganeso, zinc y níquel son algunos de los metales requeridos en los medios de cultivos ya que son precursores de procesos biológicos como la formación de vitaminas, proteínas de la membrana celular y cofactores de procesos metaloenzimáticos [58]; por ello, es común suministrarlo en medios de cultivos convencionales como el medio BBM. El incremento observado en las concentraciones de calcio, sodio, potasio, cobre y hierro puede estar relacionado a las cantidades suministradas de estos metales en el medio control BBM que permitió mantener a la especie hasta que se alcanzara la concentración celular requerida para su siembra en los fotobiorreactores, por lo que se cree que estos metales fueron bioacumulados por la microalga antes de ser sembrada en el agua residual de la industria cervecera.

En la Tabla 4.1.6 se muestran los valores de los límites máximos permitidos por la legislación ambiental ecuatoriana según el Acuerdo Ministerial N° 097-A para el vertido al sistema de alcantarillado municipal. En cuanto a la calidad del sobrenadante del AR de industria cervecera después del tratamiento aplicado con las microalgas puede observarse que se da cumplimiento a la normativa ambiental para la mayoría de los parámetros fisicoquímicos que reporta el acuerdo ministerial para descargas al sistema de alcantarillado público para ambas especies, con excepciones para PT y DQO.

**Tabla 4.1.6** Comparación de límites de descarga de la normativa ambiental ecuatoriana vigente con la concentración final de parámetro fisicoquímicos tras el tratamiento de agua residual de la industria cervecera con las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

<b>Especie de microalga: <i>Chlorella vulgaris</i></b>			
<b>Parámetros Fisicoquímicos</b>	<b>Límite de descarga</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Cumplimiento de normativa ambiental</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	60,00	52 ± 5,67	Si
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	15,00	201,2 ± 0,57	No
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	N.R.	825 ± 0,01	-
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	500	2103 ± 4	No
Calcio (mg/L)	N.R.	7,5 ± 0,05	-
Cobre (mg/L)	1,00	0,07 ± 0,03	Si
Cromo (mg/L)	0,5	< 0,01 LD	Si
Hierro (mg/L)	25,00	0,21 ± 0,08	Si
Molibdeno (mg/L)	N.R.	< 0,04	-
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	N.R.	3,10 ± 0,66	-
Níquel (mg/L)	2,00	< 0,05	Si
Plomo (mg/L)	0,5	< 0,05 LD	Si
Potasio (mg/L)	N.R.	75,05 ± 1,04	-
Sodio (mg/L)	N.R.	38,79 ± 2,52	-
<b>Especie de microalga: <i>Scenedesmus</i> sp.</b>			
<b>Parámetros Fisicoquímicos</b>	<b>Límite de descarga</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Cumplimiento de normativa ambiental</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	60,0	10 ± 1,41	Si
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	15,00	51,2 ± 4,24	No
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	N.R.	524,5 ± 9,19	-
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	500	1922 ± 25	No
Calcio (mg/L)	N.R.	13,44 ± 0,06	-
Cobre (mg/L)	1,00	0,06 ± 0,003	Si
Cromo (mg/L)	0,5	< 0,01 LD	Si
Hierro (mg/L)	25,00	0,31 ± 0,03	Si
Molibdeno (mg/L)	N.R.	< 0,04	-
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	N.R.	6,92 ± 0,41	-
Níquel (mg/L)	2,00	< 0,05	Si
Plomo (mg/L)	0,5	< 0,05 LD	Si
Potasio (mg/L)	N.R.	73,95 ± 4,58	-
Sodio (mg/L)	N.R.	35,59 ± 4,58	-

N.R.: no reportado

Como se mencionó en el ARFP, una alternativa para reducir el contenido de PT es alargar el tiempo de cultivo y trabajar con pH básico (9-11) para alcanzar mayor eliminación de PT (> 80

%) sin afectar la producción de biomasa y la posterior valorización de sus ácidos grasos [172]. Para el caso de DQO, unas alternativas de bajo coste para reducir las concentraciones remanentes en el agua residual sería extender el tiempo de cultivo por un par de días más y/o realizar una dilución hasta cumplir con la concentración permisible por la normativa ambiental ecuatoriana.

Estos resultados respaldan el uso de microalgas para el tratamiento de agua residual de la industria cervecera pues la tecnología es confiable, respetuosa con el medioambiente, de bajo coste y efectiva; sin embargo, pese a sus muchos beneficios, esta técnica de tratamiento requiere la integración de otros tratamientos convencionales para mejorar sus rendimiento según las normativas ambientales de cada localidad, incluyendo opciones para la eliminación de color y olor del agua residual de la industria cervecera para su reutilización [24]. Asimismo, se requieren de estudios basados en ingeniería genética y transcriptómica para comprender mejor el metabolismo de carbono, caracterizando las vías metabólicas de diversas especies del género *Scenedesmus* y *Chlorella* y así maximizar su productividad y habilidad en la eliminación de nutrientes y otros contaminantes [76].

### **c) Agua residual de piscicultura**

Tal y como se indicó en la sección de metodología, el agua residual de piscicultura también se analizó en términos de la concentración de macronutrientes, micronutrientes y metales. Se utilizó el medio Bold's Basal Medium (BBM) como medio de control para la comparación de valores de macronutrientes de un medio sintético ampliamente empleado en el cultivo de microalgas y así, verificar la viabilidad del agua residual de piscicultura como medio de cultivo para las microalgas de estudio. Para la recolección del agua residual de piscicultura se realizaron dos muestreos en diferentes fechas, razón por la cual las características de las aguas residuales presentaron algunas diferencias en las concentraciones de sus macronutrientes pese a haber sido recolectadas en el mismo sitio. En la Tabla 4.1.7 se muestran los resultados de la caracterización inicial del agua residual de piscicultura y del medio BBM. Dichos resultados se expresan como el promedio de experimentos realizados por triplicado y su desviación estándar.

A excepción del fósforo total, cuyo contenido en el agua residual es menor que en el medio BBM, el resto de los macronutrientes presentó un contenido más alto respecto del medio de control; al verificar la existencia de nutrientes en el agua residual, se procedió a iniciar los cultivos en los fotobiorreactores. Dichos cultivos se realizaron entre los meses de octubre de 2022 y enero de 2023, expuestos a las condiciones ambientales de la ciudad de Quito en Ecuador. En los fotobiorreactores se añadió inóculo de microalgas y agua residual de piscicultura



previamente esterilizada en una proporción 1:10 manteniendo las mismas condiciones de cultivo respecto de las aguas residuales anteriores.

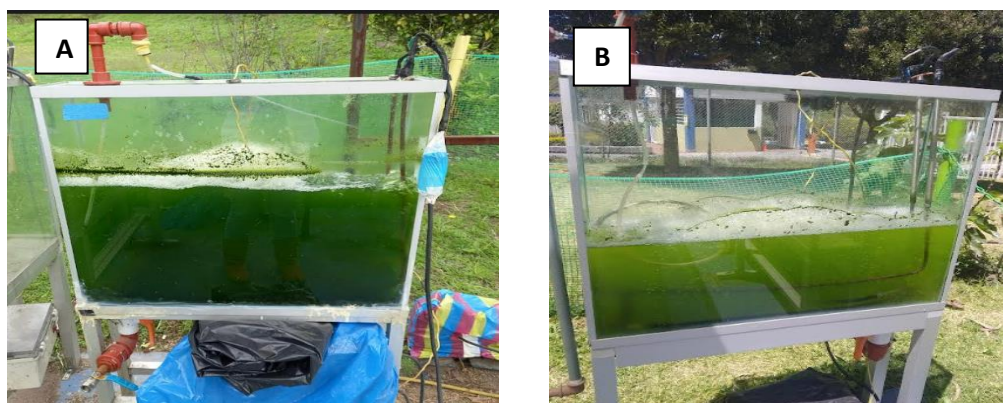
**Tabla 4.1.7** Concentración inicial de macronutrientes principales, metales y otros parámetros fisicoquímicos presentes en el agua residual de piscicultura y el medio BBM previo al cultivo de las especies de microalgas de estudio.

Parámetros Fisicoquímicos	ARP para <i>C. vulgaris</i>	ARP para <i>S. sp.</i>	BBM
Nitrógeno Total (mg/L N)	165,5 ± 3,53	121 ± 4,24	34,5 ± 2,83
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	35,1 ± 7,64	52,15 ± 0,07	127,8 ± 0,42
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	794 ± 0,00	670 ± 8,49	4 ± 0,01
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	340 ± 5	303 ± 2	255,05 ± 9,5
Calcio (mg/L)	13,44 ± 0,06	11,34 ± 0,02	9,43 ± 0,57
Cobre (mg/L)	< 0,01	< 0,01	0,014 ± 0,01
Cromo (mg/L)	< 0,01 LD	< 0,01 LD	< 0,02 LD
Hierro (mg/L)	0,73 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,19 ± 0,01
Molibdeno (mg/L)	< 0,04	< 0,04	< 0,1 LD
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	8,30 ± 0,5	7,22 ± 0,7	1,23
Níquel (mg/L)	< 0,05	< 0,05	< 0,05 LC
Plomo (mg/L)	< 0,05 LD	< 0,05 LD	< 0,004 LD
Potasio (mg/L)	6,18 ± 0,42	6,11 ± 0,11	95,70 ± 6,98
Sodio (mg/L)	5,05 ± 0,41	4,95 ± 0,04	105,95 ± 7,72
Turbidez (NTU)	5,6	4,3	0,15
pH	6,93 ± 0,6	7,02 ± 0,05	7,01 ± 0,2

LD: Límite de Detección, N/A: no aplica. LC: límite de cuantificación

A continuación del cosechado de los cultivos, el exceso de agua se eliminó mediante centrifugaciones sucesivas hasta concentrar la biomasa. El sobrenadante se recolectó y almacenó para ser analizado y poder evaluar la capacidad de eliminación de nutrientes y metales del medio. La Figura 4.1.9 muestra una imagen de los fotobiorreactores durante el cultivo de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* en el agua residual de piscicultura expuestos a la intemperie en la ciudad de Quito – Ecuador. Se observa que, en ambas especies, los análisis realizados para los macronutrientes NT, PT y COT muestran porcentajes altos de eliminación (> 90 %) a lo largo de los 12 días de cultivo en el agua de piscicultura y su control en medio BBM para la especie *C. vulgaris*. La reducción de DQO fue mayor al 50 % para *C. vulgaris*, pero muy baja para la especie *S. sp.* con excepción del hierro y calcio, el resto de los metales analizados no demostró reducción sino más bien aumentos en concentraciones o, valores muy bajos que no estaban dentro del rango de medición de la técnica analítica empleada.

De forma análoga al agua residual anterior, se calculó la eliminación de algunos parámetros fisicoquímicos analizados para este tipo de agua. En la Tabla 4.1.8 se presentan los porcentajes de eliminación de los parámetros analizados del agua residual de piscicultura al inicio del cultivo y en el sobrenadante final, tras un tiempo de 12 días de cultivo para la especie *Chlorella vulgaris* y de 13 días para la especie *Scenedesmus* sp. (los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar).



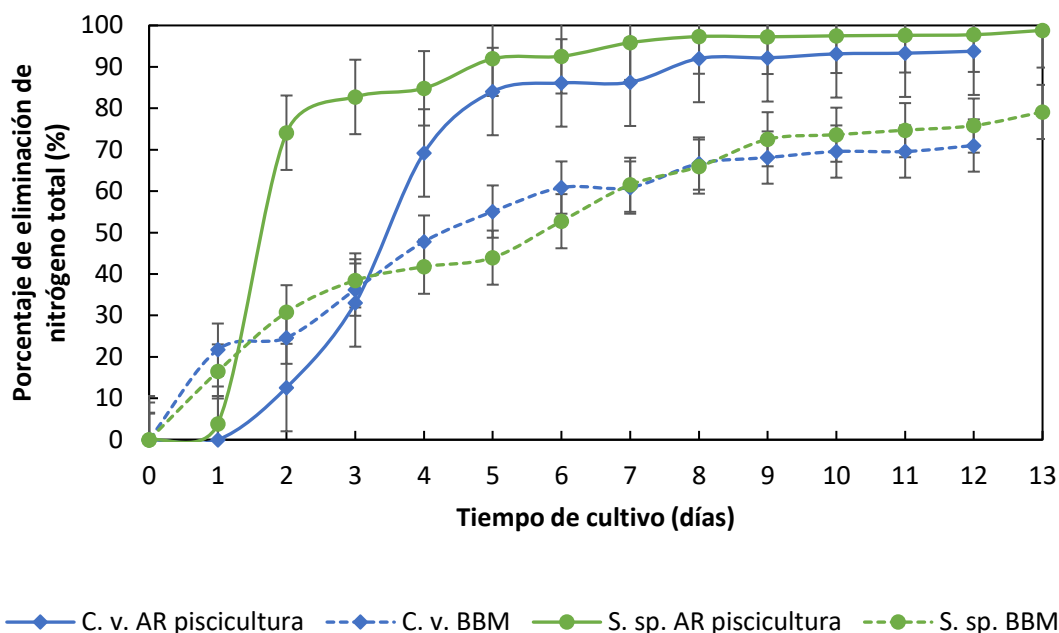
**Figura 4.1.9** Imagen de los fotobiorreactores durante el cultivo de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) en el agua residual de piscicultura.

En la Figura 4.1.10 se muestra la eliminación de NT en el agua residual de piscicultura y el medio de control para las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Para la primera microalga se observa una eliminación de NT de 93,77 % en el día 12, correspondiente a una concentración final de NT de  $19,5 \pm 2,12$  mg/L N. Por su parte con el medio BBM alcanzó una eliminación del nutriente del 71,01 %, correspondiente a una concentración de final de  $10 \pm 1,41$  mg/L N. Para la especie *Scenedesmus* sp., el Nitrógeno Total (NT) se redujo hasta 98,81 % correspondiente a una concentración de  $2 \pm 1,41$  mg/L en el agua residual y hasta 79,12 % en el medio de control BBM, correspondiente a una concentración de  $9,5 \pm 0,71$  mg /L después de 13 días de cultivo.

**Tabla 4.1.8** Eliminación de nutrientes en el agua residual de piscicultura por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

<b>Especie de microalga: <i>Chlorella vulgaris</i></b>			
<b>Parámetros fisicoquímicos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Eliminación Total (%)</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	313 ± 4,95	19,5 ± 2,12	93,77
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	113,85 ± 1,34	9,15 ± 0,07	91,96
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	792 ± 5,66	52 ± 0,01	93,43
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	340 ± 5	139 ± 4	59,12
Calcio (mg/L)	13,44 ± 0,06	11,76 ± 0,05	12,5
Cobre (mg/L)	< 0,01	0,49 ± 0,03	-
Cromo (mg/L)	< 0,01 LD	< 0,01 LD	*
Hierro (mg/L)	0,73 ± 0,04	0,17 ± 0,01	76,71
Molibdeno (mg/L)	< 0,04	< 0,04	*
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	8,30 ± 0,5	7,30 ± 0,44	12,05
Níquel (mg/L)	< 0,05	< 0,05	*
Plomo (mg/L)	< 0,05 LD	< 0,05 LD	*
Potasio (mg/L)	6,18 ± 0,42	16,54 ± 1,12	-
Sodio (mg/L)	5,05 ± 0,41	12,59 ± 1,02	-
<b>Especie de microalga: <i>Scenedesmus</i> sp.</b>			
<b>Parámetros fisicoquímicos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Eliminación Total (%)</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	168 ± 1,41	2 ± 1,41	98,81
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	75,5 ± 0,71	1,6 ± 0,42	97,88
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	726,5 ± 12,02	37 ± 0,00	94,91
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	303 ± 2	201 ± 4	33,66
Calcio (mg/L)	11,34 ± 0,02	10,92 ± 0,05	18,75
Cobre (mg/L)	< 0,01	0,020 ± 0,002	-
Cromo (mg/L)	< 0,01 LD	< 0,01	*
Hierro (mg/L)	0,69 ± 0,03	0,31 ± 0,02	57,53
Molibdeno (mg/L)	< 0,04	0,050 ± 0,003	-
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	7,22 ± 0,7	10,95 ± 0,66	-
Níquel (mg/L)	< 0,05	<0,05	*
Plomo (mg/L)	< 0,05 LD	<0,05 LD	*
Potasio (mg/L)	6,11 ± 0,11	61,95 ± 3,84	-
Sodio (mg/L)	4,95 ± 0,04	37,40 ± 3,03	-

LD: Límite de Detección. \*Valores fuera de rango. -Sin eliminación



**Figura 4.1.10** Porcentaje de eliminación de nitrógeno total (NT) vs. tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de piscicultura y medio de control BBM.

En la bibliografía se reporta que la cantidad de biomasa obtenida al final del cultivo es dependiente del contenido de N presente en el medio, ya que altas concentraciones de este nutriente pueden tener un efecto tóxico reduciendo así la producción celular [72,97]. Una concentración óptima de N permite la síntesis de metabolitos de las microalgas y su crecimiento celular [191]. Este elemento es el encargado de modular la síntesis de proteínas y, por ende, el crecimiento de las algas, quienes son capaces de usar nitrógeno en diversas formas, siendo los nitratos, nitritos, urea y amoníaco, las formas de nitrógeno inorgánico comúnmente encontradas en el agua residual [192,193]. Estudios comprueban que el rango máximo de N para no presentar toxicidad celular es de 150 mg/L, convirtiendo al nitrógeno en factor limitante de crecimiento celular [191].

En esta investigación la especie *Chlorella vulgaris* fue capaz de tolerar concentraciones ligeramente superiores a 300 mg/L, con una eliminación eficiente de este nutriente, esto es debido a que la tasa de crecimiento y la concentración de N se encuentran correlacionadas provocando un incremento significativo en el crecimiento microalgal [194]. La eliminación del NT alcanzada en este estudio es próxima al expuesto para el crecimiento de la especie *Chlorella* sp. durante siete días con difusión de 2 % de CO<sub>2</sub> v/v, con una eliminación del 90 % del NT, mientras que la misma especie eliminó solo el 40 % del NT con aireación común al ser cultivadas en AR de acuicultura [108]. Otros autores obtuvieron una eliminación de 96 % usando *Chlorella*

sp. en aguas residuales de drenaje primario [186]. El valor de eliminación alcanzado en este estudio es ligeramente superior al de otros autores quienes obtuvieron una eliminación de NT del 87,9 % empleando una dilución del 30 % de agua residual urbana y el resto de agua destilada [195].

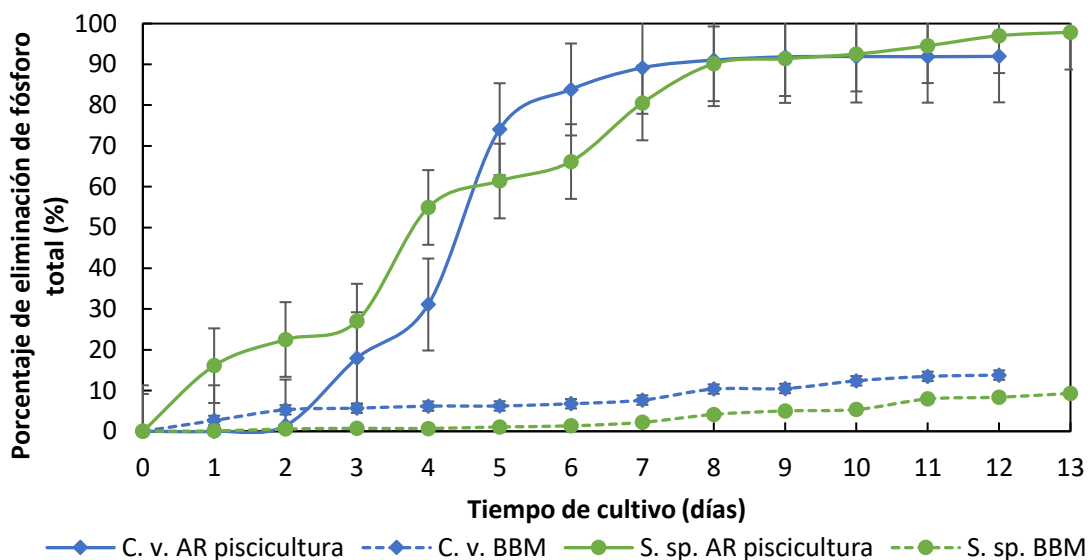
Para la especie *Scenedesmus* sp., el porcentaje de eliminación de NT en el AR de piscicultura resultó mayor al valor reportado en la literatura al usar aguas residuales de fertilizantes en Vietnam como medio de cultivo, con una concentración inicial de microalgas de 60 mg/L, el cual alcanzó un porcentaje de eliminación de 83,6 % [175]; también se mantuvo próximo a valores reportados en la literatura para esta misma especie en la biorremediación de aguas residuales salobres de piscadería en el que se alcanzó una eliminación de nitrógeno de  $91,2 \pm 2,1$  % [71]. La reducción de N en forma de nitratos para la especie *Tetradismus obliquus*, otra microalga de la familia *Scenedesmaceae*, fue de 85 % al ser cultivada en agua residual procedente del efluente de un estanque de cría de peces [72].

La Figura 4.1.11 muestra el porcentaje de eliminación de PT en agua residual de piscicultura y el medio de control BBM de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. al cabo de 12 y 13 días de cultivo, respectivamente. Para la primera especie se alcanzó una reducción del 91,96 % del PT presente en el medio, dejando una concentración de  $9,15 \pm 0,07$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$  de PT en el día 12. Para el medio BBM se identificó una eliminación de 13,78 %, correspondiente a una concentración de  $95,7 \pm 0,99$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ .

El fósforo es uno de los compuestos fundamentales para la biosíntesis de los ácidos nucleicos y la transferencia de energía necesaria en procesos metabólicos, razón por la cual su concentración disminuyó al finalizar el cultivo microalgal. La principal fuente de fósforo para *C. vulgaris* son las moléculas de fosfato inorgánico siendo este el nutriente limitante para el crecimiento microalgal [164,196]. El resultado para la eliminación de PT de esta investigación es mayor respecto del valor reportado en la literatura empleando aguas residuales crudas y digeridas por cerdos (entre 41-62,5 %) [197], y muy próximos al reportado en la literatura con un valor de 93,4 % al diluir el agua residual urbana con 10 % de agua destilada [195]. Sin embargo, para *Chlorella* sp., se han reportado reducciones de hasta 99 % de PT al ser cultivadas en el AR de acuicultura con un suministro de 2 % v/v de  $\text{CO}_2$  durante siete días [108].

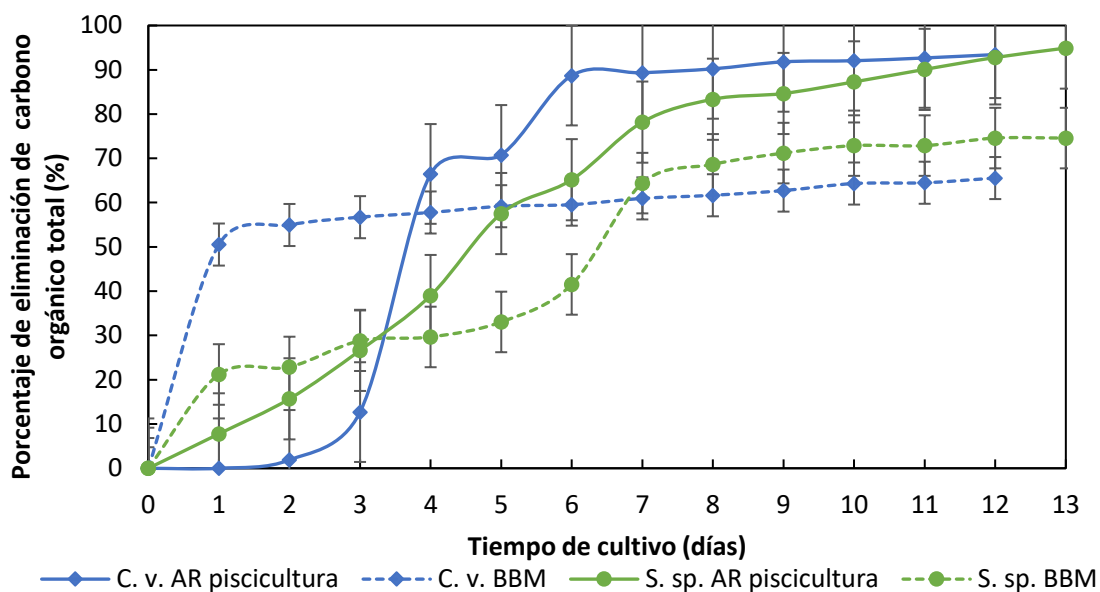
Para la especie *Scenedesmus* sp., la eliminación de PT al cabo del día 13 fue de 97,88 %, correspondiente a una concentración de  $1,6 \pm 0,42$  mg/L. Por su parte, el control en medio BBM muestra un muy bajo porcentaje de eliminación, de solo 9,31 % correspondiente a una concentración de  $105,25 \pm 0,07$  mg/L. La eliminación de PT del presente estudio es alta en el

cultivo con agua de piscicultura con respecto a la de otros autores que encontraron un porcentaje de eliminación de fósforo en un cultivo de agua residual de piscadería de 77,54 % [198] y de  $78,7 \pm 2,4$  % en aguas residuales salobres de piscadería [71]. Los autores aseguran que la eliminación de este nutriente no se relaciona con la densidad celular, y explican que, durante el tiempo de cultivo de 22 días, se alcanzó la fase de muerte celular donde las células muertas liberaron fósforo total nuevamente al agua, razón por la cual no se alcanza una mayor eliminación del nutriente.



**Figura 4.1.11** Porcentaje de eliminación de fósforo total (PT) vs. tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de piscicultura y medio de control BBM.

El carbono también es un elemento fundamental de todo sistema vivo, y constituye cerca del 50 % de la biomasa microalgal que posteriormente se convierte en lípidos y triglicéridos [199]. Las algas verdes son organismos que pueden crecer de forma heterótrofa (fuentes orgánicas de carbono), además de la forma autótrofa común (uso de CO<sub>2</sub> como fuente de carbono) o mixótrofa (fuentes de carbono y energía lumínica) [175]. La Figura 4.1.12 muestra el porcentaje de eliminación de carbono orgánico total para ambas especies de estudios en el agua residual de piscicultura y su control en medio BBM Para la especie *Chlorella vulgaris*, la eliminación de COT fue de 93,43 %, con una concentración de COT final de  $52 \pm 0,01$  mg/L C. En el medio BBM se observó una eliminación de 65,55 % del COT en el medio, correspondiente a una concentración de  $97,5 \pm 2,83$  mg/L C al cabo de 12 días.



**Figura 4.1.12** Porcentaje de eliminación de carbono orgánico total (COT) vs. tiempo de las especies *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de piscicultura y medio de control BBM.

El agua residual de piscicultura presentó un alto contenido de COT, aun así la reducción de COT en el agua residual de estudio es ligeramente mayor en comparación con valores reportados en la literatura para un estudio que probó la calidad de la luz en la eliminación de nutrientes, alcanzando una eficiencia de eliminación del 82,27 % de COT con la especie *C. sorokiana* cultivada en agua residual de acuicultura bajo luz de color azul; esta diferencia puede estar relacionada con el tratamiento lumínico realizado al agua y al tiempo de cultivo de 8 días [65]; diferente al cultivo de este estudio en el que se mantuvo con luz solar en fotoperiodos de 12 h.

Para la especie *Scenedesmus* sp., la eliminación de COT en el agua residual de piscicultura fue de 94,91 % en el día 13 con concentración de 37 mg/L; para el control en medio BBM se observó una eliminación de 74,58 %, correspondiente a una concentración de  $15 \pm 0,00$  mg/L. Estos resultados demuestran que la especie *Scenedesmus* sp. presentó una mejor eliminación de nutrientes en el agua de piscicultura versus el medio control. De forma análoga a los otros macronutrientes, en el cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua residual de piscicultura hubo una alta eliminación de COT al cabo de 13 días, muy próximo al resultado de otro grupo de investigadores que alcanzaron una reducción de COT del 96,07 % en el tratamiento de un agua residual simulada con esta microalga durante 12 días, dejando en el medio una concentración final de 35,12 mg/L de C [181].

Con respecto al crecimiento de la microalga en otros tipos de aguas residuales se encontró que en un estudio en el que usaron agua residual urbana no esterilizada y agua residual porcina en proporción 1:2, la reducción de COT fue de 82,42 % [200], mientras que en agua de industria porcina, la especie *Scenedesmus* sp. eliminó el 67,12 % del COT del medio de cultivo al cabo de 11 días de cultivo [152]. Estas diferencias pueden atribuirse a las formas de carbono (orgánico e inorgánico), así como a las fuentes lumínicas disponibles en el cultivo de cada una de las aguas residuales empleadas.

#### **Eliminación de otros parámetros fisicoquímicos y metales pesados en AR de piscicultura**

La Tabla 4.1.8 también refleja la reducción de otros parámetros fisicoquímicos y metales analizados. En cuanto a la DQO, la reducción alcanzada por *Chlorella vulgaris* en el presente estudio es de 59,12 %; este valor es menor pero próximo a la reducción de 61 % de DQO reportada en la literatura para la misma especie cultivada en agua residual de acuicultura con valor inicial de DQO de  $112 \pm 21$  mg/L y dejando una concentración final de 44 mg/L después de ocho días de cultivo [108].

También se puede observar en dicha tabla la disminución en la concentración de calcio, hierro y nitrógeno amoniacal del medio de cultivo. Sin embargo, para el cobre, potasio y sodio se observó un incremento de concentración, probablemente debido a concentraciones de estos metales en el inóculo en BBM. Para cromo, molibdeno, níquel y plomo no fue posible calcular el porcentaje de eliminación ya que las concentraciones estuvieron fuera del rango de sensibilidad de la técnica empleada (menores a 0,01; 0,04; 0,05 y 0,05 mg/L, respectivamente).

La presencia de calcio se atribuye a funciones indispensables para *C. vulgaris* en su pared celular [164] y participa en la floculación de microalgas, ya que en cultivos de microalgas en pH alto, las sales de calcio precipitan en el medio [165]. Sin embargo, en concentraciones mayores a 2,5 mM, el pH baja y el calcio precipita en forma de carbonato de calcio y otras sales de calcio sin producir autofloculación [186]. Dado que la concentración final de calcio en el agua residual de piscicultura al finalizar el cultivo fue de 11,76 mg/L (0,294 mM), concentración menor a la mencionada por Vandamme et al., (2012) para la precipitación del calcio [165], puede inferirse que no hubo precipitación del calcio y la microalga no fue capaz de eliminarlo adecuadamente. Otros autores mencionan que una buena concentración de calcio en el medio promueve la regulación del flujo electrónico aumentando la producción masiva de ATP que se emplea en la síntesis de lípidos [151].

En el caso del cobre, este es un metal pesado que influye en el crecimiento microalgal, puesto que en concentraciones mayores a 2 mg/L impide el proceso de la fotosíntesis y causa



modificaciones en la pared celular de la microalga [186]; sin embargo, su presencia en el medio de cultivo es fundamental para la puesta en marcha del sistema de transporte de electrones; y además, sirve como cofactor de ciertas enzimas [164]. En este estudio al finalizar el cultivo de *C. vulgaris* se observó un leve incremento en la concentración del cobre que puede estar asociado a los metabolitos producidos por las microalgas. Otros estudios demuestran que *C. vulgaris* es capaz de eliminar el 32-45 % del cobre presente en aguas residuales [189]. La baja eliminación puede estar asociada a los valores del pH del medio el cual se mantuvo próximo a la neutralidad y la mejor absorción de cobre fue en pH 4-5 debido al aumento de ligandos y la unión con grupos carboxilo entre las algas y el metal. Por ello, a pH fisiológico no se registró una mayor eliminación [201].

El contenido de cromo se mantuvo fuera del límite de detección de la técnica analítica empleada, lo que indica concentraciones mínimas de este metal. Aunque en este estudio no pudo comprobarse la eficiencia de *C. vulgaris* hacia la eliminación de cromo, otros autores reportan eficiencias próximas al 58 % [189]. Por otro lado, el hierro es un cofactor necesario para varios sistemas enzimáticos relacionados al crecimiento de la microalga. *C. vulgaris*, así, en el agua residual de piscicultura del presente trabajo presentó un porcentaje de eliminación superior a los publicados en la literatura con la especie *Chlorella pyrenoidosa* cultivada en agua potable con un 49,64 % [187]. Además, otros autores afirman la relación existente entre un alto contenido de hierro y la limitación de nitrógeno para la alta productividad lipídica de *Chlorella* [202]. El porcentaje de eliminación de molibdeno no pudo cuantificarse en este estudio por encontrarse fuera del límite de detección de la técnica de análisis; sin embargo, este elemento es asimilado por la microalga durante su crecimiento y es importante en el proceso de reducción de nitrato a nitrito [203].

Estudios en microalgas confirman que el nitrógeno amoniacal es una de las fuentes más eficientes para la captación de nitrógeno por parte de la especie *Chlorella vulgaris*; pero es letal en altas concentraciones [188]. En el presente estudio la eliminación de nitrógeno amoniacal fue baja respecto a lo reportado por otros autores que obtuvieron reducciones de 22,99 % en este parámetro [204]. La caracterización del agua residual de piscicultura postcosecha reveló un incremento en el contenido de sodio y potasio. Este incremento pudo estar asociado a una mayor tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> respecto a la tasa de disolución, lo que provoca una deficiencia de la fuente de carbono y que se utilice el bicarbonato presente en el medio como fuente de carbono, provocando un incremento de sodio y potasio, y consecuentemente, una alcalinización del medio [188].

Para el caso del níquel y del plomo, no fue posible determinar un porcentaje de eliminación en este estudio, pero se sabe que concentraciones elevadas de níquel afectan al crecimiento de las microalgas, aunque es necesario para las especies que metabolizan urea en el medio. En un estudio similar se alcanzó una eliminación del 25,58 % de níquel con *Chlorella sorokiniana* [205]. En cuanto al plomo, concentraciones mayores a 5  $\mu\text{mol/L}$  destruyen la clorofila debido al incremento del estrés inhibitorio en el proceso de la fotosíntesis, lo cual causa una disminución en el crecimiento celular [190].

En el agua residual de piscicultura, la especie *Scenedesmus* sp. no presentó buenos porcentajes de eliminación de otros parámetros fisicoquímicos o metales. Pese a la eliminación de COT en el agua residual, los resultados de DQO arrojan una eliminación menor al 40 %; sin embargo, otros estudios indican que las microalgas de la especie *Scenedesmus* son capaces de reducir de forma simultánea COT y DQO en más del 80 % de su concentración, incluso en medios de cultivo con aguas residuales no esterilizadas [162].

Para esta especie se puede observar únicamente la eliminación de calcio y hierro. Los elementos calcio, sodio y potasio son componentes importantes de la materia viva y actúan como cofactores en las reacciones enzimáticas de microalgas [192], y en procesos de osmorregulación, en el caso del potasio [206]. Sin embargo, tienen concentraciones límites para el óptimo crecimiento de las especies; por ejemplo, la concentración no debe superar valores de 0,1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  de calcio y potasio, respectivamente. Un aumento en las concentraciones de sodio o potasio en medios de cultivo puede estar relacionado a deficiencia en la fuente de carbono; por tanto, la microalga utilizará el bicarbonato disponible en el medio [188].

En el AR de piscicultura se dio un incremento en la concentración de cobre en el medio. Diversos estudios demuestran que la capacidad de eliminación y acumulación de cobre está relacionada a la concentración inicial del metal en el medio de cultivo [175]; y que las células muertas suelen retener más metales que las células vivas, aunque la capacidad de desorción de metales por células vivas está demostrado en la literatura [207]. Además, tiempos de cultivos superiores a 20 días pueden eliminar totalmente el contenido de cobre presente en el medio [208].

Aunque en este estudio no fue posible cuantificar la eliminación de cromo o plomo por encontrarse por debajo del límite de detección de la técnica analítica empleada, un estudio confirmó que la especie *Scenedesmus* sp. pudo eliminar cerca del 100 % del cromo presente en aguas residuales de curtiembre posterior a sus 12 días de cultivo [209]. La eliminación de hierro de este estudio fue del 57,53 % en las aguas residuales de piscicultura, pero otras investigaciones

confirman la eliminación total del hierro, cadmio y cromo del agua de cultivo de la especie *Scenedesmus* sp., mencionando que los metales se acumularon de manera efectiva a partir del cultivo de la especie en aguas residuales de mercados al aire libre posterior a 18 días de cultivo [210].

La especie *Scenedesmus* sp. fue capaz de eliminar el 89 % del plomo presente en el medio acuoso [175]. Esto se corresponde a lo ya demostrado en bibliografía relativo a que las algas son capaces de absorber pasivamente metales como el plomo y estroncio, en polisacáridos anclados en la pared celular y la matriz intracelular, aunque la tasa de eliminación del metal dependerá de la concentración inicial del mismo, del tiempo de exposición y de la especie o especies de microalgas en el cultivo [211]. En cuanto al molibdeno, en el presente estudio se apreció un aumento de concentración para este metal, y aunque su valor se mantuvo bajo, hay evidencia de especies del género *Scenedesmus* que se utilizan para la eliminación de molibdeno en sistemas acuosos [212].

Las principales formas de nitrógeno encontradas en las aguas residuales corresponden a nitratos y nitrógeno amoniacal, los cuales satisfacen los requerimientos de nitrógeno de la célula para su crecimiento, aunque es conocido que concentraciones elevadas de amoníaco pueden inhibir el crecimiento microalgal [213]. En este estudio la concentración de nitrógeno amoniacal se incrementó ligeramente en el cultivo en agua residual de piscicultura, pudiendo estar involucrado en el crecimiento de la especie. Por otra parte, en el presente estudio no fue posible cuantificar la eliminación del níquel pues sus valores al inicio y al final del cultivo estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica, pero estudios reportados en la bibliografía establecen que *Scenedesmus* sp. puede tolerar concentraciones de metales que oscilan entre 0,5-2 mg/L de cobre, níquel, cadmio y zinc [214].

En la Tabla 4.1.9 se muestran los valores de los límites máximos permitidos por la legislación ambiental ecuatoriana según el Acuerdo Ministerial N° 097-A para el vertido al sistema de alcantarillado municipal. También se reportan la concentración final de cada parámetros fisicoquímico analizado y posteriormente la verificación del cumplimiento de la normativa para el cultivo de las especies de microalgas de estudio en el agua residual de piscicultura.

**Tabla 4.1.9** Comparación de límites de descarga de la normativa ambiental ecuatoriana vigente con la concentración final de parámetro fisicoquímicos posterior al tratamiento de agua residual de piscicultura con las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

<b>Especie de microalga: <i>Chlorella vulgaris</i></b>			
<b>Parámetros Fisicoquímicos</b>	<b>Límite de descarga</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Cumplimiento de norma ambiental</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	60,0	19,5 ± 2,12	Si
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	15,00	9,15 ± 0,07	Si
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	N.R.	52 ± 0,01	-
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	500	139 ± 4	Si
Calcio (mg/L)	N.R.	11,76 ± 0,05	-
Cobre (mg/L)	1,00	0,49 ± 0,03	Si
Cromo (mg/L)	0,5	< 0,01 LD	Si
Hierro (mg/L)	25,00	0,17 ± 0,01	Si
Molibdeno (mg/L)	N.R.	< 0,04	-
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	N.R.	7,30 ± 0,44	-
Níquel (mg/L)	2,00	< 0,05	Si
Plomo (mg/L)	0,5	< 0,05 LD	Si
Potasio (mg/L)	N.R.	16,54 ± 1,12	-
Sodio (mg/L)	N.R.	12,59 ± 1,02	-
<b>Especie de microalga: <i>Scenedesmus</i> sp.</b>			
<b>Parámetros Fisicoquímicos</b>	<b>Límite de descarga</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Cumplimiento de norma ambiental</b>
Nitrógeno Total (mg/L N)	60,0	2 ± 1,41	Si
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	15,00	1,6 ± 0,42	Si
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	N.R.	37 ± 0,00	-
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	500	301 ± 4	Si
Calcio (mg/L)	N.R.	10,92 ± 0,05	-
Cobre (mg/L)	1,00	0,020 ± 0,002	Si
Cromo (mg/L)	0,5	< 0,01	Si
Hierro (mg/L)	25,00	0,31 ± 0,02	Si
Molibdeno (mg/L)	N.R.	0,050 ± 0,003	-
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	N.R.	10,95 ± 0,66	-
Níquel (mg/L)	2,00	<0,05	Si
Plomo (mg/L)	0,5	<0,05 LD	Si
Potasio (mg/L)	N.R.	61,95 ± 3,84	-
Sodio (mg/L)	N.R.	37,40 ± 3,03	-

N.R.: no reportado

En cuanto a la calidad del sobrenadante del AR de piscicultura posterior al tratamiento aplicado con las microalgas puede observarse que se da cumplimiento a la normativa ambiental para la mayoría de los parámetros fisicoquímicos que reporta el acuerdo ministerial para descargas al sistema de alcantarillado público para ambas especies. Desde el punto de vista ambiental, estos resultados respaldan el uso de microalgas para el tratamiento de agua residual de piscicultura de una forma eficiente, de bajo coste y respetuosa con el medioambiente, sin requerimiento del uso o integración de otros tratamientos adicionales.

#### **4.1.2 Crecimiento de la biomasa en las aguas residuales de estudio**

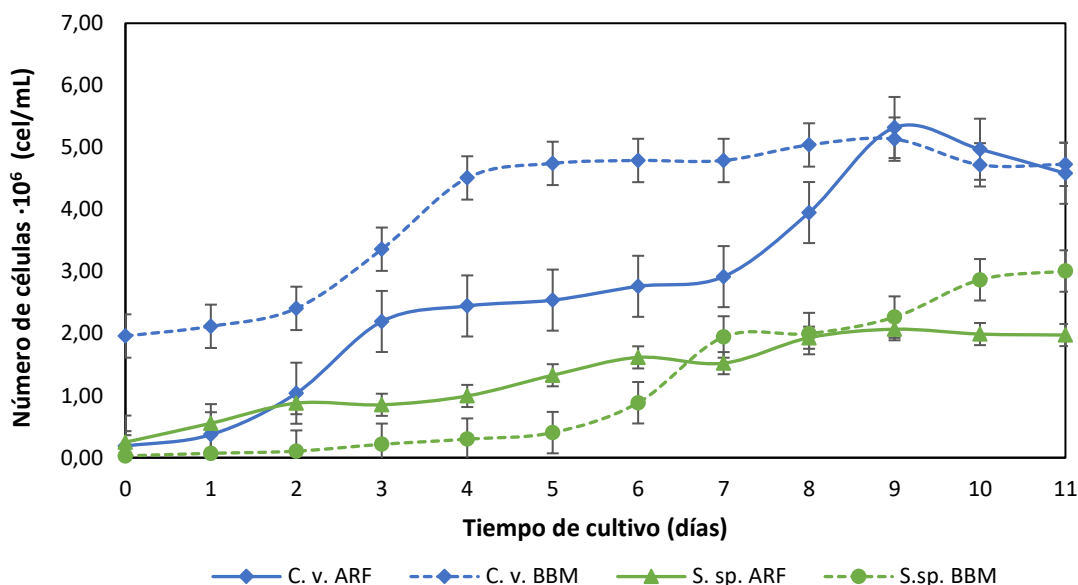
Una vez confirmado el uso de los cultivos de las dos microalgas estudiadas como solución sostenible para el tratamiento de las tres aguas residuales de origen industrial, y del cumplimiento de los límites de descarga de la normativa ambiental ecuatoriana relativa al vertido de aguas, se procederá al estudio de las curvas de crecimiento de las biomásas microalgas generadas y a su caracterización elemental.

##### **a) Agua residual de la industria porcina**

La Figura 4.1.13 presenta el crecimiento celular para las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. durante 11 días en el agua residual de industria porcina (ARFP) y el medio de control (BBM) sin reposición de nutrientes durante el tiempo de cultivo. Para la especie *Chlorella vulgaris* en el ARFP se observa que en el día 0 el cultivo inició con una concentración celular de  $1,88 \cdot 10^5 \pm 0,00$  cel/mL, apreciando una fase exponencial desde el día 1 al día 3 con un incremento de concentración hasta  $2,20 \cdot 10^6 \pm 4,42 \cdot 10^4$  cel/mL, otra fase exponencial menos pronunciada desde el día 3 al 7 y una fase más pronunciada desde el día 7 al 9; en este día 9 se observó la mayor concentración celular ( $5,32 \cdot 10^6 \pm 2,87 \cdot 10^5$  cel/mL). Del día 9 al 11 se aprecia notoriamente la fase de muerte celular con una reducción en la concentración de  $4,58 \cdot 10^6 \pm 3,87 \cdot 10^4$  cel/mL.

En la misma figura también muestra el crecimiento celular de la microalga en el medio control BBM, el cual registró una fase de latencia entre el día 0-2, la fase de crecimiento exponencial del día 2-4 con un aumento en la concentración desde  $1,96 \cdot 10^6 \pm 1,10 \cdot 10^4$  cel/mL hasta  $4,51 \cdot 10^6 \pm 1,44 \cdot 10^5$  cel/mL, seguidamente se aprecia una fase estacionaria comprendida entre los días 4-9, alcanzándose en el día 9 la mayor concentración celular del cultivo de  $5,13 \cdot 10^6 \pm 1,44 \cdot 10^5$  cel/mL. Finalmente, entre los días 9-11 se registró la fase de muerte celular con una disminución en la

concentración celular de  $4,73 \cdot 10^6 \pm 5,52 \cdot 10^4$  cel/mL. Comparando ambos cultivos se aprecia que la microalga crece más rápido en el medio sintético BBM respecto del agua residual.



**Figura 4.1.13** Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de industria porcina y su control en medio BBM.

Como otros microorganismos, las microalgas normalmente presentan las cuatro fases típicas del crecimiento: latencia, exponencial, estacionaria y lisis o muerte celular. Para *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de la industria porcina no se aprecia una fase de latencia marcada; la fase estacionaria se observó de forma pronunciada durante dos momentos del crecimiento celular (días 1-3 y días 7-9) con un marcado descenso de la curva, correspondiente a la fase de muerte celular desde los 9 a los 11 días de cultivo sin reposición de nutrientes. Esta especie ha sido ampliamente estudiada y es conocida por tener altas tasas de crecimiento, alta eficiencia fotosintética y una gran adaptabilidad a condiciones ambientales adversas [215].

La bibliografía relacionada al cultivo de microalgas en agua residual de mataderos de cerdos es realmente limitada; por ello a continuación se hacen comparaciones con aguas residuales relacionadas a la actividad porcina en general. Los valores obtenidos de crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* es similar a las concentraciones de un estudio en el que combinaron el nejayote (agua residual del proceso de cocción del maíz) con aguas residuales porcinas procedentes de la cría de cerdos y agua potable como medio para la producción y el tratamiento de aguas residuales con las especies *Arthrospira maxima* y *Chlorella vulgaris*, con varios tratamientos; en uno de los tratamientos emplearon 90 % del agua residual porcina, medio de cultivo en el que se alcanzó una concentración de  $1,481 \cdot 10^6$  cel/mL. En los otros tratamientos,

las concentraciones celulares fueron superiores debido a la mezcla de agua potable con el agua residual, ya que la dilución disminuye la turbidez y la carga orgánica del medio de cultivo, aumentando el crecimiento celular de dichos tratamientos [216].

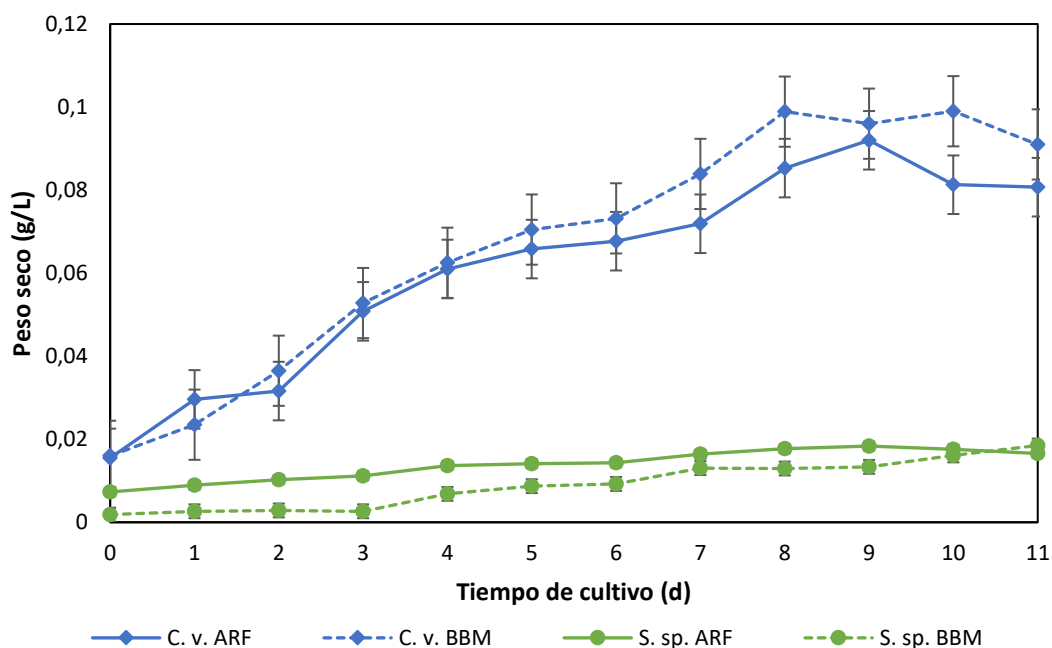
En la Figura 4.1.13 también se muestra el crecimiento celular para la especie *Scenedesmus* sp. durante 11 días de cultivo en el ARFP sin reposición de nutrientes. Se observa que al día 0 el cultivo inició con una concentración celular de  $2,50 \cdot 10^5 \pm 0,00$  cel/mL, apreciando una fase exponencial desde el día 1 al día 6 con un incremento de concentración hasta  $1,62 \cdot 10^6 \pm 1,22 \cdot 10^5$  cel/mL y una fase estacionaria desde el día 8 al 11 con una concentración promedio de células de  $1,98 \cdot 10^6 \pm 1,44 \cdot 10^5$  cel/mL con la que inicia la fase de muerte celular. En el día 9 se observó la mayor concentración celular ( $2,07 \cdot 10^6 \pm 1,44 \cdot 10^5$  cel/mL).

La Figura 4.1.13 también muestra el crecimiento celular de la misma especie en el medio de cultivo sintético BBM, el cual registró la fase de crecimiento exponencial del día 0 al día 4, una fase estacionaria comprendida entre los días 5-11. Desde el día 1 al 6, se observa que la especie cultivada en el agua residual presente crece más rápido respecto de su homóloga cultivada en el medio sintético BBM; sin embargo, a partir del día 7, se observa un incremento en el número de células de la microalga cultivada en el medio de control. Estas diferencias pueden estar asociadas a las composiciones originales de cada medio y a la forma de aprovechamiento de nutrientes de la microalga en cada medio de cultivo.

Tal y como se mencionó para la microalga *Chlorella vulgaris*, para la especie *Scenedesmus* sp. hay pocas referencias sobre esta especie cultivada en el agua residual de la industria porcina; sin embargo, otras especies de la familia *Scenedesmaceae* también han sido cultivadas en aguas residuales porcinas, tal es el caso de la especie *Tetrademus obliquus* cultivada en agua residual porcina sin dilución, la cual presentó una inhibición en su crecimiento en este tipo de agua; pero creció bien en el mismo tipo de agua pretratada con el proceso Foto-Fenton para la eliminación de color y materia orgánica, reduciendo así la toxicidad del agua [28].

Otro parámetro de crecimiento celular analizado fue el peso seco. La Figura 4.1.14 muestra el peso seco de ambas especies durante 11 días de cultivo en el agua residual de la industria porcina y su comparación con la misma especie cultivada en el medio de control BBM. Para la especie *Chlorella vulgaris* en el agua residual, el peso seco inicia en el día cero con  $0,0155 \pm 0,00001$  g/L, del día 1 al día 9 se observa una fase exponencial alcanzando una concentración máxima de  $0,0920 \pm 0,00007$  g/L; y desde el día 9 al 11 el peso seco se ve afectado registrando una disminución en su valor hasta  $0,0807 \pm 0,00006$  g/L al finalizar el cultivo. Para el medio de control BBM se observaron valores ligeramente mayores para el peso seco en comparación con

los valores obtenidos en el ARFP, iniciando con valores de  $0,016 \pm 0,00001$  g/L al inicio del cultivo, alcanzando una concentración máximo al octavo día de  $0,0989 \pm 0,00028$  g/L, y finalizando con registros de peso seco de  $0,0091 \pm 0,00007$  g/L; se observa la tendencia de la especie *C. vulgaris* a incrementar su cantidad de biomasa en el medio de control respecto del ARFP, comprobando los datos obtenidos en el conteo celular.



**Figura 4.1.14** Peso seco de *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de industria porcina y su control en medio BBM.

En la misma Figura 4.1.14 se aprecia el peso seco para la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en el ARFP y en el medio de control. Para el ARFP se observa que el peso seco inicia en el día cero con  $0,0073 \pm 0,0004$  g/L, del día 0 al día 9 se observa una fase exponencial alcanzando una concentración máxima de  $0,0184 \pm 0,0002$  g/L; y desde el día 9 al 11 el peso seco registra una disminución en su valor hasta  $0,016 \pm 0,0005$  g/L al finalizar el cultivo. Para el medio de control BBM se observaron valores menores para el peso seco en comparación con los valores obtenidos en el ARFP, iniciando con valores de  $0,0019 \pm 0,0001$  g/L al inicio del cultivo y finalizando con registros de peso seco de  $0,0185 \pm 0,0003$  g/L; sin embargo, en ambos medios de cultivos se observa la tendencia de la especie *Scenedesmus* sp. a incrementar su cantidad de biomasa en los primeros ocho días de cultivo.

De forma general se aprecia que el peso seco fue mayor para la especie *Chlorella vulgaris* en comparación con *Scenedesmus* sp. La Tabla 4.1.10 muestra los resultados de la generación de biomasa y la productividad de ambas especies en los medios de cultivo de estudio; para la especie *C. vulgaris* puede apreciarse que el ARFP fue capaz de aportar los nutrientes requeridos



para el crecimiento de la microalga generando 1,45 veces más biomasa usando el agua residual en comparación con el medio de control BBM. Sin embargo, la especie crece más rápido en el medio sintético en comparación con el agua residual.

**Tabla 4.1.10** Generación de biomasa y productividad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en el cultivo en el agua residual de industria porcina y su control en BBM.

<b>Especie de microalga: <i>Chlorella vulgaris</i></b>		
<b>Parámetro de crecimiento de cultivo</b>	<b>ARFP</b>	<b>BBM</b>
Concentración de biomasa (g/L)	0,6650	0,4585
Productividad volumétrica (g/L·d)	0,0605	0,0382
Productividad específica (d <sup>-1</sup> )	0,0909	0,0833
Tasa de crecimiento específica (μ)	0,0765	0,1360
Tiempo de duplicación (t <sub>d</sub> )(d)	9,0596	5,0951
<b>Especie de microalga: <i>Scenedesmus</i> sp.</b>		
<b>Parámetro de crecimiento de cultivo</b>	<b>ARFP</b>	<b>BBM</b>
Concentración de biomasa (g/L)	0,6206	0,4864
Productividad volumétrica (g/L·d)	0,0564	0,0374
Productividad específica (d <sup>-1</sup> )	0,0909	0,0769
Tasa de crecimiento específica (μ)	0,1523	0,5315
Tiempo de duplicación (t <sub>d</sub> )(d)	4,5499	1,3041

Los resultados de la generación de biomasa y la productividad de la especie *Scenedesmus* sp. obtenida con el ARFP y su control en medio BBM muestran que el ARFP generó 1,28 veces más biomasa que el medio sintético BBM; sin embargo, al finalizar el cultivo, se observa un crecimiento más rápido en el medio sintético respecto del agua residual.

Al realizar la cosecha, la concentración en peso seco para *Chlorella vulgaris* cultivada en el ARFP resultó estar en el rango observado por otros investigadores que cultivaron la misma especie de microalga en aguas residuales porcinas procedente de granjas de cría de cerdos diluidas con medio sintético BG-11, registrando valores de peso seco de 0,78 g/L en el medio BG-11 puro; 0,64 g/L para el tratamiento de mezcla con 20 % de agua residual y 80 % de medio BG-11 y 0,5 g/L para el tratamiento de 40 % de agua residual y 60 % de medio BG-11; estos resultados muestran una mejora considerable en los valores de peso seco cuando las aguas residuales se mezclan con medios sintéticos o se diluyen con agua potable. Normalmente con el uso de aguas residuales el pH tiende a aumentar en los días iniciales de cultivo debido al

consumo de carbono inorgánico y la liberación de metabolitos en el cultivo durante la actividad fotosintética de las microalgas [130,217].

Para la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en el agua residual porcina se reportan valores de 0,3945 g/L de concentración de biomasa, 0,043 g/L·d de productividad volumétrica y 0,22 d<sup>-1</sup> de tasa de crecimiento para cultivos aireados por 8 días con concentración de 0,04 % de CO<sub>2</sub> v/v, mientras que para concentraciones de 3 % de CO<sub>2</sub> v/v, los valores de concentración de biomasa, productividad específica y tasa de crecimiento fueron 0,4785 g/L; 0,0598 g/L·d y 0,25 d<sup>-1</sup>; respectivamente. Esto sugiere que incrementos en la proporción de CO<sub>2</sub> en la fuente de burbujeo puede mejorar la producción de biomasa [36].

La productividad de la biomasa alcanzada por *Chlorella vulgaris* en el agua residual de la industria porcina presenta valores semejantes a los reportados por otros autores para la misma microalga cultivada en aguas residuales porcinas (procedente de las pocilgas de cerdos adultos) pretratadas biológicamente y filtradas durante 20 días de cultivo (0,0245 ± 0,012 g/L·d) [43], mientras que al ser cultivada en el agua residual porcina pretratada con una simple precipitación natural y con ajuste de pH a 8, la productividad de la biomasa alcanzó mayores valores después de 10 días de cultivo (0,0395 ± 0,003 g/L·d) [218]. En las aguas residuales porcinas, la productividad de la biomasa de microalgas suele ser mayor debido a las altas concentraciones de N y P procedentes de la orina y estiércol de los cerdos, teniendo en cuenta que el crecimiento de las microalgas está relacionado con la disponibilidad de nutrientes del medio [219].

La concentración de biomasa para *Scenedesmus* sp. cultivada en el agua residual de la industria porcina resultó ser inferior a los valores reportados para la misma especie cultivada en una mezcla de agua residual urbana con agua residual porcina procedente de la cría de cerdos en concentraciones de 2 % v/v y 4 % v/v únicamente filtrada (sin esterilización); en condiciones autótrofas, la concentración de biomasa fue de 1,22 g/L al cabo de 13 días de cultivo con exposición a la luz, mientras que en condiciones de oscuridad, la concentración de biomasa alcanzada fue de 1,1 g/L al cabo de 14 días de cultivo [162]. De igual manera, otros autores emplearon agua residual de orina de cerdo fermentada como medio de cultivo para la misma especie durante 60 días, tiempo en el que lograron un crecimiento celular 10 veces mayor al encontrado en el presente trabajo; esto puede ser atribuido al tiempo y diferencias en las condiciones de cultivo que implicaron la adición de nutrientes al medio en el 12<sup>vo</sup> día de cultivo, lo cual pudo ser fundamental para extender la duración del cultivo y así incrementar la producción de biomasa [220].

La productividad de la biomasa de *Scenedesmus* sp. en el presente estudio es superior a los valores reportados para la especie *Scenedesmus obliquus* cultivada en agua residual porcina biológicamente pretratada y filtrada durante 20 días de cultivo ( $0,0265 \pm 0,046$  g/L·d) [43] y para la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en agua porcina filtrada durante 10 días ( $0,0415 \pm 0,001$  g/L·d) [30]. Sin embargo, la productividad de la biomasa obtenida en al agua residual de la industria porcina es menor respecto de los valores reportados en la bibliografía usando aguas residuales porcinas filtradas y digeridas anaeróbicamente diluidas con medio Mayeux, Sandine y Elliker (medio MSE) a diferentes concentraciones durante 14 días de cultivo ( $0,084-0,095$  g/L·d) [221]. Este incremento en la productividad es de esperar al realizar la dilución del agua porcina, ya que esto disminuye la turbidez, color y cantidad de materia orgánica facilitando la absorción de nutrientes [216]. Con el uso de aguas residuales municipales, se ha encontrado mejores valores de productividad de la biomasa para esta especie ( $0,0737$  g/L·d) [173].

En general, los autores que han trabajado con el cultivo de microalgas en aguas residuales porcinas confirman que las microalgas crecen bien en este tipo de aguas conforme a la cantidad de biomasa producida, pese a la presencia de altas cantidades de nutrientes y otras sustancias tóxicas como metales pesados, hormonas y antibióticos que suelen estar presentes en este tipo de aguas; además, la eliminación de contaminantes es efectiva y presentan un alto potencial para la conversión de la biomasa en bioenergía [219]. Las aguas porcinas suelen poseer color, turbidez y altas concentraciones de materia orgánica y nitrógeno amoniacal que pueden inhibir el crecimiento, por lo que es común el uso de agua potable para su dilución; sin embargo, esta práctica no es recomendable cuando se desea aplicar los principios de la economía circular a los cultivos de microalgas multipropósitos (obtención de biomasa, lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos, etc.).

La inclusión de operaciones unitarias y tratamientos convencionales empleados para el tratamiento de aguas residuales municipales o industriales pueden ser empleados como complemento al tratamiento con microalgas; por ejemplo, el método foto-Fenton, ayuda a la eliminación de color y turbidez; posteriormente el lodo resultante de procesos foto-Fenton pueden usarse como fertilizantes para cultivos destinados a la alimentación animal y así incorporar tendencias sostenibles a los procesos de biorrefinerías basados en el aprovechamiento integral de biomasa de microalgas [28].

#### **Caracterización elemental de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.**

La biomasa seca cultivada en el medio de control BBM y en el medio de industria porcina fue analizada a nivel elemental y su composición se muestra en la Tabla 4.1.11. En dicha Tabla

se aprecia la composición en peso de los elementos nitrógeno (N), carbono (C), hidrógeno (H), azufre (S) y oxígeno (O). En ambas especies la composición elemental de N es mayor en el medio de agua residual, la composición de C es menor en el agua residual y para H y O hay diferencias en cada especie.

**Tabla 4.1.11** Composición elemental de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Cultivadas en medio de control BBM y agua residual de industria porcina.

Especie	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Scenedesmus</i> sp.	
	BBM	ARFP	BBM	ARFP
N	2,96	8,93	3,09	7,52
C	48,23	45,44	47,26	46,45
H	7,26	6,58	7,26	7,20
S	0,00	0,00	0,00	0,00
O	26,58	27,78	25,11	22,51

La técnica empleada en el análisis elemental de las especies de estudio revelan la presencia de C, N, H y O; para el caso del azufre se observa que no hay S en estas especies; estos valores son próximos a los encontrados en la bibliografía para la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales porcinas procedente de una graja dedicada a la cría de cerdos, cuyo análisis elemental arrojó la presencia de 45,9 % de C, 11,6 % de N, 6,4 % de H y 1,4 % de S, sin reportar valores para oxígeno [158]. Pandey et al., (2023) reportan que para la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual de la industria láctea presentó 48,27 % de C, 7,52 % de N, 5,32 % de H y 38,89 % de O [222]. Otras especies del género *Scenedesmus* cultivadas en aguas residuales han reportado valores próximos a los del presente estudio, tal es el caso de la especie *Scenedesmus dimorphus* cultivada en agua residual sintética la cual presentó valores de 44,59 % de C, 4,02 % de N, 8,28 % de H, 0,16 % de S y 15,85 % de O empleando aire atmosférico como fuente de burbujeo y luz solar [223].

La extracción de lípidos totales se desarrolló empleando la mezcla estándar cloroformo:metanol (1:2 v/v) que constituye la mezcla de disolventes orgánicos más empleada para la extracción de lípidos de tejidos vivos según el método de Bligh y Dyer [147]. La cuantificación de los lípidos totales de la biomasa cultivada en agua residual de la industria porcina fue de  $21,49 \pm 1,65$  % para la biomasa seca de *C. vulgaris*. Para la especie *S. sp.*, el contenido de lípidos totales fue de  $16,25 \pm 0,25$  %. Estos valores obtenidos a partir del método estándar serán considerados como los porcentajes de lípidos totales máximos que pueden extraerse a partir de cada especie en el agua residual de estudio.

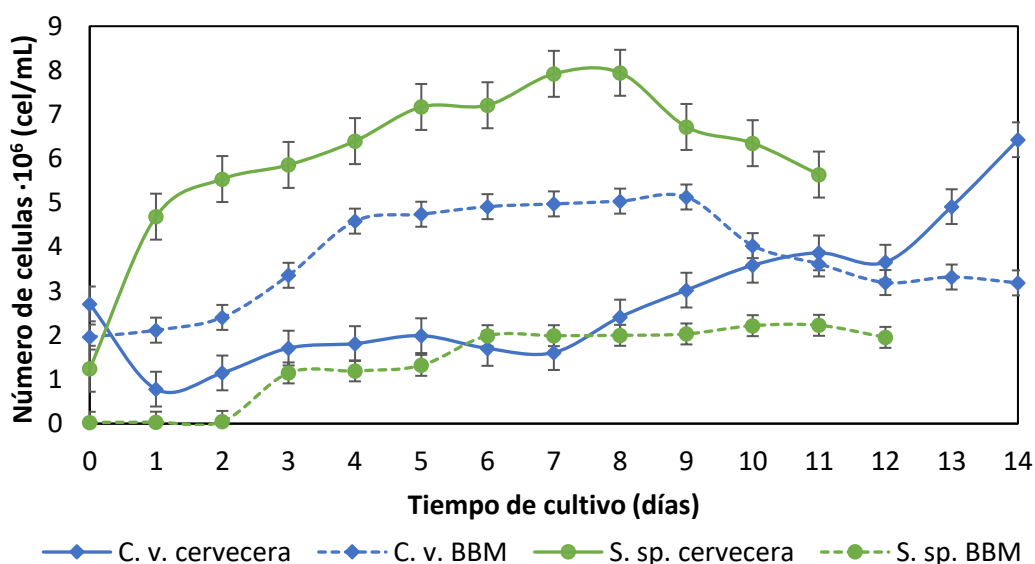
## b) Agua residual de industria cervecera

La Figura 4.1.15 presenta el crecimiento celular para la especie *Chlorella vulgaris* durante 14 días de cultivo empleando el agua residual de la industria cervecera, tiempo en el cual no se realizó reposición de nutrientes (los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar). En este cultivo se realizó una dilución 1:10 de la microalga con el agua residual y en el día 0 el cultivo tuvo una concentración celular inicial de  $2,71 \cdot 10^6 \pm 3,31 \cdot 10^4$  cel/mL. Se observa una fase de latencia o adaptación en el primer día de cultivo en el que la concentración celular desciende, seguidamente se manifiesta una fase exponencial que se presenta entre los días 2-5 con un incremento de concentración hasta  $1,99 \cdot 10^6 \pm 3,20 \cdot 10^5$  cel/mL, otra fase exponencial desde el día 7 al 14 en el que se observó la mayor concentración celular ( $6,43 \cdot 10^6 \pm 7,73 \cdot 10^4$  cel/mL). En este cultivo no se apreció una fase de muerte celular, pero se optó por realizar la cosecha para mantener la viabilidad celular preservando las biomoléculas de valor añadido en el interior de las células [224], y también con fines comparativos ya que el cultivo de control en medio BBM sí mostró su fase de muerte celular desde el día 11 de cultivo.

El crecimiento celular de la misma especie en el medio de cultivo control (medio BBM) registró una fase de crecimiento exponencial entre los días 1-4 con un aumento en la concentración desde  $2,11 \cdot 10^6 \pm 1,10 \cdot 10^4$  cel/mL hasta  $4,59 \cdot 10^6 \pm 3,31 \cdot 10^4$  cel/mL, seguidamente se aprecia una fase estacionaria comprendida entre los días 5-9, alcanzando en el día 9 la mayor concentración celular del cultivo de  $5,13 \cdot 10^6 \pm 1,44 \cdot 10^5$  cel/mL. Entre los días 9-14 se registró la fase de muerte celular con una disminución en la concentración celular hasta  $3,19 \cdot 10^6 \pm 6,63 \cdot 10^4$  cel/mL. Comparando ambos cultivos se aprecia que la microalga crece más rápido en el medio de control, pero alcanza su muerte celular tras 10 días de cultivo; mientras que en el medio residual el crecimiento es más lento pero la tendencia muestra que el cultivo pudo haberse extendido en el agua residual pues no se apreció disminución en la concentración. Este hecho puede deberse al agotamiento de nutrientes en el medio de control y a la existencia de nutrientes suficientes en el medio residual para mantener a la especie.

La Figura 4.1.15 también muestra el crecimiento celular para la especie *Scenedesmus* sp. durante 12 días de cultivo en el agua residual de industria cervecera y en el medio BBM sin reposición de nutrientes durante este tiempo (los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar). El cultivo en agua residual se realizó en primera instancia con una dilución 1:10; sin embargo, no hubo un crecimiento celular importante, por lo que se optó por realizar un nuevo cultivo en dilución 1:20, el cual inició en el día 0 con una concentración celular de  $1,24 \cdot 10^6 \pm 1,22 \cdot 10^5$  cel/mL, presentando una fase exponencial desde el

día 1 al día 7, tiempo en el que incrementa la concentración hasta  $7,92 \cdot 10^6 \pm 8,84 \cdot 10^4$  cel/mL. No se aprecia una fase estacionaria pronunciada, pero a partir del día 8 la concentración celular alcanza su valor máximo ( $7,95 \cdot 10^6 \pm 3,31 \cdot 10^4$  cel/mL) y disminuye hasta el día 12 en el que se realizó la cosecha del cultivo. La dilución 1:20 ayudó a reducir la turbidez del agua residual empleada, la concentración de los nutrientes y el color, lo que ayuda a mejorar la captación de luz por parte de las microalgas.

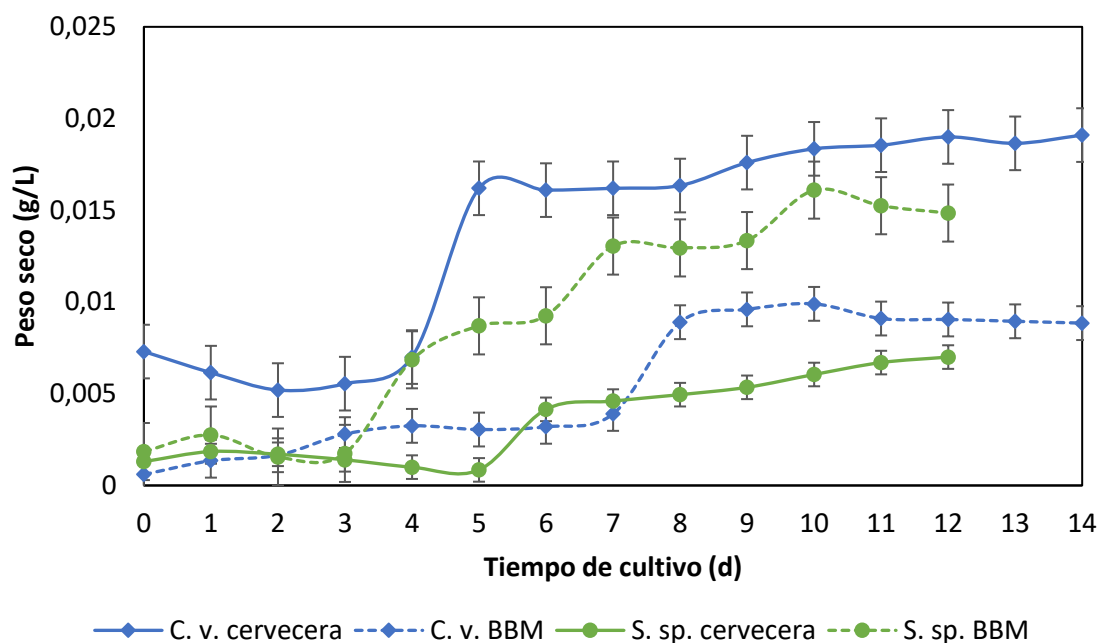


**Figura 4.1.15** Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de la industria cervecera y su control en medio BBM.

La Figura mencionada también muestra el crecimiento celular de *Scenedesmus* sp. en el medio de control BBM en dilución 1:20. Con dicho medio se midió una concentración inicial de  $2,95 \cdot 10^4 \pm 3,31 \cdot 10^2$  cel/mL; también se registró una fase de adaptación hasta el día 2; la fase de crecimiento exponencial del día 2 al día 6, una fase estacionaria comprendida entre los días 6-9, seguida de un ligero incremento de concentración entre los días 10-11 en el que se alcanza la concentración máxima de  $2,23 \cdot 10^6 \pm 1,22 \cdot 10^5$  cel/mL y posteriormente se aprecia el inicio de la fase de muerte celular. Originalmente, el cultivo de control se mantuvo durante 14 días, pero en la Figura 4.1.15 se muestran 12 días para la comparación con la especie cultivada en el agua residual. Desde el día 0 se observa que la especie cultivada en el agua residual presentó un mayor crecimiento en comparación con el medio de control BBM.

También se analizó el peso seco de ambas especies en el AR cervecera y el medio de control. La Figura 4.1.16 muestra que la especie *Chlorella vulgaris* a lo largo de un tiempo de cultivo de 14 días, en el agua residual el peso seco inicia en el día cero con  $0,0073 \pm 0,0008$  g/L, entre el día 1 al día 3 se observa una disminución en el valor del peso seco y desde el día 4 en adelante

se observa una fase exponencial alcanzando una concentración máxima en el día 14 con un valor de  $0,0191 \pm 0,0004$  g/L. De forma análoga, analizando el crecimiento celular, no se observó disminución en este parámetro, pero el cultivo se cosechó con fines comparativos ya que el medio de control presentó disminución en el peso seco al cabo de 14 días. El peso seco del cultivo en el medio control (BBM) presentó menores valores respecto del agua residual iniciando con valores de  $0,0006 \pm 0,0001$  g/L y finalizando con registros de peso seco de  $0,0089 \pm 0,0011$  g/L. En el cultivo en el medio control sí se apreció un periodo constante en el peso seco entre los días 11 y 14 asociado a la etapa de muerte celular del cultivo, por lo que se procedió a su cosechado.



**Figura 4.1.16** Peso seco de *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de la industria cervecera y su control en medio BBM.

Para el peso seco de la especie *Scenedesmus* sp. durante 12 días de cultivo se observa que en el agua residual el parámetro inicia en el día cero con  $0,0013 \pm 0,0001$  g/L, y hasta el día 5 se aprecia una ligera disminución en este parámetro. A partir del día 5 y hasta el día 12, el peso seco incrementa su valor hasta  $0,007 \pm 0,0001$  g/L. La microalga cultivada en el medio de control BBM presentó valores mayores para el peso seco en comparación con los valores obtenidos en el agua residual de la industria cervecera, iniciando con valores de  $0,0019 \pm 0,00$  g/L al inicio del cultivo y finalizando con un valor de peso seco de  $0,0148 \pm 0,004$  g/L.

Comparando ambas especies se aprecia que el peso seco fue mayor para *Chlorella vulgaris* en comparación con *Scenedesmus* sp. La Tabla 4.1.12 muestra los resultados de la generación

de biomasa y la productividad de ambas especies al finalizar los cultivos; para la especie *C. vulgaris* puede apreciarse que el AR cervecera aportó mayor cantidad de nutrientes para el crecimiento de la microalga generando 1,33 veces más biomasa en el agua residual en comparación con el medio de control BBM. Para la especie *Scenedesmus* sp.; el medio de control generó 1,13 veces más biomasa que el medio residual y el tiempo de duplicación fue mayor en el agua residual respecto del medio sintético; lo que indica que la microalga duplica su concentración más rápidamente en el medio BBM, corroborando el comportamiento que refleja la Figura 4.1.16.

**Tabla 4.1.12** Generación de biomasa y productividad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en el cultivo en agua residual de industria cervecera y su control en BBM.

<b>Especie de microalga: <i>Chlorella vulgaris</i></b>		
<b>Parámetro de crecimiento de cultivo</b>	<b>AR industria cervecera</b>	<b>(BBM)</b>
Concentración de biomasa (g/L)	0,6095	0,4585
Productividad volumétrica (g/L·d)	0,0435	0,0328
Productividad específica (d <sup>-1</sup> )	0,0714	0,0714
Tasa de crecimiento específica (μ)	0,3920	0,2576
Tiempo de duplicación (t <sub>b</sub> )(d)	1,7685	2,6904
<b>Especie de microalga: <i>Scenedesmus</i> sp.</b>		
<b>Parámetro de crecimiento de cultivo</b>	<b>AR industria cervecera</b>	<b>(BBM)</b>
Concentración de biomasa (g/L)	0,4927	0,5572
Productividad volumétrica (g/L·d)	0,0411	0,0464
Productividad específica (d <sup>-1</sup> )	0,0833	0,0833
Tasa de crecimiento específica (μ)	0,1063	3,1140
Tiempo de duplicación (t <sub>b</sub> )(d)	6,5196	0,2226

El uso de agua residual de diversas etapas del proceso de elaboración de cerveza se ha extendido en los últimos años entre los investigadores que buscan dar soluciones a los problemas ambientales que éstas generan; las microalgas se han utilizado como agentes de biorremediación de estas aguas y varios autores sustentan la viabilidad del uso del agua de industria cervecera con fines de biorremediación, biocaptura de CO<sub>2</sub>, producción de biomasa, biofloculantes, biocombustibles, bioalcoholes, entre otros bioproductos de interés [56,95,180,184].

Otros autores compararon el crecimiento celular de la misma microalga en cultivos fotoautótrofos de una etapa en agua residual de la industria cervecera esterilizada y no esterilizada, encontrando concentraciones de biomasa de 1,49 ± 0,03 g/L y 2,01 ± 0,02 g/L,



respectivamente [179]. El valor de la concentración de biomasa en el presente trabajo es menor a los reportados en los trabajos citados aun cuando se trabajó con agua residual de la industria cervecera esterilizada; sin embargo, las condiciones ambientales pueden influir mucho en los resultados de un cultivo. También, pese a realizar control diario de pH de forma manual, previo a dicho control se apreciaban disminuciones de pH en el rango de 4-6, lo que pudo haber afectado la producción de biomasa en el cultivo ya que el pH puede influir en la absorción de nutrientes y la solubilidad del CO<sub>2</sub> en el medio y por ende, en la producción de metabolitos [225].

La concentración para *Chlorella vulgaris* del presente trabajo es más baja en comparación con los resultados de otros investigadores para la misma especie cultivada en aguas residuales también de la industria cervecera que reportan concentraciones de biomasa seca de 0,917 g/L en condiciones de total oscuridad y aireación, mientras que en condiciones de luz, la concentración fue de 0,82 g/L empleando efluentes de la industria cervecera como medio de cultivo; estos resultados indican que la productividad en cultivos aireados con luz y sin luz es de 1,71 % y 3,82 %, respectivamente en comparación con cultivos sin aireación, lo cual manifiesta que el CO<sub>2</sub> del aire actúa como una fuente continua de carbono para los cultivos [53].

Pocos trabajos reportan la productividad volumétrica o específica de *Chlorella vulgaris* cultivada en el agua residual de la industria cervecera; sin embargo, en la revisión bibliográfica se encontró que para *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de la industria cervecera no tratada en condiciones mixotróficas y fotoheterotróficas se encontraron productividades de biomasa de 0,226 g/L·d para las dos condiciones [179]. Para la especie *Chlorella protothecoides* cultivada en el agua residual de la industria cervecera anaeróbicamente tratada, se reporta una productividad de 0,29 ± 0,11 g/L·d [226]. Todos estos valores son mayores a los encontrados en el presente trabajo, y esto puede estar relacionado con el tipo de agua de cultivo que se emplee afectando a los parámetros de crecimiento microalgal.

En cuanto a la tasa específica de crecimiento se reporta que para la especie *Chlorella* sp. se encontró un valor de 0,97 d<sup>-1</sup>, mientras que para *Chlorella vulgaris* (UTEX-265) la tasa específica de crecimiento fue de 0,23 d<sup>-1</sup>, ambas especies cultivadas en medio Tris-acetato-fosfato (medio TAP) [179]. Este último valor es próximo a la tasa de crecimiento específica de *C. vulgaris* en el medio control BBM del presente trabajo. Para la especie *Chlorella* sp. cultivada en aguas residuales municipales, se reporta tasa de crecimiento específica de 0,948 d<sup>-1</sup> [227]. Esto indica que las microalgas crecieron mejor en el medio TAP y en las aguas residuales municipales en comparación con el agua residual cervecera o el medio BBM.

Ninguna de las investigaciones revisadas de otros autores sobre *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de industria cervecera o similares reporta valores de tiempo de duplicación en sus cultivos; sin embargo, en otros tipos de aguas residuales sí es posible encontrar valores de este parámetro; por ejemplo, para *Chlorella vulgaris* cultivada en efluentes de plantas de tratamiento de industria láctea se reportan tiempos de duplicación de 2,89 días para cultivos aireados y 7,73 días en cultivos sin aireación, mientras que la especie *Chlorella sorokiana* en las mismas condiciones de cultivo obtuvo tiempos de duplicación de 2,48 y 6,89 días, respectivamente [228]. Estos valores indican que *C. sorokiana* crece más rápido que *C. vulgaris* para las condiciones mencionadas. En el caso de *C. vulgaris* en la presente investigación doctoral se aprecia que la microalga se duplica más rápido en el AR cervecera, respecto del AR de la industria láctea.

La concentración de biomasa para *Scenedesmus* sp. cultivada en AR cervecera del presente trabajo es menor en comparación con los valores reportados para la misma especie cultivada en medio sintético BG-11 y mezclas de medio sintético BG-11 y agua residual de industria cervecera a diferentes concentraciones del agua residual (25 % v/v, 50 % v/v y 75 % v/v), y para dos concentraciones de CO<sub>2</sub> en el medio (10 % v/v y 20 % v/v). Los resultados muestran que con el medio BG-11 se obtuvo la concentración de biomasa más alta (1,9 g/L), seguida de la combinación de mezclas 25 % v/v del agua residual en cultivos con suministro de 20 % de CO<sub>2</sub> (0,69 g/L) [95]. Pese a que los valores del resto de tratamientos son menores (0,27-0,56 g/L); estos valores reflejan las propiedades de este tipo de agua residual y el beneficio de la adición de CO<sub>2</sub> en cultivos aireados de microalgas.

En otro trabajo publicado en literatura, se cultivó la microalga de estudio en un agua residual de industria cervecera artificial (DQO: 2100 mg/L, NT: 45 mg/L, NH<sub>3</sub>-N: 23 mg/L, PT: 7 mg/L y pH: 6,8); los autores indican que la concentración de biomasa fue de 0,897 g/L tras un cultivo de 10 días con exposición de luz en ciclos de 24:0 h y adición de 15 % de CO<sub>2</sub> [87]. Otros investigadores emplearon la misma especie de microalga cultivada en efluentes anaeróbicamente tratados de la industria cervecera y su control en medio BBM durante 18 días con fines de producción de bioetanol. Se puede observar que tras el tiempo de cultivo, la concentración de biomasa alcanzada por la microalga fue de 1,05 ± 0,10 g/L y 1,26 ± 1,05 g/L para el agua residual y el medio de control, respectivamente [56]. Este último trabajo reporta a su vez una productividad volumétrica de biomasa de 0,06433 g/L-d. Estos valores de biomasa son mayores a la concentración obtenida en el presente trabajo y se asocia a las condiciones de nutrientes, luminosidad, aireación y suministro de CO<sub>2</sub> de cada cultivo; con esto pueden verse opciones para mejorar los cultivos de microalgas si el propósito es la producción de biomasa.

La especie *Scenedesmus obliquus* se cultivó en efluentes anaeróbicamente tratados de industria cervecera en condiciones de aireación ambiental y suministro de 10 % v/v de CO<sub>2</sub>, probando a su vez diferentes tasas de dilución (D) y diferentes tiempos de residencia hidráulicos (TRH). De este estudio se dedujo que el mayor valor de peso seco libre de cenizas fue de  $0,95 \pm 0,07$  g/L para un TRH de 8,7 días y una tasa de dilución de  $0,11$  d<sup>-1</sup> [106]. Para dichas condiciones se reporta una productividad de  $0,109 \pm 0,008$  g/L·d; sin embargo, las condiciones que generaron el mayor valor de la productividad ( $0,217 \pm 0,006$  g/L·d) fueron un TRH de 3,5 días y tasa de dilución de  $0,29$  d<sup>-1</sup>, aunque el peso seco no fue tan alto ( $0,76 \pm 0,02$  g/L).

Aunque los valores de productividad del presente trabajo no sean tan elevados como los de otros investigadores, el propósito de biorremediación se cumplió. Según el uso final que quiera darse a la biomasa obtenida, pueden realizarse modificaciones en las condiciones de cultivo (suministro de CO<sub>2</sub>, tiempos de retención, tasas de dilución, etc.), ya que mejoran notoriamente los valores de peso seco de los trabajos citados, en relación con los resultados del presente trabajo.

En la búsqueda bibliográfica no se encontraron reportes de la tasa específica de crecimiento y el tiempo de duplicación para *Scenedesmus* sp. cultivada en agua de la industria cervecera; sin embargo, otros autores que trabajaron con la misma especie en otro tipo de agua sí presentan resultados para estos parámetros. Por ejemplo, al cultivar la microalga en mezclas de agua residual industrial (después del tratamiento primario de eliminación de sólidos) y agua destilada en concentraciones de 25 %, 50 % y 75 % (sin adición de nutrientes), en cultivos con 10 y 20 % v/v de suministro de CO<sub>2</sub>, se reportan tasas de crecimiento específicas de 0,14; 0,06 y 0,03 d<sup>-1</sup> para cada concentración, respectivamente bajo suministro de CO<sub>2</sub> al 10 % v/v; mientras que cuando se suministró CO<sub>2</sub> al 20 % v/v las tasas de crecimiento específicas fueron 0,15; 0,16 y 0,12 d<sup>-1</sup> para los tres tratamientos [95]; similares a las del presente estudio.

En el presente trabajo, la tasa de crecimiento específica de la microalga de estudio en el agua residual de industria cervecera resultó baja ( $0,1063$  d<sup>-1</sup>) en comparación con el medio de control en BBM ( $3,1140$  d<sup>-1</sup>). Esta diferencia puede estar relacionada con una limitación en el uso del agua residual de la industria cervecera debido a la presencia de color que dificulta la penetración de la luz en estos cultivos, lo que hace que se requiera de largos periodos de cultivos para alcanzar altas concentraciones de biomasa y lípidos, afectando también a la eliminación de nutrientes del medio; esto implica el uso de luz artificial para mejorar esta condición y el uso de otros métodos de tratamiento para mejorar características de color, olor, eliminación de sales y otros nutrientes del agua residual de industria cervecera [50].

Tampoco se encontraron reportes del tiempo de duplicación de la especie *Scenedesmus* sp. en agua residual de la industria cervecera, pero sí de otras especies del género *Scenedesmus* en otros tipos de aguas residuales. La especie *Scenedesmus acuminatus* fue cultivada en agua residual municipal sintética que se preparó con extracto de carne (100 mg/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (3 mg/L), NaCl (8 mg/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (30 mg/L), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (5 mg/L) y peptona (150 mg/L). La microalga se cultivó a diferentes concentraciones del agua residual encontrando los siguientes tiempos de duplicación: 0,136 d a 0 % v/v; 0,132 d a 25 % v/v; 0,129 d a 50 % v/v; 0,143 d a 75 % v/v y 0,155 d a 100 % v/v [229]. Estos valores se encuentran en el rango encontrado en la presente investigación.

Asimismo, las concentraciones de CO<sub>2</sub> en el medio inciden sobre el tiempo de duplicación de las especies; por ejemplo, microalgas del género *Scenedesmus* suelen presentar tiempos de duplicación cercanas a 18 h (0,75 d) en concentraciones en el rango de 10-20 % v/v de CO<sub>2</sub> [230]. Incluso, estudios demuestran que las microalgas del género *Scenedesmus* pueden tolerar mejor la presencia de altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en el medio en comparación con microalgas del género *Chlorella*, las cuales pueden experimentar efectos negativos en el crecimiento, incidiendo negativamente en su potencial biorremediador [231].

Considerando el principio de economía circular que ofrece el uso de biomasa como fuente de energía, en el caso de la biomasa microalgal se requiere realizar diversos ajustes a las etapas del proceso que ayuden a reducir costes energéticos asociados a etapas de cultivo, de separación de la biomasa, secado, etc. En este sentido, el uso de aguas residuales de la industria cervecera sin suministro de nutrientes ayuda a cubrir parcialmente los costes de medios nutritivos que se requieren para potenciar el crecimiento de la biomasa [95,226,232].

#### **Caracterización elemental de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de la industria cervecera**

Se realizó el análisis de la biomasa seca cultivada en el medio de control BBM y en el medio residual de agua de la industria cervecera a nivel elemental y su composición se muestra en la Tabla 4.1.13. Puede apreciarse que para ambas especies la composición elemental de los elementos analizados es muy próxima a la composición del medio de control. Con valores ligeramente mayores para el medio de control por lo que se puede concluir que la composición del medio de cultivo no afecta notablemente a la composición elemental de las microalgas cultivadas.

**Tabla 4.1.13** Composición elemental de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en medio de control BBM y agua residual de la industria cervecera

Elemento	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Scenedesmus</i> sp.	
	BBM	AR cervecera	BBM	AR cervecera
N	2,96	2,43	3,09	2,23
C	48,23	46,12	47,26	49,59
H	7,26	7,34	7,26	7,57
S	0,00	0,39	0,00	0,00
O	26,58	29,44	25,11	29,71

El análisis elemental de las especies de estudio muestra la presencia de C, N, H, S y O; para el caso del azufre se observa que únicamente el cultivo de *Chlorella vulgaris* en el agua residual presentó azufre en su composición. De forma general, la composición elemental es similar entre el medio de control y el agua residual para ambas especies.

En la búsqueda de bibliografía no se encontraron trabajos que reporten el análisis elemental del polvo seco de las microalgas de estudio cultivadas en agua residual de industria cervecera. Un estudio bibliografía reporta que para la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales porcinas el análisis elemental presentó 11,6 % de N; 45,9 % de C; 6,4 % de H y 1,4 % de S, sin reportar valores para oxígeno [158]. Evidentemente se trata de aguas residuales de características fisicoquímicas muy diferentes; sin embargo, la composición elemental hallada es próxima para casi todos los elementos, con excepción del N, habiendo una diferencia importante en el contenido de este elemento en los dos tipos de aguas residuales. La razón de esta diferencia puede tener influencia del contenido de N presente el agua residual de la industria cervecera del presente estudio, el cual estuvo cerca del 6-11 mg/L de nitrógeno amoniacal, mientras que en el agua residual porcina empleada por los autores, el medio de cultivo contenía 86,6 mg/L de nitrógeno amoniacal.

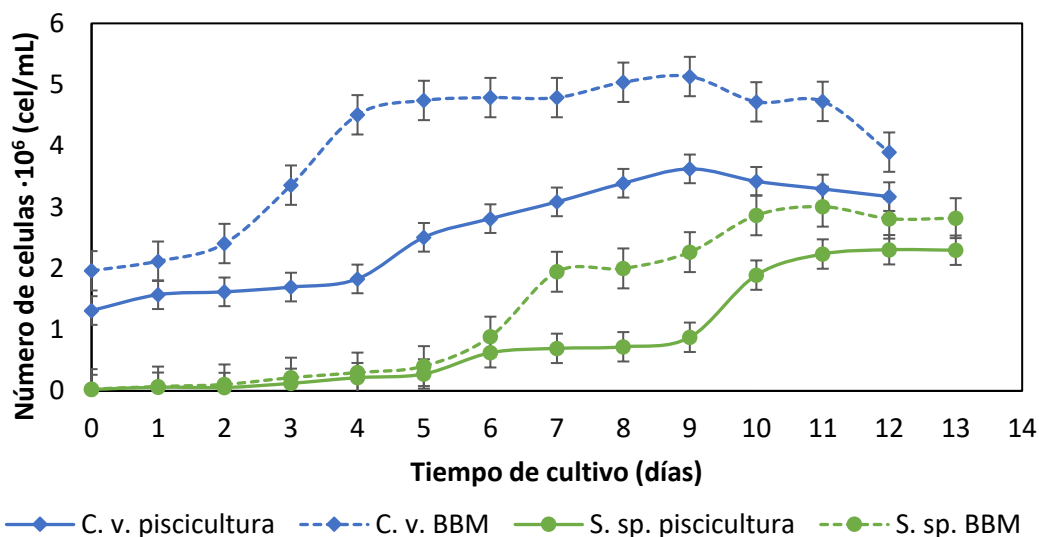
Para la biomasa obtenida a partir del cultivo en agua residual de industria cervecera y con el método de extracción estándar de lípidos totales con la mezcla cloroformo:metanol (1:2 v/v) se cuantificaron  $17,79 \pm 1,57$  % de lípidos para la biomasa seca de *C. vulgaris*; mientras que para la especie *S. sp.*, el contenido de lípidos totales fue de  $19,26 \pm 5,19$  %. Estos valores muestran que, en este tipo de agua residual, la especie *Scenedesmus* sp. acumula más lípidos en comparación con *Chlorella vulgaris*, y esto concuerda con los resultados del crecimiento celular reportados anteriormente.

### c) Agua residual de piscicultura

La Figura 4.1.17 presenta el crecimiento celular para las dos especies de estudio de este trabajo doctoral (los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar). Para *Chlorella vulgaris* durante 12 días de cultivo en el agua residual de piscicultura sin reposición de nutrientes, se observa que el cultivo inicia con una concentración celular de  $1,31 \cdot 10^6 \pm 6,63 \cdot 10^4$  cel/mL, apreciando una fase de adaptación del día 0 al día 4, una fase exponencial desde el día 4 al día 9 con una concentración máxima de  $3,63 \cdot 10^6 \pm 3,54 \cdot 10^5$  cel/mL y una fase de muerte celular que se observó entre los días 9 al 12, con una disminución de la concentración celular hasta  $3,17 \cdot 10^6 \pm 1,55 \cdot 10^5$  cel/mL.

La figura también muestra el crecimiento celular de la misma especie en el medio de control BBM, el cual registró la fase de crecimiento exponencial del día 1 al día 4, una fase estacionaria comprendida entre los días 5-7, encontrando en el día 9 la mayor concentración celular con un valor de  $5,13 \cdot 10^6 \pm 1,44 \cdot 10^5$  cel/mL, y la fase de muerte celular a partir del día 9. Durante los 12 días de cultivo no se realizó reposición de nutrientes. En cada etapa registrada, las concentraciones celulares en el medio control fueron mayores respecto del agua residual de piscicultura. Las variaciones en las fases de crecimiento entre los dos medios de cultivo podrían estar asociados a la composición de los medios de cultivos, así como a pequeñas variaciones registradas en las condiciones climáticas en la ciudad de Quito, donde se encontraban los fotobiorreactores expuestos a la intemperie.

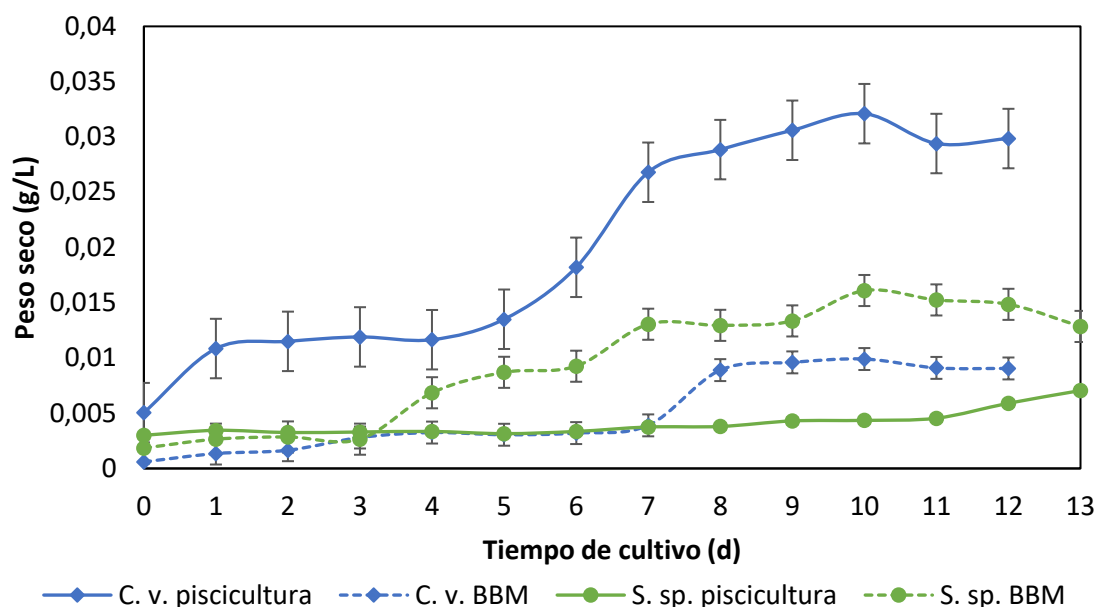
La Figura 4.1.17 también muestra el crecimiento celular de la especie *Scenedesmus* sp. en agua residual de piscicultura y su medio de control BBM durante su cultivo por un tiempo de 13 días. La concentración celular en el agua residual el día 0 fue de  $2,32 \cdot 10^4 \pm 3,2 \cdot 10^3$  cel/mL, mostrando la fase de adaptación entre el día 0-2, y la fase exponencial entre los días 3-6, alcanzando su estado estacionario con una concentración máxima de  $2,23 \cdot 10^6 \pm 1,77 \cdot 10^5$  cel/mL en el día 11; seguidamente se observa que desde el día 12 inicia el periodo de muerte celular. Para el medio de control BBM se aprecia una fase de adaptación al medio similar a la del cultivo en el agua residual de piscicultura, desde el día de la siembra hasta el día 3, y una fase exponencial amplia desde el día 3-7, alcanzando la concentración máxima en el día 11 con un valor de  $3,01 \cdot 10^6 \pm 1,22 \cdot 10^5$  cel/mL, e iniciando el periodo de muerte celular al día 12, para finalizar con una concentración de  $2,82 \cdot 10^6 \pm 3,31 \cdot 10^4$  cel/mL. Tal y como se muestra en la figura, el medio BBM mantuvo mejores valores de concentraciones celulares en comparación con el medio de cultivo de agua residual de piscicultura.



**Figura 4.1.17** Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de piscicultura y su control en medio BBM.

La Figura 4.1.18 muestra ambas especies cultivadas en el AR de piscicultura y en el medio de control BBM (los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar). El peso seco de la especie *C. vulgaris* a lo largo de 12 días de cultivo, inicia con  $0,005 \pm 0,0008$  g/L, del día 1 al día 4 se observa una fase de adaptación y a partir del día 5, la microalga crece de forma exponencial hasta el día 10, alcanzando una concentración de  $0,0321 \pm 0,0021$  g/L. A partir del día 11, el peso se ve afectado, registrando una disminución en su valor hasta  $0,0298 \pm 0,0025$  g/L al finalizar el cultivo. Para el medio de control BBM se observaron menores valores para el peso seco en comparación con los valores obtenidos en el agua residual, iniciando con valores de  $0,0006 \pm 0,000$  g/L al inicio del cultivo y finalizando con registros de peso seco de  $0,0091 \pm 9,19 \cdot 10^{-4}$  g/L. Sin embargo, en ambos cultivos se observa la tendencia de la especie *C. vulgaris* a incrementar su cantidad de biomasa entre los días 6 y 8.

La Figura 4.1.18 también muestra el peso seco de *Scenedesmus* sp. para el AR de piscicultura y el medio de control BBM. El peso inicial en el agua residual fue de  $0,003 \pm 0,0041$  g/mL, mostrando un incremento paulatino y registrando el mayor valor de peso seco el día 13 con un valor de  $0,0071 \pm 0,0004$  g/mL. Para el caso del medio de cultivo control con medio BBM, se aprecia un valor de peso seco el día 0 de  $0,0019 \pm 0,0005$  g/mL, menor al registrado por el medio en agua residual; sin embargo, después del día 3, el medio control presentó valores de peso seco mayores respecto del AR de piscicultura. El máximo valor registrado para el medio control fue de  $0,0161 \pm 0,0011$  g/mL en el día 10. Al finalizar el cultivo en el día 13, se obtuvo una concentración de peso seco de  $0,0129 \pm 0,0002$  g/mL, mostrando siempre mayores valores de peso seco en comparación con el medio de cultivo residual.



**Figura 4.1.18** Peso seco de *Chlorella vulgaris* (C.v.) y *Scenedesmus* sp. (S. sp.) cultivadas en el agua residual de piscicultura y su control en medio BBM.

La Tabla 4.1.14 muestra los resultados de la generación de biomasa y la productividad para ambas especies al final de los cultivos. En el caso de la especie *Chlorella vulgaris* obtenida con agua residual de piscicultura y su control en medio BBM puede apreciarse que el agua residual de piscicultura fue capaz de aportar los nutrientes requeridos para el crecimiento de la microalga generando 1,28 veces más biomasa usando el agua residual, en comparación con el medio de control BBM.

Los resultados del crecimiento celular de la especie *Chlorella vulgaris* muestran que la concentración microalgal en el agua residual de piscicultura fue menor a la obtenida en el control usando el medio BBM; sin embargo, los resultados encontrados en este trabajo son similares a los reportados por otros autores que trabajaron con la misma microalga cultivada en agua residual de tilapia del Nilo, obteniendo una concentración celular de  $4,0 \cdot 10^6$  cel/mL al fortificar el agua residual con 50 % de medio BBM [233]. En otro trabajo se demostró que al cultivar *C. vulgaris* al aire libre y en un medio de cultivo elaborado con agua potable y un fertilizante orgánico con concentraciones de macro y micronutrientes similares a los de un agua residual municipal no tratada, la microalga es capaz de disminuir su fase de adaptación a un rango entre 1 a 3 días, obteniendo una concentración mayor de biomasa [234].



**Tabla 4.1.14** Generación de biomasa y productividad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en el cultivo en agua residual de piscicultura y su control en BBM.

<b>Especie de microalga: <i>Chlorella vulgaris</i></b>		
<b>Parámetro de crecimiento de cultivo</b>	<b>AR piscicultura</b>	<b>BBM</b>
Concentración de biomasa (g/L)	0,5869	0,4585
Productividad volumétrica (g/L·d)	0,0489	0,0382
Productividad específica (d <sup>-1</sup> )	0,0833	0,0833
Tasa de crecimiento específica (μ)	0,1369	0,3139
Tiempo de duplicación (t <sub>b</sub> )(d)	5,0627	2,2084
<b>Especie de microalga: <i>Scenedesmus</i> sp.</b>		
<b>Parámetro de crecimiento de cultivo</b>	<b>Ar piscicultura*</b>	<b>BBM*</b>
Concentración de biomasa (g/L)	0,3891	0,5572
Productividad volumétrica (g/L·d)	0,0299	0,0429
Productividad específica (d <sup>-1</sup> )	0,0769	0,0769
Tasa de crecimiento específica (μ)	0,6042	0,5825
Tiempo de duplicación (t <sub>b</sub> )(d)	1,1472	1,1899

\*Volumen de 50 L para el cultivo en agua residual de piscicultura y de 40 L para el control en medio BBM.

Para el cultivo de *Chlorella vulgaris* en agua residual de piscicultura, el mayor número de células se alcanzó en el día 9. La literatura muestra que esta especie puede crecer hasta el día 8 alcanzando una concentración mayor a  $2,0 \cdot 10^7$  cel/mL estando expuesta a la intemperie en agua residual de cultivo del pez limón, con una duración total de 10 días de cultivo [235]. Por su parte, otros autores resaltan que al cultivar *Chlorella sorokiniana* en un volumen de 5 L empleando aguas residuales municipales puede alcanzarse una concentración mayor a  $8,0 \cdot 10^7$  cel/mL en la fase exponencial [236]; sin embargo, esto puede estar relacionado al volumen total de cultivo, ya que bajos volúmenes pueden facilitar el aprovechamiento de nutrientes y la absorción de luz por parte de la microalga [191]. Las mezclas de aguas residuales y medios de cultivos sintéticos también aportan un crecimiento celular próximo al obtenido en el presente trabajo, pudiendo obtener una concentración de  $4,32 \cdot 10^6$  cel/mL de *C. vulgaris* empleando una mezcla de agua residual (50 % m/m) y medio Conway (50 % m/m) como medio de cultivo [237]. La muerte celular de la microalga en el medio de cultivo de piscicultura fue a los 10 días, aunque autores sugieren que en cultivos batch, el medio es capaz de proveer nutrientes hasta los 15 días [238].

Algunos autores sugieren que el peso seco no es un parámetro eficiente para determinar la composición de la biomasa, pero que puede ser efectivo para registrar la conversión de macronutrientes como C, N y P en biomasa [239]. Con respecto al peso seco de *Chlorella vulgaris*

en este trabajo, se obtuvieron valores superiores para el agua residual de piscicultura frente al medio de control BBM. Esta diferencia podría estar relacionada con ciertos factores como la turbidez del agua residual o la presencia de sólidos suspendidos, células muertas, sedimentos o material orgánico procedente del alimento o heces de los peces [240], a diferencia del medio BBM que no presenta problemas de turbidez o sólidos suspendidos [144].

Considerando que cada investigador realiza variaciones en sus cultivos que lo hacen diferente respecto de otros estudios (medio de cultivo usado, nutrientes disponibles, tiempo de cultivo, fotoperiodos, etc.), no es posible realizar comparaciones directas entre las biomásas y productividades alcanzadas; sin embargo, es posible comparar la productividad específica. En este sentido, la productividad específica del cultivo de *Chlorella vulgaris* en agua residual de piscicultura se encuentra por encima del rango reportado en la literatura para la misma especie cultivada de forma fotótrofa empleando CO<sub>2</sub> como fuente de carbono, el cual varía entre de 0,03-0,04 g/L·d [241]. Sin embargo, el valor de productividad específica de este trabajo es próximo a la reportada en la India con un valor de 0,0744 d<sup>-1</sup> usando distintas cepas de *Chlorella* para la producción de biodiésel [242]. La tasa específica de crecimiento encontrada para la microalga en este trabajo es baja en comparación con lo reportado para la misma especie cultivada en aguas crudas y esterilizadas procedentes de sistemas acuícolas con recirculación, cuyo rango de tasa específica de crecimiento varía entre 0,174- 0,242 d<sup>-1</sup>, siendo mayor para las aguas crudas en comparación con las pretratadas [72].

En cuanto a la tasa específica de crecimiento para la microalga cultivada en el medio de control (BBM), el valor encontrado en este trabajo es mucho más bajo que el reportado por otros autores; los resultados de unos investigadores muestran que se puede mejorar la tasa específica de crecimiento de *C. vulgaris* en medios sintéticos como el BG-11, empleando luz LED blanca e iluminación durante 24 horas (fotoperiodo 24:0) [243]. El tiempo de duplicación ( $t_D$ ) para *C. vulgaris* en este trabajo es alto en comparación al reportado en la literatura para la misma especie cultivada en Medio Conway modificado, cuyos rangos varían entre 1,87-5,77; encontrando que el tiempo de duplicación es más alto cuando se obtienen tasas específicas de crecimiento bajas [244]. Además, la intensidad de luz y los fotoperiodos empleados en los cultivos son parámetros importantes a tener en cuenta si se dese aumentar la productividad de biomasa microalgal [243].

La Tabla 4.1.14 muestra los datos de productividad volumétrica y específica, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual de piscicultura para un volumen de cultivo de 50 L en el fotobiorreactor y su control en medio BBM

en un volumen de 40 L. Dada la diferencia entre los volúmenes de cultivo, no pueden hacerse comparaciones directas; sin embargo, los resultados de producción de biomasa y productividad volumétrica demuestran que el medio BBM tiene un mejor rendimiento frente al medio residual. Asimismo, en ambos medios de cultivos la tasa de crecimiento específica y el tiempo de duplicación son próximos entre sí, corroborando que el agua residual fue óptima para el crecimiento microalgal.

Los resultados de conteo celular y peso seco muestran que *Scenedesmus* sp. tuvo un mayor crecimiento en el medio sintético BBM en comparación con el agua residual de piscicultura y así lo confirman otros autores resaltando que el medio BBM presenta una composición idónea para el crecimiento de microalgas, razón por la cual es uno de los medios de cultivos más empleado; pudiendo alcanzar crecimientos celulares superiores a  $5,0 \cdot 10^6$  cel/mL en solo 7 días de cultivo para la especie *Scenedesmus* sp.[193]. Aunque el agua residual de piscicultura presentó menor crecimiento celular, también es eficaz para el crecimiento de microalgas de la especie de estudio y otras especies ya que el agua residual de la industria acuícola y piscícola se caracteriza por presentar concentraciones altas de demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), nitrógeno, fósforo y carbono, nutrientes principales para el desarrollo microalgal [64,193].

Aguas residuales similares al agua de piscicultura se han usado para la producción de biomasa de *Scenedesmus* sp.; por ejemplo, se ha utilizado aguas residuales de pescadería para cultivos a cielo abierto en el que se alcanzó una concentración celular máxima de  $8,05 \pm 0,55 \cdot 10^6$  cel/mL, concordando con los trabajos de otros autores y el presente trabajo, enfocados a producción de biomasa microalgal en aguas residuales para evitar el uso de grandes volúmenes de agua fresca que encarece los costes de producción [198].

Los resultados del peso seco del presente trabajo indican que el medio de cultivo en medio BBM presenta mejores valores de dicho parámetro en comparación al medio de cultivo en agua residual de piscicultura, teniendo en cuenta que este parámetro calcula la cantidad de biomasa seca producida por unidad de volumen. Autores que han trabajado con la misma especie de microalga han alcanzado una mayor producción de biomasa seca a partir de la modificación de medios comerciales ideales para cultivos de microalgas; por ejemplo, se obtuvieron valores de peso seco de 0,08 g/L en cultivos de 32 días en medio algal modificado incrementando la concentración de C, N y P, para garantizar la presencia de nutrientes durante extensos tiempos de cultivos [245]. Sin embargo, los valores de peso seco encontrados en el presente trabajo son

bajos respecto al peso seco reportado por otros autores que han trabajado con aguas residuales de piscicultura o acuicultura.

En general, la concentración de biomasa reportada para diferentes cepas de microalgas cultivadas en agua de piscicultura varía en un rango amplio de 0,1-1 g/L [89], pero la concentración de biomasa puede verse afectada por el comportamiento biológico de la especie y por las características del agua residual que se emplee para su cultivo. En muchos procesos de piscicultura o acuicultura continental, se realizan con frecuencia intercambios de agua para reducir concentraciones de nutrientes, mantener niveles de oxígeno en agua y de esta forma mejorar el crecimiento de peces, crustáceos y moluscos. Este intercambio de agua frecuente hace que el nivel de P y N sea bajo y deba ser suplementado para el uso de este tipo de agua residual para cultivos de microalgas [89]. Por ello, algunos autores mencionan que el agua residual de piscicultura como tal podría no ser viable para la producción de biomasa microalgal a menos que el agua proceda de sistemas acuícolas de recirculación [246], o sea suplementado con agua residual [247] o con medios de cultivos [248].

En cuanto a la generación de biomasa, los valores encontrados para el cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua residual de piscicultura resultaron ser muy próximos a los reportados en la bibliografía para la producción de biomasa de la misma especie en aguas residuales de pescadería suplementadas con sales de sodio como fuente de carbono, en el que se encontró una biomasa total de 0,41 g/L al emplear concentraciones de 1,6 g/L de bicarbonato de sodio como suplemento al cultivo [89]. También, resultaron muy próximos a los valores reportados en el uso de esta especie de microalga para la biorremediación de aguas residuales salobres de pescadería en el que se reportan valores de  $0,344 \pm 0,024$  g/L [71]. La productividad volumétrica obtenida en el presente estudio también es similar a otros estudios con efluentes de tilapia con valores de productividad volumétrica de 0,026 g/L·d y 0,054 g/L·d para *Scenedesmus* sp. cultivada en 9 L de efluente de tilapia y en medio BBM, señalando que la mayor productividad en el medio BBM se debe al alto contenido de N y P en este medio [213], concordando con los resultados de este trabajo con mejores valores para el medio BBM frente al agua residual de piscicultura.

La productividad específica para la especie cultivada en agua residual de piscicultura es similar al valor reportado en la bibliografía para cultivos de *Scenedesmus* sp. en medio BBM, en el que encontraron una productividad específica de  $0,073$  d<sup>-1</sup> [242]. El parámetro de la tasa de crecimiento específica depende de la fase exponencial de cada cultivo; por lo tanto, es variable entre un cultivo y otro según el comportamiento de la microalga en el medio de cultivo. Por ello,

la tasa de crecimiento específica en cultivos de *Scenedesmus* sp. en aguas de efluentes de tilapias del Nilo, al cabo de 9 días fue de 0,010 d<sup>-1</sup> y de 0,008 d<sup>-1</sup> el medio de control BBM [213], valores menores a los encontrados en el presente estudio.

La tasa de crecimiento específica para la especie *Scenedesmus* sp. del presente estudio es baja en comparación con reportes de otros autores para otras especies del género *Scenedesmus*, tal es el caso de *S. quadricauda* y *S. obliquus*, las cuales presentaron tasas de crecimiento específicas de 2,84 y 2,51, respectivamente; en cultivos con fotoperiodos de 24:0 en luz LED blanca usando medio BG-11 por 16 días; éstos valores superiores pueden estar asociados al uso de volúmenes bajos (1-2 L) y al uso de aire enriquecido con 15 % v/v de CO<sub>2</sub> [243,249]. Algunos autores señalan que el uso de periodos cortos de oscuridad y colores de luz específicos pudieran ser una estrategia para el incremento de biomasa en cultivos de microalgas; sin embargo, en procesos a gran escala, habrá que considerar los gastos asociados a consumos energéticos por exposiciones a la luz en periodos extensos [249].

El tiempo de duplicación de la especie de estudio es bajo también al compararse con otros estudios que reportan valores entre 3,5-6,9 en cultivos de la misma especie en medio F/2 a escala de laboratorio en volúmenes de 1 L [250]; sin embargo, valores altos de tiempos de duplicación están asociados a tasas de crecimiento bajas [244]. Diversos estudios demuestran que la tasa específica de crecimiento y el tiempo de duplicación disminuyen con concentraciones de NaCl superiores a 40 mM; por ello es importante tener en cuenta también el factor de salinidad en cultivos de microalgas ya que este puede afectar a la producción de biomasa [251].

#### **Caracterización elemental de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de piscicultura y medio control BBM**

La biomasa seca cultivada tanto en el medio de control BBM como en el medio de estudio fue analizada a nivel elemental y su composición se muestra en la Tabla 4.1.15. Se aprecia la composición en peso de N, C, H, S y O; observando que para ambas especies la composición elemental de N es mayor en el medio de agua residual; mientras que la composición de C y O son menores en el agua residual; y para H hay diferencias en cada especie. Los resultados de la tabla correspondiente al análisis elemental de las especies de estudio revelan la presencia de C, N, H y O. Los análisis proporcionados mediante dicha técnica indican que no hay S en estas especies y bajo contenido de H y N. Esto concuerda con los resultados de otros autores cuyos análisis elementales solo revelan la presencia de C, N e H [252,253].

**Tabla 4.1.15** Composición elemental de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en medio de control BBM y agua residual de piscicultura

Especie	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Scenedesmus</i> sp.	
	BBM	AR piscicultura	BBM	AR piscicultura
N	2,96	7,76	3,09	6,72
C	48,23	39,51	47,26	44,46
H	7,26	5,94	1,26	6,60
S	0,00	0,00	0,00	0,00
O	26,58	23,90	27,69	25,12

Para la especie *Chlorella vulgaris* puede observarse que el mayor porcentaje corresponde al C, tal y como lo sugieren otros autores, aunque hay variabilidad en los elementos N e H, y la presencia de bajos contenidos de S, que puede estar directamente relacionado al contenido de proteínas de las especies de estudio, lípidos encontrados en la pared celular y al medio de cultivo en el que se desarrollaron las microalgas [96,254]. Para la especie *Scenedesmus* sp. los valores encontrados en el presente trabajo son semejantes a los reportados en la literatura, y al comparar los resultados del medio de control con el medio de cultivo en agua residual de piscicultura puede apreciarse el efecto de este tipo de agua en el incremento del contenido de algunos elementos con N e H [255].

La cantidad de lípidos totales extraídas de la biomasa cultivada en el agua residual de piscicultura con la mezcla estándar cloroformo:metanol (1:2 v/v) fue de  $23,02 \pm 0,56$  % y  $18,56 \pm 2,22$  % para la biomasa seca de *C. vulgaris* y *S. sp.* cultivadas en este tipo de agua residual. Estos valores pueden considerarse la cantidad máxima de lípidos que aporta cada una de las especies de microalgas cultivadas en este tipo de agua y que definirá si puede darse un uso a la biomasa obtenido después de los cultivos con miras de una valorización energética de la misma.

#### 4.2 Aprovechamiento energético de la biomasa obtenida

Tras el tratamiento de las distintas aguas residuales con las dos especies de microalgas estudiadas, se obtiene la biomasa microalgal como producto. Si el propósito es aplicar principios de economía circular y/o valorización energética a todas las corrientes de materiales generadas, una opción es la producción de combustibles sólidos como pellets de biomasa para la generación de calor; combustibles gaseosos como el biogás o líquidos como el biodiésel; este último se produce a partir de los ácidos grasos libres mediante la reacción de esterificación. Por otro lado, en el caso de lípidos saponificables que incluyen triglicéridos, fosfolípidos, glucolípidos y esfingolípidos, la reacción que tiene lugar es la de transesterificación. Así, para cualquiera de

las dos reacciones posibles, resulta un éster que puede ser considerado biodiésel como producto de la reacción [96].

A continuación, se presentan las opciones planteadas para la valorización energética en base a la transformación del contenido lipídico de las biomásas cultivadas. Se plantean dos rutas de aprovechamiento: en primer lugar un método indirecto en el que es necesario una primera etapa de extracción de lípidos totales o ácidos grasos libres de las biomásas generadas durante el cultivo, seguido de una segunda etapa de producción de FAME, y en segundo lugar un método directo en el que en una sola etapa se producen las etapas de extracción de lípidos y la producción de FAME aprovechando que el metanol actúa tanto de disolvente para la extracción de lípidos como de reactivo en la reacción de producción de FAME.

#### **4.2.1 Extracción de lípidos totales de las biomásas obtenida**

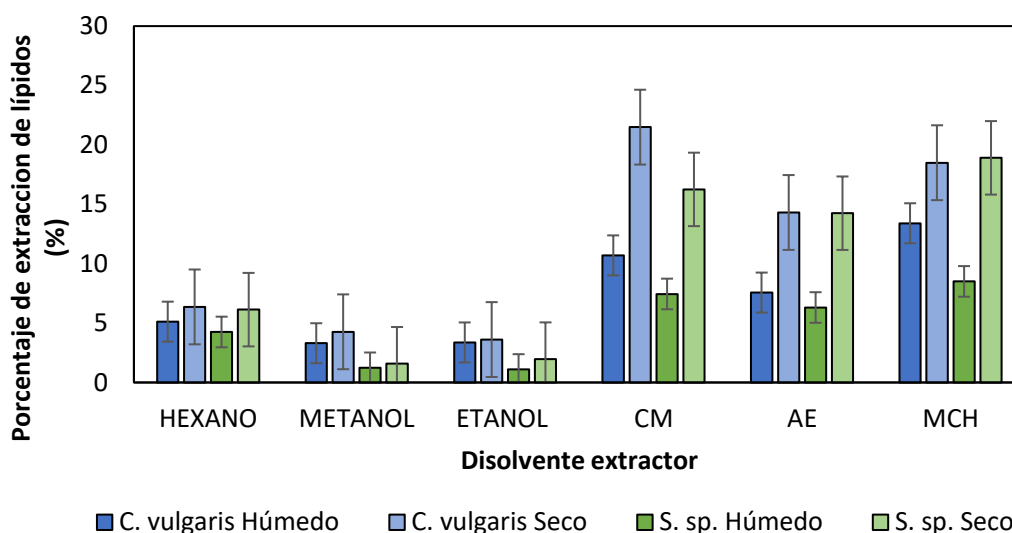
Considerando que no solo hay lípidos en el interior de las microalgas; en este apartado se presentan los resultados del porcentaje de lípidos extraídos de la biomasa cultivada, el cual indicará la cantidad de lípidos que podrá extraerse respecto de la cantidad total de biomasa. Como se indicó en la sección de Metodología, la extracción de lípidos totales se ensayó con seis disolventes: metanol, etanol, acetato de etilo, metilciclohexano, hexano y la mezcla cloroformo:metanol (1:2) (procedimiento estándar según [147]), con el objetivo de evaluar la capacidad de extracción de cada uno de ellos. Todos los procedimientos de extracción se realizaron empleando biomasa seca y biomasa húmeda de las dos especies de microalgas cultivadas en los tipos de aguas residuales de este estudio para comparar si el contenido de lípidos extraíbles varía de una ruta a otra, lo que permitirá evaluar la viabilidad del uso de la biomasa húmeda con fines de ahorro energético al evitar la etapa de secado previa de la biomasa.

Considerando que los valores de porcentajes de lípidos totales del procedimiento estandarizado con la mezcla CM (1:2) arrojarán la mayor cantidad de lípidos posible de la biomasa de microalgas generada; a continuación, se comparan con los resultados del porcentaje de lípidos totales extraídos con el resto de los disolventes indicados en la Metodología.

##### **a) Agua residual de industria porcina**

La Figura 4.2.1 muestra el porcentaje de lípidos totales extraídos de la biomasa húmeda y biomasa seca de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Para *C. vulgaris*, el metilciclohexano mostró la mayor extracción de lípidos con la biomasa húmeda ( $13,40 \pm 0,94$  % de lípidos y  $3,13 \cdot 10^{-4} \pm 1,77 \cdot 10^{-5}$  g/L-d para la productividad). Este valor es superior a la cantidad

máxima de lípidos que puede extraerse con el método estándar; esto sugiere que el MCH puede estar extrayendo otro tipo de sustancias del interior de las células. Sin embargo, de forma general, la cantidad de lípidos extraídos por la vía húmeda es menor, y esta condición está asociada a la interferencia que genera el agua afectando la transferencia de materia entre las fases [96].



**Figura 4.2.1** Porcentaje de extracción de lípidos en biomasa seca y húmeda de *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) y *Scenedesmus* sp. (*S. sp.*) cultivadas en agua residual de industria porcina

Para el caso de la biomasa seca de *C. vulgaris*, el mejor disolvente fue la mezcla cloroformo:metanol (1:2) con  $21,49 \pm 1,65$  % de lípidos totales y  $2,45 \cdot 10^{-4} \pm 1,83 \cdot 10^{-5}$  g/L-d de productividad; el porcentaje de lípidos totales se corresponde con la cantidad máxima de lípidos extraíbles según el método estándar considerando también la alta polaridad de esta mezcla. El hecho de que la mezcla CM (1:2) haya resultado como mejor disolvente coincide con su alta polaridad (0,32), lo cual permite la extracción de compuestos polares presentes en la microalga; sin embargo, la figura muestra que el segundo mejor disolvente extractor fue MCH con  $18,50 \pm 1,83$  % de lípidos extraídos; este disolvente menos polar que la mezcla CM(1:2), extrajo más del 80 % de los lípidos contenidos en la biomasa obtenida. En tercer lugar, se encontró el acetato de etilo con  $14,31 \pm 1,76$  % de lípidos totales extraídos, que representan el 66 % del total de los lípidos que posee la microalga cultivada en el agua residual.

El resto de los disolventes, tanto los más polares (metanol y etanol), como los menos polares (hexano y acetato de etilo), extrajeron menos cantidad de lípidos totales de la microalga, lo que los hace ineficientes para la extracción de lípidos de esta especie bajo las condiciones de cultivo del presente estudio. Esta ineficiencia de los disolventes de alta polaridad se asocia al hecho de



que durante el procedimiento de extracción de lípidos se realizan lavados con agua, y por la afinidad entre el agua y los alcoholes, se pierde una parte de los lípidos saponificables; por ello se refleja un menor porcentaje de extracción con los alcoholes [256].

Para la especie *Scenedesmus* sp., la biomasa seca presentó mejores resultados en comparación con la biomasa húmeda, y los mejores disolventes fueron: metilciclohexano (18,91 % y  $2,152 \cdot 10^{-4}$  g/L-d), la mezcla cloroformo:metanol (1:2) (16,25 % y  $1,855 \cdot 10^{-4}$  g/L-d) y acetato de etilo (14,25 % y  $1,624 \cdot 10^{-4}$  g/L-d). Considerando la mezcla disolvente estándar[CM (1:2)], el porcentaje de lípidos extraíbles máximo sería de 16,25 %; sin embargo, el metilciclohexano está extrayendo algo más, que pudiera tratarse de lípidos insaponificables o compuestos no lipídicos (polisacáridos, proteínas, etc.) que aportan peso a la muestra afectando los valores de lípidos totales extraídos [256]. Para la biomasa húmeda, los porcentajes de lípidos extraíbles resultaron muy bajos respecto de la biomasa seca, estando asociada a la interferencia que causa la presencia de agua durante la extracción, lo cual resulta ineficiente si el propósito se enfoca en la extracción de lípidos con miras a las producción de biocombustibles a escala piloto o industrial [257].

Para la especie *Chlorella vulgaris*, la productividad total de lípidos a partir de biomasa seca fue de 0,014 g/L-d y la productividad específica fue de  $0,091 \text{ d}^{-1}$ , mientras que para la biomasa húmeda la productividad total de lípidos fue de 0,028 g/L-d y la productividad específica fue de  $0,091 \text{ d}^{-1}$ . Para la especie *Scenedesmus* sp., la productividad total de lípidos y productividad específica para la extracción a partir de biomasa seca fue de 0,01367 g/L-d y  $0,091 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente; mientras que empleando biomasa húmeda la productividad total de lípidos y productividad específica fue de 0,0279 g/L-d y  $0,091 \text{ d}^{-1}$ . En función de las productividades, se confirma que es más eficiente la obtención de lípidos a partir de la especie *C. vulgaris* en el cultivo en ARFP.

La Tabla 4.2.1 muestra los valores de productividad volumétrica de lípidos para cada uno de los disolventes extractores en ambas microalgas. Para *C. vulgaris*, los valores más altos de productividad empleando biomasa seca se obtuvieron para la mezcla cloroformo: metanol (1:2) ( $2,45 \cdot 10^{-4}$  g/L-d); seguido metilciclohexano ( $2,11 \cdot 10^{-4}$  g/L-d), y en tercer lugar el valor de productividad del acetato de etilo ( $1,63 \cdot 10^{-4}$  g/L-d). Seguidamente se encontraron hexano, metanol y etanol con valores muy bajos de lípidos y productividad lipídica.

**Tabla 4.2.1** Productividad volumétrica de lípidos para biomasa seca y húmeda de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria porcina.

<b><i>Chlorella vulgaris</i></b>		
<b>Productividad volumétrica de lípidos (g/L·d)</b>		
<b>Disolvente</b>	<b>Biomasa seca</b>	<b>Biomasa húmeda</b>
Cloroformo: metanol (1:2)	$2,45 \cdot 10^{-4}$	$2,45 \cdot 10^{-4}$
Hexano	$7,25 \cdot 10^{-5}$	$1,19 \cdot 10^{-4}$
Acetato de etilo	$1,63 \cdot 10^{-4}$	$1,78 \cdot 10^{-4}$
Metilciclohexano	$2,10 \cdot 10^{-4}$	$3,13 \cdot 10^{-4}$
Metanol	$4,85 \cdot 10^{-5}$	$7,57 \cdot 10^{-5}$
Etanol	$4,11 \cdot 10^{-5}$	$7,69 \cdot 10^{-5}$
<b><i>Scenedesmus sp.</i></b>		
<b>Productividad volumétrica de lípidos (g/L·d)</b>		
<b>Disolvente</b>	<b>Biomasa seca</b>	<b>Biomasa húmeda</b>
Cloroformo: metanol (1:2)	$1,85 \cdot 10^{-4}$	$1,73 \cdot 10^{-4}$
Hexano	$6,99 \cdot 10^{-5}$	$1,01 \cdot 10^{-4}$
Acetato de etilo	$1,62 \cdot 10^{-4}$	$1,47 \cdot 10^{-4}$
Metilciclohexano	$2,15 \cdot 10^{-4}$	$1,95 \cdot 10^{-4}$
Metanol	$1,80 \cdot 10^{-5}$	$2,88 \cdot 10^{-4}$
Etanol	$2,24 \cdot 10^{-5}$	$2,53 \cdot 10^{-4}$

La productividad volumétrica para la biomasa húmeda de *C. vulgaris* fue menor, siendo el metilciclohexano el mejor disolvente extractor ( $3,13 \cdot 10^{-4}$  g/L·d); en segundo lugar, se encuentra la mezcla cloroformo: metanol (1:2) ( $2,45 \cdot 10^{-4}$  g/L·d), y el tercer lugar lo ocupa el acetato de etilo ( $1,78 \cdot 10^{-4}$  g/L·d). Finalmente, los porcentajes más bajos de extracción y productividades corresponden a hexano, etanol y metanol. Los valores de mayores productividades de lípidos coinciden con los valores de los mejores disolventes extractores, demostrando una vez más el efecto de la polaridad de las sustancias químicas.

Existe poca bibliografía sobre el cultivo de microalgas en agua de industria porcina; por ello, solo es posible comparar los resultados de la presente tesis doctoral con los de otros autores que emplearon aguas residuales procedentes de alguna actividad porcina. Con relación a la biomasa seca, la mezcla cloroformo:metanol (1:2) se comporta como el mejor agente extractor de lípidos, similar a los resultados de otros investigadores que obtuvieron 15,2 % de lípidos extraídos con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) a partir de biomasa seca de la misma especie cultivada en agua residual procedente de una granja de cría de cerdos. El pretratamiento del agua residual fue similar al empleado en el presente estudio con filtración y esterilización por autoclave [158]. El porcentaje de lípidos extraídos en base seca se encuentra dentro del rango de valores aceptables para la obtención de biocombustibles a escala piloto e industrial (20-40 %) [219,258].

En el estudio de Abou-Shanab et al., (2013), la microalga *Chlorella vulgaris* se cultivó durante 20 días en efluentes de aguas residuales de pocilgas biológicamente tratada reportando un contenido de lípidos de  $29 \pm 1,7$  % y productividad de  $0,21 \pm 0,02$  g/L al emplear cloroformo:metanol (1:2) como disolvente extractor [43], un valor mayor al del presente estudio que puede estar asociado a las características fisicoquímicas del cultivo a escala de laboratorio. Sin embargo, en la actualidad el uso de cloroformo como disolvente se hace con fines de control pero no es recomendado como disolvente en el procesamiento de biomasa de microalgas en una biorrefinería dada su alta toxicidad e impactos ambientales asociados a la presencia de cloro [259].

El valor obtenido de productividad total de lípidos a partir de biomasa seca y húmeda de *Chlorella vulgaris* con los mejores disolventes orgánicos (metilciclohexano, cloroformo: metanol (1:2) y acetato de etilo), es más bajo en comparación con las investigaciones de Qin et al., (2014) quienes emplearon aguas residuales de la industria láctea tratadas con cloro y luz UV como medio de cultivo, cuya productividad estuvo en el rango desde  $0,027$  g/L-d hasta  $0,051$  g/L-d, empleando la mezcla hexano: dietil éter (1:1) como disolvente extractor [260].

Paralelamente al crecimiento microalgal, se lleva a cabo la formación de biomoléculas como lípidos, proteínas y carbohidratos; y para el caso de los lípidos extraídos a partir de biomasa seca de *Scenedesmus* sp. cultivada en ARFP, se aprecia que los valores encontrados son menores a los reportados por otros autores que emplearon la misma especie de microalga cultivada en aguas residuales de naturaleza porcina u otro tipo de agua residual. Jia et al., (2016) cultivaron la especie *Scenedesmus* sp. en aguas residuales porcinas procedentes de la digestión anaerobia, y el contenido de lípidos extraídos varió entre 24,83-31,66 % usando como disolvente una mezcla de metanol-dimetilsulfóxido, éter dietílico y hexano (1:1:1, v/ v/v) [221]. Esta diferencia de valores puede deberse al uso de una mezcla de disolventes con diferentes polaridades que mejoran la extracción de grasas.

Otras especies del género *Scenedesmus* han sido cultivadas en aguas porcinas, tal es el caso de la especie *Scenedesmus obliquus* que fue cultivada durante 20 días en efluentes de agua residual porcina biológicamente tratadas, reportando valores de contenido lipídico y productividad de lípidos de  $31 \pm 0,8$  % y  $0,24 \pm 0,03$  g/L-d respectivamente, con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) [43]. Como se puede apreciar, estos valores son superiores a los reportados en el presente estudio. Sacristán De Alva et al., (2013) realizaron la extracción de lípidos con la misma microalga cultivada en agua residual municipal, reportando un contenido de lípidos entre 12,7-28,3 % usando la mezcla cloroformo: metanol (2:1) [261]; dichos valores

son próximos a los obtenidos con la mezcla cloroformo: metanol (1:2) en el actual estudio para la biomasa seca (16,25 %).

Otros estudios respaldan que las microalgas cultivadas en aguas residuales porcinas presentan propiedades favorables para la producción de biocombustibles, no solo por su alta tasa de crecimiento, sino también su alto contenido de lípidos y carbohidratos. Tomando en cuenta los principios de economía circular, es posible emplear los residuos de biomasa de microalgas generados del proceso de extracción de lípidos, que serán ricos en carbohidratos y proteínas principalmente, como materia prima para la producción de biofertilizantes [37], o para alimentar procesos de fermentación anaerobia. Por otra parte, el CO<sub>2</sub> generado puede emplearse para estimular tanto el crecimiento de las microalgas, como la acumulación de lípidos [218,219].

El contenido de lípidos extraíbles de las microalgas varía de una especie a otra y depende de las características del medio de cultivo y de factores externos que pueden afectar la producción de lípidos [221]. La falta de nutrientes, en especial de nitrógeno en su fase estacionaria, generan estrés en las microalgas y esto puede ayudar en la acumulación de un 15 % más de lípidos [261]. El fósforo es otro nutriente importante en el metabolismo energético de las microalgas y su concentración en el medio de cultivo también puede afectar el contenido de lípidos ya que es convertido en ortofosfatos inorgánicos como ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP, lípidos, etc. [262]. Como se apreció en la sección de cultivo, aún había contenido de NT y PT en el medio previo a la cosecha por lo que no se presentó una verdadera situación de estrés que indujera a una mayor cantidad de lípidos, y consecuentemente un mayor porcentaje de lípidos extraíbles en la biomasa de microalgas cultivadas.

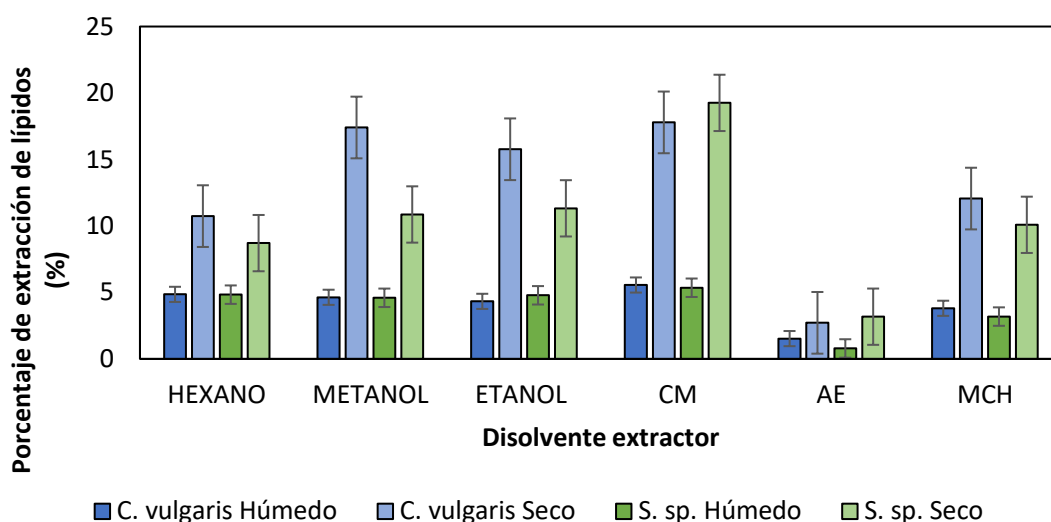
El contenido de lípidos de las microalgas en base seca generalmente varía entre el 20-40 % [257]. La polaridad del disolvente es un parámetro importante a considerar en los procesos de obtención de lípidos de microalgas; generalmente, cuanto mayor es la polaridad del disolvente, mayor es el rendimiento en la extracción de lípidos, pero en el caso de los lípidos no polares como ácidos grasos libres y lípidos neutros, pueden ser disueltos en disolventes con menor polaridad como el metilciclohexano [121,263].

La bibliografía muestra el uso de diversos disolventes y mezclas de ellos con diferentes polaridades para mejorar el rendimiento en la extracción de lípidos; en este sentido, los disolventes orgánicos no polares o de menor polaridad), pueden atravesar a través de la membrana celular de las microalgas y alcanzar el citoplasma, lugar en donde se encuentran los lípidos de microalgas [150] [264]. También en la bibliografía algunos autores reportan que los

mejores disolventes para la extracción de lípidos totales son aquellos constituidos por mezclas de disolventes polares y no polares, ya que los lípidos son extraídos por complejos de proteína-lípido en el disolvente polar, y posteriormente los lípidos son disueltos en el disolvente no polar [265].

### b) Agua residual de industria cervecera

En la Figura 4.2.2 se muestra el porcentaje de lípidos totales extraídos de la biomasa húmeda y biomasa seca de la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de la industria cervecera. Como se puede observar, para la biomasa húmeda el rango de lípidos extraídos estuvo entre 1-6 %, siendo la mezcla cloroformo:metanol (1:2) el disolvente que conduce a una mayor extracción de lípidos ( $5,56 \pm 1,22$  %), como era de esperarse conforme al procedimiento de extracción estándar de lípidos.



**Figura 4.2.2** Porcentaje de extracción de lípidos en biomasa seca y húmeda de *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) y *Scenedesmus* sp. (*S. sp.*) cultivadas en agua residual de la industria cervecera

Para la biomasa seca el rango de extracción fue mayor y estuvo entre 2-18 %, donde el mejor disolvente fue la mezcla cloroformo:metanol (1:2) con  $17,79 \pm 1,57$  % de lípidos. La productividad total de lípidos a partir de biomasa seca fue de 0,011 g/L·d y la productividad específica fue de  $0,071 \text{ d}^{-1}$ , mientras que para la biomasa húmeda los valores de productividad total de lípidos fue 0,024 g/L·d y la productividad específica fue de  $0,074 \text{ d}^{-1}$ .

Considerando que con el disolvente extractor estándar [CM (1:2)] la cantidad máxima de lípidos extraíbles es de 17,79 % a partir de la biomasa seca, puede apreciarse que el metanol y etanol; alcoholes empleados como disolventes, fueron capaces de extraer la mayor parte de los lípidos totales de la microalga (17,40 % y 15,77 %, respectivamente), esto está asociado a la alta

polaridad de estos alcoholes; sin embargo, por su afinidad con el agua, durante los lavados del proceso de extracción, puede perderse una fracción de lípidos. Los alcoholes también pueden extraer compuestos no lipídicos que afecten el porcentaje de lípidos extraíbles. El resto de los disolventes recuperó menos de la mitad de la cantidad de lípidos totales disponibles, y esto puede estar relacionado a que sus bajas polaridades los hace inefficientes para la extracción de lípidos polares; aunque pueden extraer lípidos neutros. Este mismo comportamiento se aparecía para la biomasa húmeda, en la que solo sería posible extraer un máximo de 5,56 % según el método estándar, y ambos alcoholes se acercan muy bien al valor máximo de porcentaje de lípidos extraíbles.

**Tabla 4.2.2** Productividad volumétrica de lípidos para biomasa seca y húmeda de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de la industria cervecera

<b><i>Chlorella vulgaris</i></b>		
<b>Productividad volumétrica de lípidos (g/L·d)</b>		
<b>Disolvente</b>	<b>Biomasa seca</b>	<b>Biomasa húmeda</b>
Cloroformo: metanol (1:2)	$7,98 \cdot 10^{-5}$	$5,23 \cdot 10^{-5}$
Hexano	$4,82 \cdot 10^{-5}$	$4,65 \cdot 10^{-5}$
Acetato de etilo	$1,22 \cdot 10^{-5}$	$1,40 \cdot 10^{-5}$
Metilciclohexano	$5,40 \cdot 10^{-5}$	$4,35 \cdot 10^{-5}$
Metanol	$7,83 \cdot 10^{-5}$	$4,43 \cdot 10^{-5}$
Etanol	$7,05 \cdot 10^{-5}$	$4,05 \cdot 10^{-5}$
<b><i>Scenedesmus</i> sp.</b>		
<b>Productividad volumétrica de lípidos (g/L·d)</b>		
<b>Disolvente</b>	<b>Biomasa seca</b>	<b>Biomasa húmeda</b>
Cloroformo: metanol (1:2)	$1,01 \cdot 10^{-4}$	$5,86 \cdot 10^{-5}$
Hexano	$4,62 \cdot 10^{-5}$	$5,40 \cdot 10^{-5}$
Acetato de etilo	$1,67 \cdot 10^{-5}$	$8,39 \cdot 10^{-5}$
Metilciclohexano	$5,28 \cdot 10^{-5}$	$4,27 \cdot 10^{-5}$
Metanol	$5,78 \cdot 10^{-5}$	$5,13 \cdot 10^{-5}$
Etanol	$5,96 \cdot 10^{-5}$	$5,22 \cdot 10^{-5}$

La Tabla 4.2.2 muestra los valores de la productividad volumétrica para los lípidos extraídos en biomasa seca y húmeda de cada uno de los disolventes extractores. Para *C. vulgaris* con biomasa seca los mayores valores de productividad de lípidos se obtuvieron para la mezcla cloroformo: metanol (1:2); en segundo lugar, el metanol, y en tercer lugar para el etanol; este comportamiento se complementa con los porcentajes de extracción de lípidos mencionados anteriormente gracias a las polaridades de los disolventes. Los mayores valores de productividades volumétricas de la biomasa húmeda se alcanzaron con la mezcla

cloroformo:metanol (1:2) ( $5,23 \cdot 10^{-5}$  g/L-d); en segundo lugar, se encuentra el hexano ( $4,65 \cdot 10^{-5}$ ), seguido de metanol ( $4,43 \cdot 10^{-5}$  g/L-d), conforme a la extracción de lípidos de la biomasa húmeda. De forma general se observa que la cantidad de lípidos extraídos en la biomasa seca es mayor en comparación con los valores de la biomasa húmeda; lo cual es de esperarse ya que es el inconveniente que causa la presencia de agua en el medio.

A partir de la biomasa de *Scenedesmus* sp. también se realizó la extracción de lípidos totales (Figura 4.2.2); con productividad volumétrica específica de 0,0127 g/L-d y 0,0833 d<sup>-1</sup>, respectivamente para la biomasa seca. Con la biomasa húmeda la productividad total de lípidos y productividad específica fue de 0,0276 g/L-d y 0,083 d<sup>-1</sup>. También se determinó la productividad volumétrica de cada uno de los disolventes empleados en este estudio (Tabla 4.2. B). La biomasa seca presentó mejores resultados en el porcentaje de lípidos totales extraíbles en comparación con la biomasa húmeda, y los mejores disolventes fueron: la mezcla cloroformo:metanol (1:2) (19,26 % y  $1,01 \cdot 10^{-4}$  g/L-d), etanol (11,33 % y  $5,96 \cdot 10^{-5}$  g/L-d) y metanol (10,86 % y  $5,78 \cdot 10^{-5}$  g/L-d); los disolventes de mayor polaridad. Nuevamente los alcoholes son capaces de extraer la mayor parte del porcentaje de lípidos totales presentes en la biomasa. Para la biomasa húmeda, los tres mejores disolventes fueron la mezcla cloroformo:metanol (1:2), etanol y metanol pero el porcentaje de lípidos resultó menor al 6 % [257].

En la búsqueda bibliográfica se encontró el trabajo de Farooq et al., (2013) en el que se empleó la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX-265 para su cultivo por 9 días en efluentes de aguas residuales de industria cervecera con un DQO entre 2000-3000 mg/L; el agua fue filtrada y autoclavada previo al cultivo. La obtención de lípidos se realizó a partir de biomasa liofilizada usando la mezcla cloroformo:metanol (2:1) según el método de Folch y encontrando un contenido de lípidos de 18 % y productividad de lípidos de 0,02682 g/L-d. En este mismo estudio y con las mismas características se cultivó la especie *Chlorella* sp., encontrando contenido de lípidos de 10 % y productividad de lípidos de 0,0088 g/L-d [179]. Estos resultados son próximos al del presente estudio, y las pequeñas variaciones porcentuales pueden estar asociadas a las características del cultivo a escala de laboratorio y la diferente relación de la mezcla de disolvente usada.

Otras especies del género *Chlorella* también se han estudiado en aguas residuales de la industria cervecera con fines diversos que incluyen el estudio de sus lípidos. La especie *Chlorella sorokiniana* UTEX1602 se cultivó durante 10 días en un agua residual artificial que simulaba las características fisicoquímicas de un efluente cervecero (DQO: 2100 mg/L, NT: 45 mg/L, NH<sub>3</sub>-N: 23 mg/L y PT: 7 mg/L.d). Su contenido de lípidos se obtuvo a partir de biomasa liofilizada y la

mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v) encontrando porcentaje y productividad de lípidos de 21,12 % y 0,0206 g/L·d, respectivamente [87]. De manera análoga, en otro estudio se cultivaron las especies *Chlorella* sp. L166 y *Chlorella* sp. UTEX1602 durante 10 días en un agua residual artificial que simulaba los parámetros fisicoquímicos de un agua residual de cervecería ( DQO: 2100 mg/L, NT: 45 mg/L, NH<sub>3</sub>-N: 23 mg/L, PT: 7 mg/L.d y pH: 6,8). Los pellets de biomasa se liofilizaron y la extracción de lípidos se realizó empelando la mezcla cloroformo:metanol (2:1) v/v ; para este estudio se reportan porcentaje y productividad de lípidos de 26 % y 0,040 g/L·d para *Chlorella* sp. L166 y 32,5 % y 0,048 g/L·d, para *Chlorella* sp. UTEX1602, respectivamente [184]. Todos estos valores son cercanos a los encontrados en el presente trabajo doctoral para *C. vulgaris*; nuevamente estas diferencias en porcentajes y productividades en comparación con los valores obtenidos en el presente trabajo pueden estar asociados a la mezcla empleada para la obtención de lípidos y condiciones intrínsecas del cultivo.

Otros investigadores han empleado la microalga *Scenedesmus* sp. para su estudio en cultivos con aguas de la industria cervecera, y aunque principalmente estos estudios se hacen con fines de biorremediación, algunos realizaron la extracción de lípidos y determinación de su productividad; por ejemplo, en un estudio publicado en el que se cultivó esta microalga en un agua residual procedente de una industria cervecera (DQO: 2730 mg/L, NT: 28,03 mg/L, NH<sub>3</sub>-N: 0,439 mg/L, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>: 33,92 mg/L.d y pH: 7,35) durante 20 días, se realizó la extracción de lípidos a partir de pellets de biomasa liofilizados empleando la mezcla cloroformo:metanol:agua (2:2:1, v/v/v) encontrando porcentaje de lípidos del 28 % [58]. En otro estudio publicado para esta especie cultivada en agua residual artificial de industria cervecera (DQO: 2100 mg/L, NT: 45 mg/L, NH<sub>3</sub>-N: 23 mg/L y PT: 7 mg/L.d) , se extrajo su contenido de lípidos a partir de biomasa liofilizada y la mezcla cloroformo:metanol (2:1) v/v encontrando porcentaje y productividad de lípidos de 21,53 % y 0,01941 g/L·d, respectivamente [87]. Estos valores son cercanos a los encontrados para el AR de industria cervecera en la presente investigación.

Nutrientes como N (en deficiencia) y P son importantes para mejorar la acumulación de lípidos [261] [262]. Los resultados de otros autores sugieren que incrementos en las concentraciones de CO<sub>2</sub> en el medio estimula la actividad fotosintética de las microalgas y esto a su vez mejora el porcentaje de lípidos y carbohidratos en la biomasa microalgal. Exposiciones de aireación hasta 6 h/d en los cultivos incrementó el porcentaje y productividad de lípidos, mientras que aireaciones más prologadas (> a 9 h/d) disminuyeron el valor de estos parámetros por acidificación del medio [87].

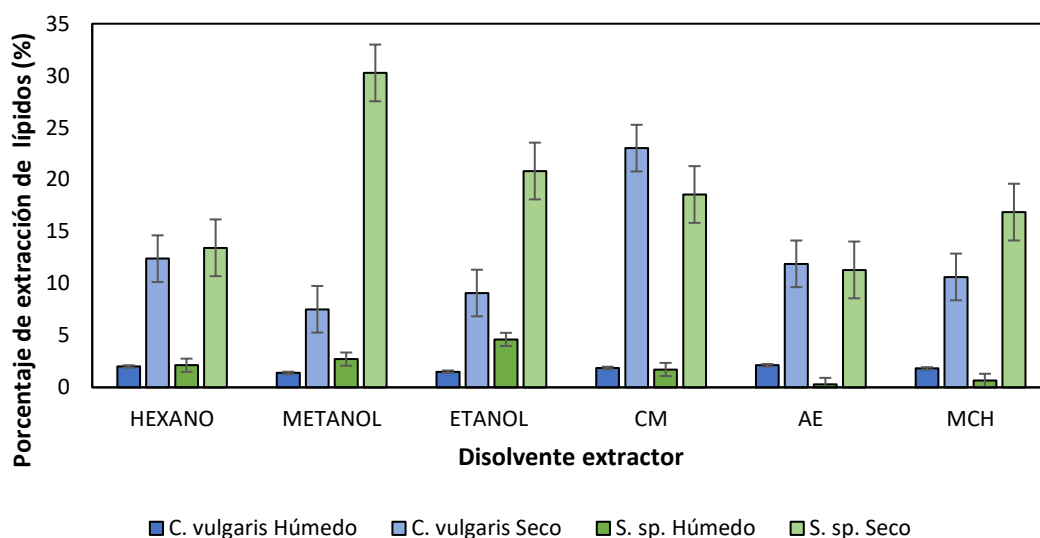


Otros estudios respaldan que las microalgas cultivadas en efluentes cerveceros presentan propiedades favorables no solo para la biorremediación y biofijación de CO<sub>2</sub>, sino para la producción de bioenergía, comida animal y fertilizantes, por su alta tasa de crecimiento, su alto contenido de lípidos y carbohidratos [106].

Después de eliminar más del 50 % de NT y PT del medio, las microalgas además generaron cerca de un 20 % de lípidos extraíbles. Evidentemente, se requieren mejoras en los cultivos para aumentar el porcentaje de lípidos aprovechables con fines de valorización energética, pero puede evidenciarse que el tratamientos de aguas residuales basados en microalgas y el uso posterior de la biomasa para la obtención de energía u otro bioproductos se consideran como una plataforma viable para la economía circular en las biorrefinerías de microalgas [60].

### c) Agua residual de piscicultura

La Figura 4.2.3 muestra los porcentajes de lípidos totales extraíbles para biomasa seca y húmeda de ambas especies de microalgas cultivadas en agua residual de piscicultura con seis disolventes extractores. La productividad total de lípidos extraídos a partir de biomasa seca fue de 0,0126 g/L·d, mientras que la productividad específica fue de 0,0214 d<sup>-1</sup>.



**Figura 4.2.3** Porcentaje de extracción de lípidos en biomasa seca y húmeda de *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) y *Scenedesmus sp.* (*S. sp.*) cultivadas en agua residual de piscicultura.

La Figura 4.2.3 y la Tabla 4.2.3 de forma general muestran que la cantidad de lípidos extraídos en biomasa seca es mayor en comparación con los valores de la biomasa húmeda, al igual que la productividad. Considerando el disolvente del método estándar [CM (1:2)], se aprecia que el porcentaje de lípidos extraíbles de la biomasa seca de la microalga *C. vulgaris* es próximo al 23

%; sin embargo, hexano ( $12,39 \pm 2,96$  %) y acetato de etilo ( $11,89 \pm 1,11$  %), son otras opciones de disolventes capaces de extraer aproximadamente la mitad del porcentaje de lípidos totales disponibles.

**Tabla 4.2.3** Productividad volumétrica de lípidos para biomasa seca y húmeda de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de piscicultura

<b><i>Chlorella vulgaris</i></b>		
<b>Productividad volumétrica de lípidos (g/L·d)</b>		
<b>Disolvente</b>	<b>Biomasa seca</b>	<b>Biomasa húmeda</b>
Cloroformo: metanol (1:2)	$2,40 \cdot 10^{-04}$	$1,02 \cdot 10^{-04}$
Hexano	$1,31 \cdot 10^{-04}$	$1,08 \cdot 10^{-04}$
Acetato de etilo	$1,24 \cdot 10^{-04}$	$1,12 \cdot 10^{-04}$
Metilciclohexano	$1,12 \cdot 10^{-04}$	$9,87 \cdot 10^{-05}$
Metanol	$7,86 \cdot 10^{-05}$	$7,44 \cdot 10^{-05}$
Etanol	$9,50 \cdot 10^{-05}$	$8,02 \cdot 10^{-05}$
<b><i>Scenedesmus</i> sp.</b>		
<b>Productividad volumétrica de lípidos (g/L/d)</b>		
<b>Disolvente</b>	<b>Biomasa seca</b>	<b>Biomasa húmeda</b>
Cloroformo: metanol (1:2)	$2,86 \cdot 10^{-04}$	$5,29 \cdot 10^{-05}$
Hexano	$2,08 \cdot 10^{-04}$	$7,35 \cdot 10^{-05}$
Acetato de etilo	$1,75 \cdot 10^{-04}$	$9,54 \cdot 10^{-06}$
Metilciclohexano	$1,37 \cdot 10^{-04}$	$1,55 \cdot 10^{-05}$
Metanol	$4,66 \cdot 10^{-04}$	$8,36 \cdot 10^{-05}$
Etanol	$3,22 \cdot 10^{-04}$	$1,42 \cdot 10^{-04}$

Para la misma especie *C. vulgaris*, el porcentaje de lípidos extraído para la biomasa húmeda fue menor al 3 %, siendo el acetato de etilo el mejor disolvente extractor (2,13 %), en segundo lugar, se encuentra el hexano (2,01 %) y el tercer lugar lo ocupa la mezcla cloroformo: metanol (1:2) (1,87 %); demostrando cómo disminuye la capacidad de extracción de un disolvente por la presencia de agua en la muestra.

En cuanto a los valores de la productividad volumétrica para los lípidos extraídos en biomasa seca y húmeda, se aprecian mejores resultados para la biomasa seca en comparación con la biomasa húmeda, y en orden decreciente, los dos mejores valores de productividad para la biomasa seca corresponden a los disolventes CM (1:2) y hexano; mientras que para la biomasa húmeda los valores más altos de productividad se obtuvieron con acetato de etilo y hexano, concordando con los resultados de los porcentajes de lípidos extraídos.

En particular en este tipo de agua residual se obtuvieron mejores porcentajes de lípidos y productividades con los disolventes con menores valores de polaridad; que tienen especial afinidad para la extracción de lípidos neutros y compuestos moderadamente hidrófobos como

los ácidos grasos [256]. Sin embargo, desde el punto de vista ambiental, el disolvente acetato de etilo es más respetuoso con el medioambiente en comparación con los disolventes clorados y el propio hexano que cada vez son menos recomendados si se desea trabajar con conceptos de industrias “verdes”.

De manera análoga a la especie anterior, se realizó la obtención de lípidos totales para la especie *Scenedesmus* sp. Para esta microalga, la productividad total de lípidos y la productividad específica fue de 0,0093 g/L·d y 0,076 d<sup>-1</sup>, respectivamente. La Figura 4.2.3 muestra que el porcentaje de lípidos máximo extraído de la biomasa seca de la especie *Scenedesmus* sp., a partir del disolvente CM(1:2) es próxima al 19 %; sin embargo, los alcoholes empleados como disolventes, metanol y etanol extrajeron 30,26 % y 20,82 % de los lípidos totales disponibles, respectivamente; superando la capacidad de extracción de lípidos disponibles en la biomasa del disolvente extractor del método estándar. Como se explicó anteriormente, éstos alcoholes son sustancias polares y tienen la capacidad de extraer lípidos polares de naturaleza neutra, ácida y básica; sin embargo, también pueden extraer impurezas no lipídicas que afecten el peso del porcentaje de lípidos [256]; esto explica sus valores superiores respecto del disolvente estándar [CM (1:2)].

La obtención de lípidos empleando biomasa húmeda registró porcentajes menores al 5 %, demostrando nuevamente que en la vía de extracción húmeda, el agua forma una barrera protectora para los lípidos intracelulares, la misma que dificulta la ruptura de la pared celular de la microalga [266], y consecuentemente la extracción de los lípidos.

La Tabla 4.2.3 muestra los valores de la productividad volumétrica para los lípidos extraídos en biomasa seca y húmeda de *Scenedesmus* sp. Como se puede observar, se aprecian mejores resultados para la biomasa seca en comparación con la biomasa húmeda, y en orden decreciente, los dos mejores valores de productividad para ambas vías de extracción (seca y húmeda), corresponden a los disolventes más polares, metanol y etanol; siendo los resultados de productividad concordantes con los porcentajes de lípidos extraídos.

Los resultados relacionados con la especie *C. vulgaris* permiten seleccionar la mezcla CM (1:2) como el mejor agente extractor de lípidos con biomasa seca; este resultado es cercano al reportado por otros investigadores con la mezcla CM (2:1), obteniendo 22,6 % de lípidos totales extraídos usando ultrasonido y diversas temperaturas y tiempos de reacción [146] [242]. También, el resultado es próximo al rango de porcentajes de lípidos extraídos de biomasa seca de microalgas cultivadas en medio sintético BBM, el cual varía entre 20-30 % [267,268]. Sin

embargo, como se mencionó anteriormente, el uso de disolventes clorados no es recomendado desde el punto de vista medioambiental en biorrefinerías con enfoques sostenibles [269].

En cuanto a la productividad total de lípidos, los valores obtenidos para la biomasa seca de *C. vulgaris* cultivada en agua residual de piscicultura es menor respecto de los valores reportados en la bibliografía para la microalga en cuestión cultivada en agua residual municipal ( $0,0143 \pm 0,0038$  g/L-d) y en medio sintético BBM ( $0,0124$  g/L-d)[195]. Los autores sugieren que la productividad está asociada a la capacidad que tiene la microalga de aprovechar altas concentraciones de nutrientes como N y P de aguas residuales, lo que a su vez se relaciona con el incremento de la biomasa microalgal y la subsecuente producción lipídica [195].

En esta investigación para la especie *Scenedesmus* sp., los disolventes cloroformo:metanol (1:2), metanol y etanol fueron los que obtuvieron porcentajes mayores al 20 % lípidos totales extraíbles. El resultado de la productividad total de lípidos de la presente investigación resulta menor a los valores reportados en la literatura para *Scenedesmus* sp. cultivada en medio BBM ( $0,025$  g/L-d) con modificaciones al método de extracción de lípidos de Bligh y Dyer (1959) y el uso de la mezcla cloroformo:metanol (2:1) [242].

Por ejemplo, Ryckebosch et al; (2012) emplearon varios disolventes para la extracción de lípidos de *C. vulgaris*, y se comprobó que la mezcla cloroformo:metanol (1:1) tuvo un porcentaje de extracción del 24 % de lípidos en esta especie [270]; esta misma mezcla de disolventes fue empleada por Lee et al; (2010) para la extracción lipídica de *Scenedesmus* sp. obteniendo una productividad total de lípidos de  $0,0095$  g/L-d [271], muy próxima a la obtenida en el cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua residual de piscicultura del presente estudio.

De los alcoholes empleados como disolventes para la extracción de lípidos totales del presente trabajo doctoral (metanol y etanol), se caracterizan por tener alta polaridad y se emplean tradicionalmente para la producción de biodiésel debido a sus propiedades fisicoquímicas, bajo coste, condiciones de reacción suaves y fácil separación de fases [270,272]. Estos alcoholes resultaron ser buenos disolventes para la extracción de lípidos para la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual de la industria cervecera y de piscicultura realizados en la presente investigación.

Du et al; (2015) indica que al usar mezclas de disolventes polares y no polares, los alcoholes polares interrumpen los enlaces de hidrógeno haciendo a la membrana más porosa, posteriormente un disolvente no polar como el cloroformo podrá difundir a través de la membrana de la célula e interactuar con los lípidos hidrófobos [273]. Sin embargo, aunque son muchos los estudios que realizan la obtención de lípidos empleando cloroformo o mezclas

clásicas de cloroformo:metanol en diferentes proporciones, esta sustancia halogenada es altamente tóxica; por lo que las extracciones de lípidos se han orientado al uso de disolventes eficientes y más respetuosos con el medioambiente para tener un enfoque sostenible en la biorrefinería [269].

Algunos autores mencionan al acetato de etilo como una buena opción desde el punto de vista ambiental [96]. Trabajos más recientes resaltan los beneficios del uso de disolventes eutécticos profundos (DEP – o deep eutectic solvents (DES) por sus siglas en inglés); se trata de una nueva familia de líquidos iónicos y entre sus propiedades más destacadas se encuentran su baja toxicidad, biodegradabilidad, bajo coste, fácil síntesis, recuperación y reutilización, lo cual los hacen ideales para el procesamiento de biomasa microalgal y la obtención de lípidos, ácidos grasos, proteínas, etc. [269]. Entre algunos de los DEP reportados en la literatura se encuentran: cloruro de colina con urea (1:2) (relina); cloruro de colina con etilenglicol (1:2) (etalina); cloruro de colina con glicerol (1:2) (glicelina) y cloruro de colina con ácido fenilacético (1:2) [259]. Incluso en Francia se han desarrollado DEP naturales que se han usado en la obtención de lípidos y pigmentos de *Arthrospira platensis* (Spirulina) [274].

#### **4.2.2 Obtención de ácido grasos libres (AGL)**

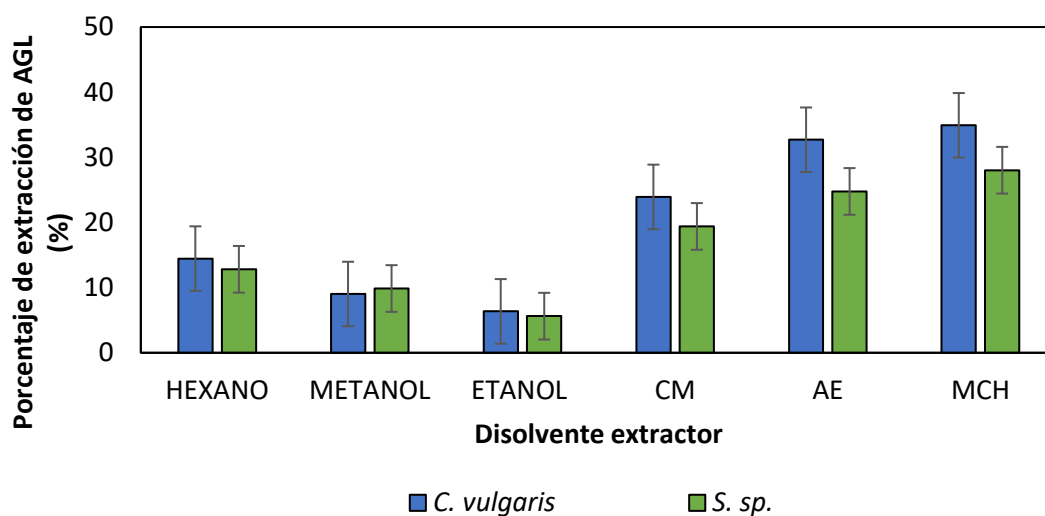
##### **a) Agua residual de industria porcina**

Teniendo en cuenta los bajos porcentajes de lípidos totales extraíbles con el uso de biomasa húmeda, los procedimientos de obtención de AGL se realizaron únicamente a partir de biomasa seca de las dos especies de microalgas analizadas. La Figura 4.2.4 muestra el porcentaje de AGL obtenido de la biomasa total de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en el ARFP; esto se realizó con los seis disolventes expuestos en la metodología e hidróxido de potasio (KOH) como catalizador.

Los mejores porcentajes de extracción de AGL se alcanzaron con metilciclohexano (MCH) con valores de  $34,92 \pm 0,021$  % de AGL para *C. vulgaris* y  $28,02 \pm 0,022$  % para *S. sp.* El segundo mejor disolvente extractor fue acetato de etilo (AE) con valores  $32,70 \pm 0,0019$  % para *C. vulgaris* y  $24,77 \pm 0,022$  % para *S. sp.* Puede apreciarse en la figura anterior que *C. vulgaris* presentó mayores valores de AGL que *S. sp.* para prácticamente todos los disolventes y que hexano, metanol y etanol fueron los disolventes con los más bajos porcentajes de extracción de AGL (< 15 %).

Son pocos los estudios de obtención de AGL para microalgas cultivadas en aguas residuales relacionadas a actividades porcinas; por ello, se realiza la comparación con otras investigaciones

que determinaron el contenido de AGL de la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en medios de cultivo diferentes.



**Figura 4.2.4** Porcentaje de extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL) en biomasa seca de *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) y *Scenedesmus* sp. (*S. sp.*) cultivadas en agua residual de la industria porcina.

Kim et al., (2007) cultivaron la microalga *Scenedesmus sp.* en aguas residuales de orina de cerdo empleando metanol como disolvente, y la extracción de AGL fue de 0,9 % a partir de la biomasa completa; un valor muy bajo en comparación al resultado para el mismo disolvente en la presente investigación [220]. La bibliografía indica que la elección del disolvente extractor es un factor importante a tener en cuenta para las extracciones de AGL puesto que las polaridades de los disolventes afectan a la capacidad de solubilizar grasas, pigmentos y azúcares, interfiriendo así en la producción de biocombustibles como el biodiésel [275].

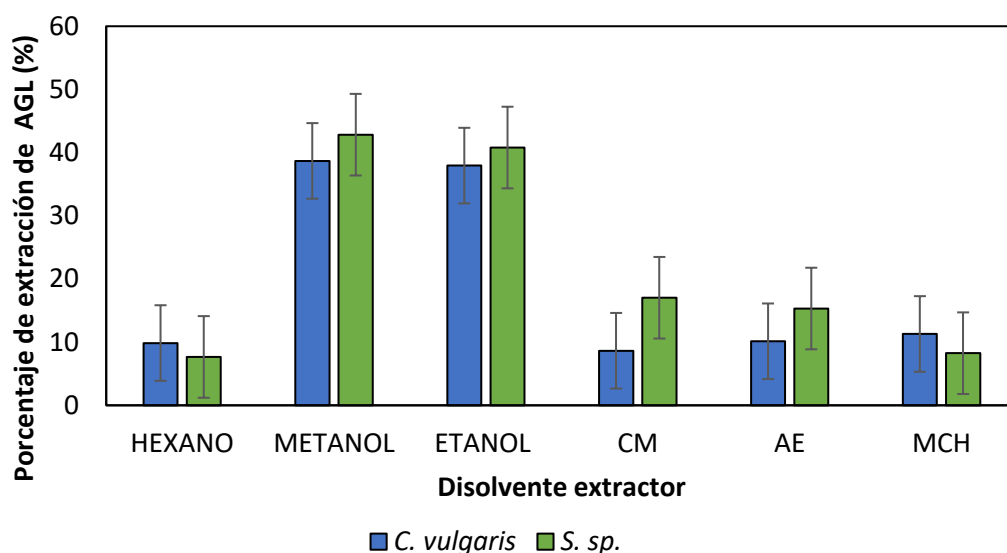
Park et al., (2014) reporta porcentajes de AGL de 26,5 %; 34,2 % y 38,5 % para la biomasa completa de esta microalga cultivada en un medio nutritivo y llevando a cabo la reacción de extracción de AGL con agua caliente a 120 °C, y usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador en concentraciones de 0,5 %, 1 % y 2 % en peso y dodecilsulfonato de sodio (SDS por sus siglas en inglés) como un surfactante aniónico para mejorar la eficiencia de la extracción de los ácidos grasos. Se empleó una mezcla de hexano:metanol como disolvente [130]; aunque el método de extracción de AGL de los autores es diferente al empleado en el presente trabajo doctoral, sus valores se encuentran en el rango de los porcentajes de AGL de la presente investigación con los tres mejores disolventes.

Tal y como se mencionó en el apartado anterior de extracción de lípidos totales, disolventes como el metilciclohexano, hexano y acetato de etilo tienen baja polaridad y pueden disolver compuestos no hidrosolubles como los lípidos y ácidos grasos; mientras que el metanol y etanol son disolventes más polares que, además de disolver lípidos polares neutros, tienen la desventaja de disolver compuestos estructurales no lipídicos que no son necesarios en la producción de biodiésel [276]. Un disolvente mixto como la mezcla de cloroformo y metanol, puede disolver compuestos polares y no polares dependiendo de su proporción, y algunos autores optan por este tipo de mezclas ya que arroja buenos resultados para la extracción de aceites de microalgas [275], a pesar de su efecto negativo sobre el medioambiente.

Comparando los resultados obtenidos en el presente trabajo con los hallados por Dong et al.; (2013) se puede observar que el contenido de AGL en los lípidos de microalgas de la presente investigación para todos los disolventes probados son algo menores que los publicados en la literatura (superiores al 40 % en el estudio bibliográfico [277]) Sin embargo, cabe destacar que este porcentaje puede mejorarse con variaciones en algunas condiciones del cultivo; por ejemplo, condiciones de estrés por limitación de P en el medio de cultivo o estrés por salinidad, ya que ayudan a incrementar el contenido de ácidos grasos saturados, lo que es ideal si el propósito final es la obtención de biocombustibles [251].

#### **b) Agua residual de industria cervecera**

De forma similar al caso del agua residual anterior, los procedimientos de obtención de AGL se realizaron únicamente a partir de biomasa seca. La Figura 4.2.5 muestra los resultados de AGL para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de la industria cervecera con el uso de los seis disolventes extractores expuestos en la metodología e hidróxido de potasio (KOH) como catalizador. En este tipo de agua residual destaca el metanol como el mejor disolvente con  $38,69 \pm 0,60$  % de AGL para *C. vulgaris* y  $42,83 \pm 5,03$  % para *S. sp.* También se obtuvieron buenos resultados de extracción de AGL usando etanol con valores de  $37,94 \pm 4,06$  % para *C. vulgaris* y  $40,80 \pm 8,42$  % para *S. sp.* De forma general se aprecia que la especie *Scenedesmus* sp. crecida en el AR de la industria cervecera presenta el mayor contenido de AGL de los evaluados hasta el momento.



**Figura 4.2.5** Porcentaje de extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL) extraídos de biomasa seca de *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) y *Scenedesmus* sp. (*S. sp.*) cultivadas en agua residual de la industria cervecera.

Pocos estudios reportan resultados de extracción de AGL para la especie *Scenedesmus* sp. en aguas residuales similares; en una publicación se empleó esta microalga para el cultivo en agua residual anaeróbicamente tratada de una industria cervecera con diferentes tasas de dilución en el rango de 0,08-0,58 d<sup>-1</sup>, para las cuales se encontraron que el menor y mayor % de AGL fue de 5,9 ± 0,4 % y 9,2 ± 0,4 % para las tasas de dilución de 0,08 y 0,11 d<sup>-1</sup>, respectivamente; y extraídos con metanol:cloruro de acetilo (95:5 v/v) [232]. Estos valores son menores en comparación al resultado para los alcoholes empleados como disolventes en la presente investigación, resaltando el potencial del agua residual empleada.

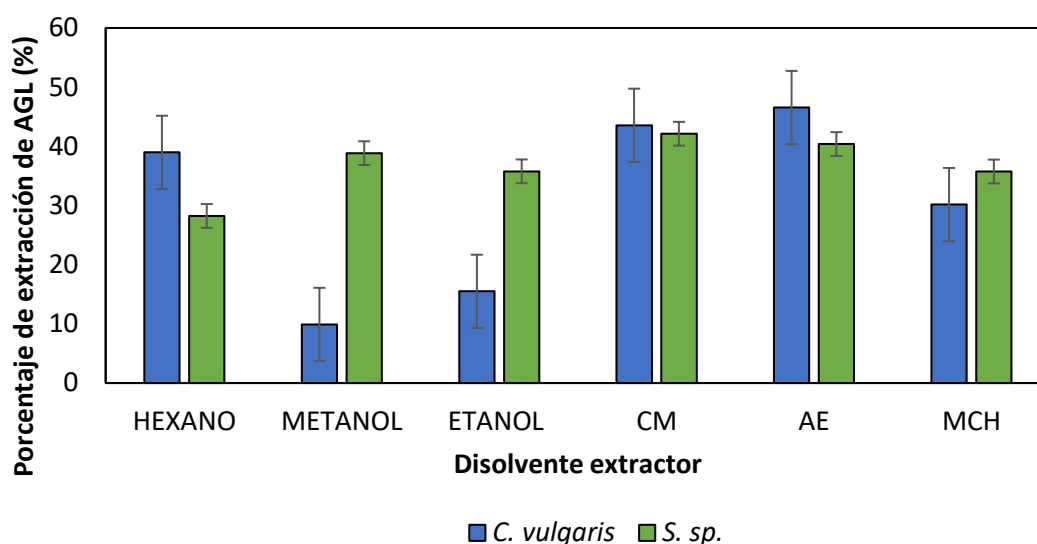
En función de los resultados del presente trabajo, el metanol y etanol fueron los dos mejores disolventes extractores para este tipo de agua residual; se trata de disolventes de alta polaridad que extraen lípidos polares, pero que tienen como desventaja el hecho de disolver simultáneamente compuestos no lipídicos que no son necesarios en la producción de biodiésel [276].

### c) Agua residual de piscicultura

Con las mismas consideraciones que en los cultivos anteriores, se hizo uso de la biomasa seca de las especies *C. vulgaris* y *S. sp.* cultivadas en AR de piscicultura para la obtención del porcentaje de extracción de AGL. La Figura 4.2.6 muestra los resultados de los porcentajes de AGL extraídos a partir de los disolventes extractores empleados. Para ambas especies los



mejores porcentajes se obtuvieron para acetato de etilo (AE) con  $46,56 \pm 3,31$  % de AGL para *C. vulgaris* y  $40,39 \pm 0,58$  % para *S. sp.*; el segundo mejor resultado se obtuvo usando la mezcla cloroformo:metanol (1:2) con  $43,56 \pm 8,99$  % para *C. vulgaris* y  $42,13 \pm 3,61$  % para *S. sp.* Los valores porcentuales de AGL más bajos se obtuvieron para metanol y etanol con *C. vulgaris* (< 20 %); mientras que para la especie *S. sp.*, la extracción de AGL es superior al 30 % para casi todos los disolventes, siendo el hexano la excepción



**Figura 4.2.6** Porcentaje de extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL) en biomasa seca de *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) y *Scenedesmus sp.* (*S. sp.*) cultivadas en agua residual de piscicultura.

El acetato de etilo ha sido ampliamente usado por otros investigadores que reportan el uso de este disolvente como reactivo y co-disolvente efectivo en reacciones de extracción de ácidos grasos, incluso con biomasa húmeda. Aunque se trata de un disolvente de baja polaridad, su uso y eficiencia en la extracción de compuestos moderadamente hidrófobos como ácidos grasos, alcaloides y esteroides se ha reportado [256]. Su eficacia podría estar asociada a una mayor miscibilidad con los lípidos mejorando la transferencia de masa y la obtención de los ácidos grasos [121]. Las mezclas de disolventes con cloroformo: metanol en diversas proporciones manifiestan altos porcentajes de extracción de lípidos y ácidos grasos; sin embargo, debido a la toxicidad de los compuestos clorados, el acetato de etilo se presenta como una opción más respetuosa con el medioambiente [121].

Otros autores reportan porcentajes bajos de AGL entre 2-12 % empleando la misma especie de estudio y la mezcla cloroformo:metanol (1:1) con modificaciones en parámetros como tiempo de almacenamiento, limitación de nutrientes y métodos de cosecha para la conservación de biomasa húmeda de *C. vulgaris* [120].

En la presente investigación para la especie *S. sp.* la mezcla CM (1:2) resultó ser el mejor disolvente extractor de AGL; sin embargo, estudios con la misma especie reportan extracciones con hexano en rangos muy amplios; por ejemplo, de 22,81 % de AGL para la especie cultivada en medio BG-11 por 26 días y de 67,11 % al agregar 10 % de glicerol técnico al medio BG-11 en cultivos en condiciones mixotróficas [278]. Para el uso de la mezcla CM (1:2) en la literatura se reportan 59,89 % de AGL ocupando las mismas proporciones de esta mezcla de disolventes [279]. Esta diferencia puede estar asociada al uso del medio sintético BG-11, el cual es óptimo para el crecimiento microalgal [279]. El rendimiento de AGL con el uso de acetato de etilo como disolvente, es ligeramente menor al reportado en la literatura con valores de 44,3 % empleando la misma especie de microalga cultivada en medio sintético BBM modificado [242].

Los resultados de la presente investigación tienen cerca de 50 % de AGL al ser cultivada en agua residual de piscicultura, y estos resultados son muy buenos y puede estar asociado directamente a las características del medio de cultivo, las condiciones atmosféricas durante el tiempo de cultivo [29], y concentraciones de N y P disponible en el medio que afectan el contenido lipídico en las microalgas [280]. Algunas estrategias para mejorar el rendimiento de la extracción de AGL incluyen el uso de enzimas para la disrupción celular seguida del uso de disolventes no polares que son más eficientes para disolver compuestos no solubles en agua como los AGL [281,282].

#### **4.2.3 Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)**

Considerando que no todos los lípidos son aptos para su transformación a biodiésel, el foco de muchos investigadores se centra la extracción de lípidos neutros, principalmente ácidos grasos libres, triacilglicéridos y esteroides; éstos pueden ser esterificados/transesterificados en ésteres metílicos de ácidos grasos, que constituyen el principal componente del biodiésel [129]. La literatura reporta que los componentes principales del biodiésel son ésteres metílicos de ácidos grasos de 16-18 carbonos, con unos determinados valores de densidad, viscosidad y el poder calorífico que conducen a unas adecuadas propiedades del biocombustible [219].

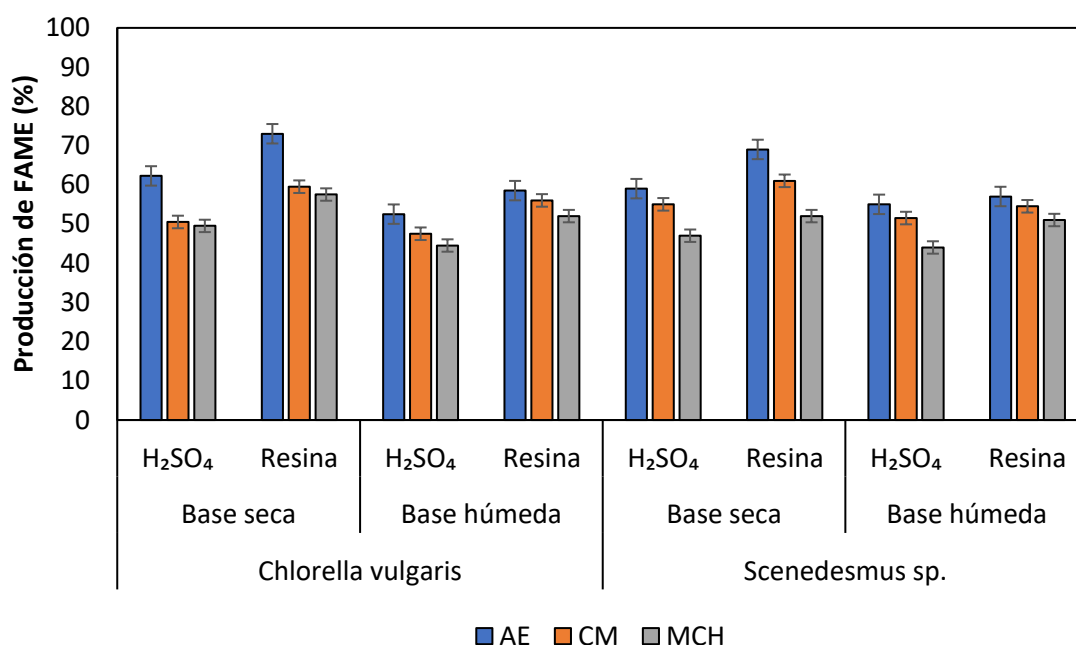
En este apartado se presentan los resultados de la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) a partir de dos métodos de obtención: 1) método indirecto a partir de lípidos y AGL previamente extraídos y 2) método directo a partir de la biomasa completa de las dos especies de microalgas de estudio en los tres tipos de aguas residuales analizadas en el presente estudio doctoral. Para cada caso se emplearon dos tipos de catalizadores ácidos: uno homogéneo, ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y uno heterogéneo, una resina comercial CT-269DR. La

comprobación de la conversión a FAME se analizó mediante la técnica de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H).

#### 4.2.3.1 Método indirecto

##### a) Agua residual de industria porcina

La Figura 4.2.7 muestra el porcentaje de producción de FAME obtenidos a partir del método indirecto con los lípidos extraídos de biomasa seca y húmeda de microalgas de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en el ARFP. Se ensayaron los lípidos extraídos con los distintos disolventes para determinar si tenían la misma capacidad de trans/esterificar; o, por el contrario, eran lípidos no convertibles a FAME.



**Figura 4.2.7** Porcentaje de producción de FAME de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria porcina con el método indirecto a partir de lípidos.

Para ambas especies pueden observarse mayores porcentajes con el uso de biomasa seca y con la resina como catalizador. Para la especie *C. vulgaris* puede apreciarse que el orden de los porcentajes de producción de FAME indirectos a partir de lípidos, corresponden en primer lugar a los FAME producidos a partir de lípidos extraídos con acetato de etilo (AE), el segundo lugar corresponde a FAME producidos a partir de lípidos extraídos con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) (CM); y, en tercer lugar, los FAME producidos a partir de lípidos extraídos con metilciclohexano (MCH).

En cuanto a los lípidos en base seca que sirvieron de partida, resaltan en primer lugar el resultado de FAME producidos a partir de los lípidos extraídos con AE con un valor de  $62,25 \pm 0,04$  %; en segundo lugar, con la mezcla CM (1:2) la cual produjo  $50,50 \pm 0,02$  % y; en tercer lugar, con MCH con  $49,50 \pm 0,04$  %, usando  $H_2SO_4$  como catalizador. Usando la resina comercial, resalta los lípidos extraídos con AE con el mayor porcentaje de FAME de  $73,00 \pm 0,01$  %, seguido de la mezcla CM (1:2) y ,con MCH con valores muy próximos entre sí, de  $59,50 \pm 0,01$  % y  $57,50 \pm 0,06$  %, respectivamente. En cuanto a los porcentajes de FAME obtenidos de manera indirecta a partir de lípidos extraídos de biomasa húmeda, los resultados son ligeramente mejores para la resina respecto del  $H_2SO_4$ . Puede apreciarse que con el catalizador heterogéneo con los lípidos extraídos con AE se alcanzaron valores de FAME de  $58,50 \pm 0,19$  %, seguido de la mezcla CM (1:2) y con MCH con porcentajes de FAME de  $56,00 \pm 0,04$  % y  $52,00 \pm 0,07$  %, respectivamente. Por su parte, mediante catálisis homogénea se obtuvieron porcentajes de FAME de  $52,50 \pm 0,02$  %;  $47,50 \pm 0,01$  % y  $44,50 \pm 0,02$  % a partir de los lípidos extraídos con AE, la mezcla CM (1:2) y MCH, respectivamente.

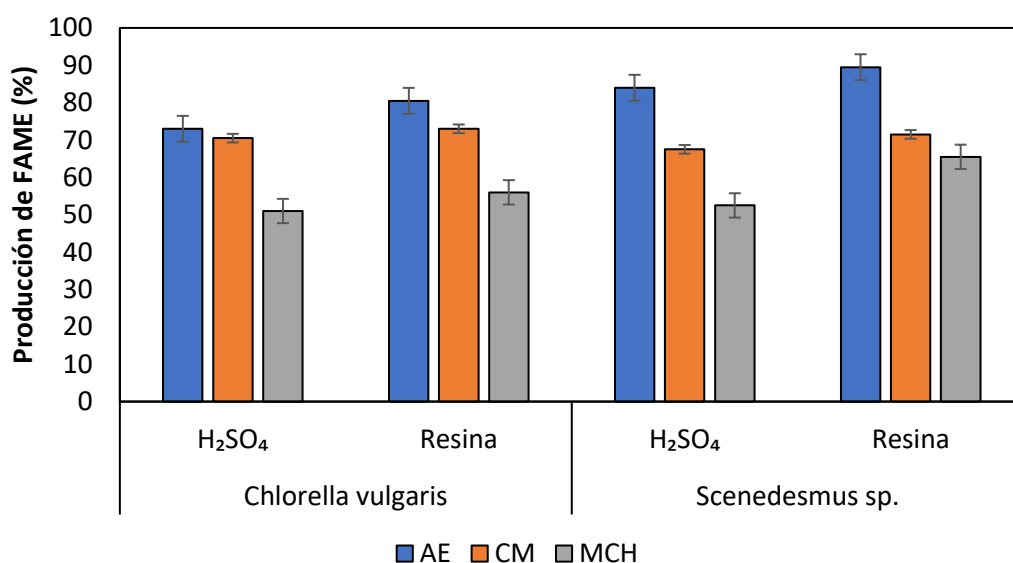
En la misma Figura 4.2.7 se muestran los porcentajes de producción de FAME indirectos a partir de los lípidos extraídos de biomasa seca y húmeda de la microalga *Scenedesmus* sp. De forma general, se aprecia que la resina comercial tuvo mejor producción de FAME en comparación con el ácido sulfúrico, y los porcentajes en base seca son ligeramente mejores respecto de la base húmeda. La figura muestra que los mejores porcentajes de FAME usando  $H_2SO_4$  como catalizador se obtuvieron a partir de los lípidos extraídos con AE , CM (1:2) y MCH. Con más detalle, a partir de los lípidos en base seca los resultados de FAME fueron de  $59 \pm 0,04$  % con los lípidos extraídos con AE; en segundo lugar,  $55,00 \pm 0,02$  % de FAME producidos a partir de lípidos extraídos con la mezcla CM (1:2) y; en tercer lugar,  $47,00 \pm 0,04$  % de FAME con los lípidos extraídos con MCH. Usando la resina comercial se obtienen porcentajes de FAME más elevados, resaltando los valores obtenido a partir de los lípidos extraídos con AE con el mayor porcentaje de FAME de  $69,00 \pm 0,01$  %, seguido de los FAME producidos a partir de lípidos extraídos con la mezcla CM (1:2) y MCH con valores de  $61,00 \pm 0,01$  % y  $52,00 \pm 0,06$  %, respectivamente.

En el caso de los porcentajes de FAME obtenidos de manera indirecta a partir de lípidos extraídos de biomasa húmeda, los resultados son ligeramente mejores para la resina respecto del  $H_2SO_4$ . Para el catalizador heterogéneo, con los lípidos extraídos con AE se alcanzaron valores de FAME de  $57,00 \pm 0,09$  %, seguido de la mezcla CM (1:2) y metilciclohexano con  $54,50 \pm 0,03$  % y  $51,00 \pm 0,05$  %, respectivamente. Por su parte, la reacción con el catalizador homogéneo

condujo a porcentajes de producción de FAME de  $55,00 \pm 0,05$  %;  $51,50 \pm 0,07$  % y  $44,00 \pm 0,03$  % para los lípidos extraídos con AE, la mezcla CM (1:2) y MCH, respectivamente.

Estos resultados de producción de FAME por el método indirecto a partir de lípidos extraídos son consistentes con los mejores disolventes de la etapa de extracción de lípidos; lo que es un indicativo de que los lípidos extraídos con estos disolventes de baja polaridad presentan la misma naturaleza, por lo que puede inferirse de que los lípidos extraídos corresponden a compuestos moderadamente hidrófobos como los ácidos grasos que se transesterificaron a FAME. También los resultados demuestran que el catalizador heterogéneo produjo mayor porcentaje de FAME en comparación con el ácido sulfúrico; si bien ambos son catalizadores ácidos, el catalizador heterogéneo presenta propiedades texturales que favorecen la producción de FAME [256].

Asimismo, para comprobar si los AGL extraídos en el apartado anterior eran capaces de esterificarse a FAME, se determinó el porcentaje de FAME producidos a partir de AGL extraídos de biomasa seca para ambas especies de microalgas; los valores se muestran en la Figura 4.2.8; Para la especie *C. vulgaris* se observan porcentajes más altos para la resina respecto del  $H_2SO_4$ . En el caso de la resina resalta el comportamiento de los AGL extraídos con AE, la mezcla CM (1:2) y MCH con valores de producción de FAME de  $80,50 \pm 0,01$  %,  $73,00 \pm 0,04$  % y  $56,00 \pm 0,07$  %, respectivamente. Con el uso del  $H_2SO_4$ , resaltan los AGL extraídos con los mismos disolventes: AE, la mezcla CM (1:2) y MCH con valores de producción de FAME de  $73,00 \pm 0,11$  %,  $70,50 \pm 0,28$  % y  $51,00 \pm 0,01$  %.



**Figura 4.2.8** Porcentaje de producción de FAME de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* cultivadas en agua residual de industria porcina con el método indirecto a partir de AGL

Para la especie *S. sp.*, los porcentajes de FAME producidos a partir de AGL por el método indirecto con biomasa seca muestran el mismo comportamiento que la especie anterior con mejores valores para la resina respecto del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Para la resina, los valores de FAME producidos a partir de AGL extraídos previamente fueron de 89,50 ± 0,06 %; 71,50 ± 0,09 % y 65,50 ± 0,05 % de FAME con los disolventes AE, la mezcla CM (1:2) y MCH, respectivamente. Con el uso del catalizador homogéneo, resaltan los porcentajes de FAME producidos por el método indirecto a partir de AGL extraídos con AE, la mezcla CM (1:2) y MCH con valores de 84,00 ± 0,01 %, 67,50 ± 0,05 % y 52,50 ± 0,04 %, respectivamente.

Al igual que en la especie anterior, estos resultados son consistentes con los resultados del apartado de extracción de lípidos, resaltando los disolventes con menores polaridades como AE, CM(1:2) y MCH, los cuales son capaces de extraer compuestos moderadamente hidrófobos como los ácidos grasos; esto sugiere que los AGL se esterificaron a FAME mediante la reacción. Igualmente, los mejores porcentajes de producción de FAME se obtuvieron con el catalizador heterogéneo, el cual posee alta acidez, pero además se ve favorecido por otras propiedades texturales.

Otras especies del género *Chlorella* también reportan porcentajes de FAME obtenidos por el método indirecto con el uso del catalizador homogéneo (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), metanol y lípidos extraídos con la mezcla cloroformo: metanol (1:2) en biomasa seca de *Chlorella pyrenoidosa* con un rango de FAME de 7,8-10,6 % [134]. Estos valores son menores a los obtenidos a partir de lípidos extraídos con la mezcla de disolventes CM (1:2) en esta investigación. Para la especie *Chlorella zofigiensis* cultivada en agua residual porcina a varias concentraciones de DQO, se reportó un contenido de 80,31 % de FAME, compuesto principalmente por ácidos grasos de cadena corta (C16:0, C16:1, C18:0, C18:2 y C18:3) para el tratamiento para DQO de 400 mg/L (más próximo al del presente estudio). Este tipo de ácidos de cadena corta son idóneos para la producción de biodiésel, la cual resultó con una productividad de 0,0119 g/L·d [47].

Estas variaciones en los porcentajes de FMAE están asociadas tanto a las características de las especies, las condiciones de cultivo, nutrientes disponibles en el agua residual empleada y la polaridad de los disolventes empleados para las extracción de los lípidos y ácidos grasos [275]; incluso, como se ha mencionado anteriormente, algunos estudios apuntan al uso de disolventes menos tóxicos, con menor inflamabilidad y menos nocivos para el medioambiente como el acetato de etilo [283].

Para la especie *Scenedesmus obliquus* cultivada en agua fresca en reactores tipo raceway, el porcentaje de FAME por el método indirecto fue de 90 % y 80 %, usando hexano y cloroformo

como disolventes extractores de los lípidos; sin embargo, el análisis de la composición de los ácidos grasos mostró mayor porcentaje de ácidos grasos del rango C16-C18 para los FAME de lípidos extraídos con cloroformo (32 % de C16:0, 14 % de C18:1, 21 % de C18:2 y 24 % de C18:3), en comparación con los FAME de lípidos extraídos con hexano (30 % de C16:0, 10 % de C18:1, 17 % de C18:2 y 19 % de C18:3) [284].

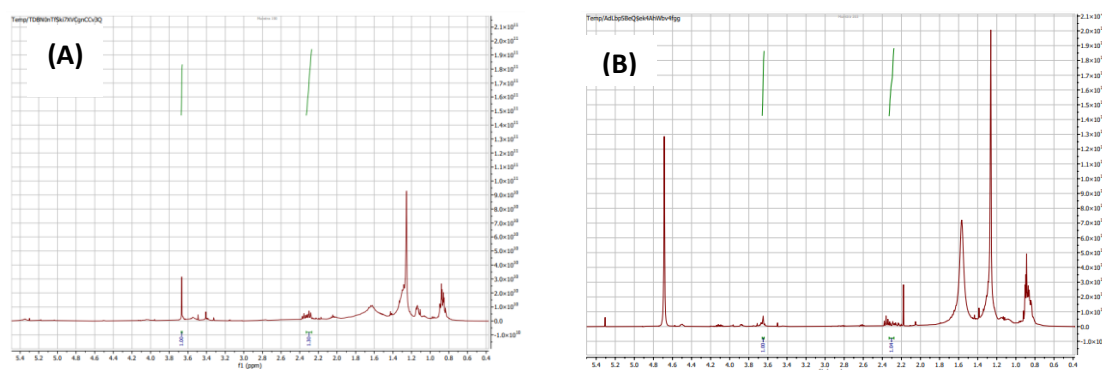
Otros autores sugieren algunos procedimientos para mejorar el rendimiento de la reacción de transesterificación con el uso de nanocatalizadores; en una investigación se reporta el uso de óxido de calcio (CaO) extraído de cáscaras de huevo como un nanocatalizador para llevar a cabo la reacción de transesterificación directa con la microalga *Scenedesmus armatus*, a 75 °C, con 4 h de tiempo de reacción, agitación de 85 rpm y 1,61 % del nanocatalizador, encontrando un contenido de FAME de 90,44 %. La ventaja del uso de este catalizador es que puede ser reutilizado hasta cinco veces manteniendo su estabilidad [285]. Aunque no se consideró en este trabajo doctoral, la resina CT-269 empleada en este estudio, también puede ser recuperada para su reutilización como una forma de reducción de costes del proceso de obtención de FAME.

Para que los FAME producidos a partir de microalgas o cualquier otra materia prima, debe cumplir con parámetros estandarizados para su utilización como biodiesel. En el caso de la Unión Europea, la norma EN 14214 establece el cumplimiento de varios parámetros fisicoquímicos; entre ellos se establece que se requiere de un contenido de ésteres metílicos de 96,5 % . Este mismo criterio se usa en Ecuador bajo la normativa NTE INEN 2482 (biodiésel, requisitos), basada en la normativa EN 14103 (Derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) [286]. Evidentemente, los resultados de producción de FAME por el método indirecto a partir de microalgas cultivadas en el agua residual de industria porcina, no cumple el criterio establecido (96,5 %). Estos valores podrían mejorarse con etapas de purificación de lípidos y AGL extraídos para eliminar compuestos lipídicos no saponificables, y/o purificación de FAME para eliminar productos secundarios como la glicerina luego de la transesterificación [96].

Para verificar la conversión a FAME se realizó la caracterización de los FAME producidos a partir del método indirecto (lípidos y AGL previamente extraídos); dicha caracterización se hizo con la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) para ambas especies en base seca y así poder determinar la conversión de lípidos saponificables a FAME relacionando el área de las señales de los protones de los grupos metilo de los FAME formados ( $A_{ME}$ ) con las señales de los protones de los metilenos (-CH<sub>2</sub>-) de los triglicéridos y ácidos grasos libres que no han reaccionado ( $A_{\alpha CH_2}$ ). La Figura 4.2.9 ejemplifica los espectros de RMN-<sup>1</sup>H para la

determinación de FAME producidos por el método indirecto para *Chlorella vulgaris* (Figura 4.2.9 A) y *Scenedesmus* sp. (Figura 4.2.9 B).

El grado de conversión de aceites de las especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en ARFP hacia FAME se confirmó con el análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, considerando la ausencia de picos de protones glicéridos entre 4,2-4,3 ppm y la presencia de picos característicos de grupos carbonil metilenos (-CH<sub>2</sub>-) a 2,2 ppm y picos de protones metoxi (CH<sub>3</sub>-) a 3,6 ppm que presenta la Figura 4.2.9 [287,288].



**Figura 4.2.9** Ejemplo de espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos a partir del lípidos extraídos de biomasa de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) cultivadas en agua residual de industria porcina.

**Tabla 4.2.4** Conversión de FAME analizado mediante RMN-<sup>1</sup>H obtenidos por el método indirecto

Especie	Disolvente	catalizador	% Conversión FAMES lípidos	% Conversión FAMES AGL
<i>Chlorella vulgaris</i>	CM (1:2)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	76,00	*
		CT-269DR	86,67	72,67
	MCH	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	92,00	83,33
		CT-269DR	N.D.	78,00
	AE	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99,33	91,33
		CT-269DR	76,00	74,00
<i>Scenedesmus</i> sp.	CM (1:2)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	95,33	91,33
		CT-269DR	69,33	78,67
	MCH	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	*	75,33
		CT-269DR	88,67	70,67
	AE	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	65,33	76,00
		CT-269DR	98,67	57,33

\*: muestra sin reaccionar; N.D. no determinado (sin presencia de picos)



La Tabla 4.2.4 muestra los resultados para las dos especies de microalgas analizadas en este estudio con los mejores disolventes extractores. Para esta misma especie, la conversión a FAME a partir de los lípidos presentó valores entre 76-99 % con el uso del catalizador homogéneo y con rangos de 76-87 % para el catalizador heterogéneo con los tres mejores disolventes extractores de lípidos (la mezcla CM (1:2), AE y MCH); mientras que la conversión a FAME de los AGL extraídos fue mejor con el uso del catalizador homogéneo con rangos entre 83-91 % en comparación con el catalizador heterogéneo con valores de conversión entre 72-78 %.

No hay bibliografía específica sobre el uso de la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para los lípidos de *C. vulgaris* cultivada estrictamente en agua de industria porcina; sin embargo, en un estudio se cultivó la especie *Chlorella* sp. en agua residual municipal recolectada después del tratamiento secundario; el agua se diluyó con agua potable (75 % de dilución) y el cultivo se mantuvo en condiciones de invernadero con exposición a luz solar por 21 días, con reposición de medio a la mitad del tiempo del cultivo. Después de la transesterificación, los FAME obtenidos se analizaron mediante RMN-<sup>1</sup>H y los espectros revelaron la presencia de señales correspondientes a monoglicéridos, carbonos carbonilos (-CH<sub>2</sub>-) y carbonos con insaturaciones de hidrógenos con picos a 3,6 ppm, 2,27-2,34 ppm y 5,39 ppm, respectivamente [289].

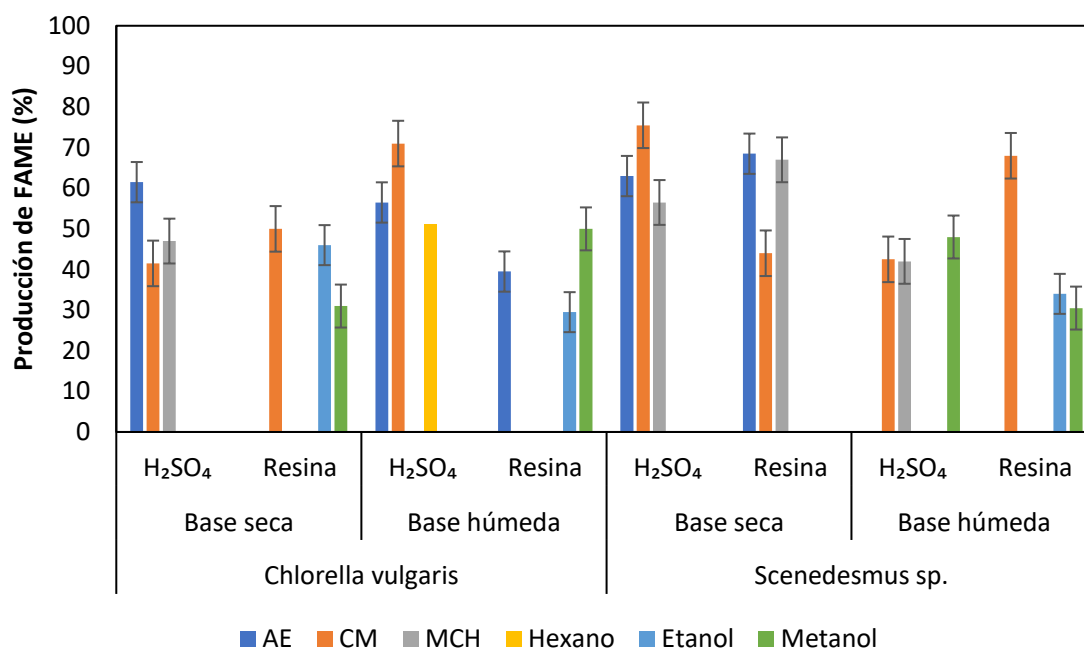
Para la especie *Scenedesmus* sp. la Tabla 4.2.4 muestran que para los resultados de la conversión a FAME a partir de los lípidos, los valores se encuentran en el rango de 65-95 % para el catalizador homogéneo, y en rangos de 69-98 % para el catalizador heterogéneo con los FAME producidos a partir de los lípidos extraídos con los tres mejores disolventes. La conversión a FAME de los AGL extraídos también resultó mejor con el uso del catalizador homogéneo con rangos entre 75-91 % en comparación con el catalizador heterogéneo cuyos valores de conversión están entre 57-78 %.

En la revisión bibliográfica para la misma especie de microalga, no se encontró bibliografía que presente el uso de la técnica de RMN para la especie cultivada en medios de cultivos comerciales o en aguas residuales de características similares al industria porcina; sin embargo, esta técnica se empleó para analizar el conversión a FAME de los lípidos extraídos con metanol obtenidos luego del cultivo de *Scenedesmus rotundus* en medios BBM y BG-11. El espectro de RMN-1H muestra la ausencia de picos en la región de 7-8 ppm correspondientes a anillos aromáticos en la muestra; se confirma la presencia de picos intensos en la región de 1,482-1,317 ppm confirmando la presencia de enlace simples de alcanos; picos a 2,0; 2,32 y 2,76 ppm que confirman la presencia de carbonos alfa próximos a grupos funcionales carbonilos, y finalmente

señales a 3,29-3,8 ppm que confirman la presencia de grupos terminales metoxi presentes en los ésteres; de esta manera los autores confirman la conversión a FAME [290].

### b) Agua residual de la industria cervecera

La Figura 4.2.10 muestra el porcentaje de producción de FAME para las dos microalgas de estudio cultivadas en agua residual de la industria cervecera con los mejores disolventes para cada tipo de catalizador. En este tipo de agua residual, el comportamiento de los disolventes fue muy variado.



**Figura 4.2.10** Porcentaje de producción de FAME de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria cervecera con el método indirecto a partir de lípidos

En cuanto a los lípidos en base seca que sirvieron de partida, resaltan en primer lugar los porcentajes de FAME producidos a partir de los lípidos previamente extraídos con AE con  $61,50 \pm 10,61$  %; en segundo lugar, los FAME a partir de lípidos extraídos con MCH los cuales presentaron  $47,00 \pm 5,66$  % de producción de FAME y, en tercer lugar, los FAME producidos a partir de lípidos extraídos con la mezcla CM (1:2) con  $41,50 \pm 2,12$  %, partir de una catálisis homogénea, usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador. El resto de los disolventes registró valores de producción de FAME menores al 40 %. Usando la resina comercial, resaltan los FAME producidos a partir de los lípidos extraídos con la mezcla CM (1:2), la cual obtuvo el mayor porcentaje de FAME con un valor de  $50,00 \pm 1,41$  %; seguido por los FAME producidos a partir de lípidos

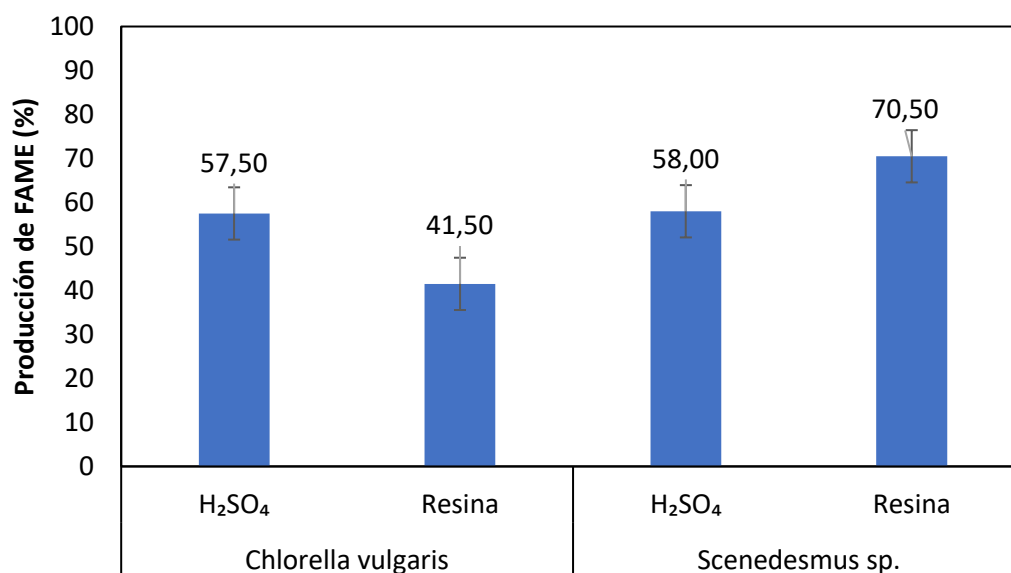
extraídos con etanol con  $46,00 \pm 4,24$  % de FAME; y finalmente, los FAME de lípidos extraídos con metanol con  $31,00 \pm 4,24$  % de FAME. El resto de los disolventes empleado tuvo rendimientos de FAME menores al 30 %.

De forma similar al apartado anterior, se emplearon los lípidos extraídos de la biomasa húmeda para la determinación del porcentaje de producción de FAME de manera indirecta; puede observarse que los resultados con  $H_2SO_4$  son mejores en comparación con la resina. Puede apreciarse que con el catalizador homogéneo los lípidos extraídos a partir de la mezcla CM (1:2) dieron lugar a una producción de FAME de  $71,00 \pm 1,41$  %, seguido de los lípidos extraídos con AE y hexano con  $56,50 \pm 9,19$  % y  $51,00 \pm 4,24$  %, respectivamente. El resto de los disolventes presentaron valores menores al 50 %. Por su parte, para la resina los mejores porcentajes de producción de FAME fueron para lípidos extraídos con metanol, AE y etanol con porcentajes de FAME de  $50,00 \pm 2,83$  %;  $39,50 \pm 9,19$  % y  $29,50 \pm 2,12$  %, respectivamente. El resto de los disolventes tuvieron valores menores al 25 % de FAME.

En la Figura 4.2.10 también se muestran los porcentajes de producción de FAME partir de los lípidos extraídos de la especie *Scenedesmus* sp. después de su cultivo de 12 días en agua residual de industria cervecera. Respecto al método indirecto a partir de lípidos previamente extraídos y con el uso del catalizador homogéneo ( $H_2SO_4$ ), los valores más altos de FAME corresponde a los producidos a partir de los lípidos extraídos de biomasa seca con la mezcla CM (1:2) ( $75,50 \pm 2,12$  %), AE ( $63,00 \pm 4,24$  %) y MCH ( $56,50 \pm 0,71$  %); el resto de los disolventes reportó porcentajes de FAME menores al 40 %. En cambio, en el caso de los lípidos de biomasa húmeda con el catalizador homogéneo, el contenido de FAME producidos fue más bajo y resaltan los porcentajes de FAME producidos a partir de lípidos extraídos con metanol ( $48,00 \pm 2,83$  %), la mezcla CM (1:2) ( $42,50 \pm 0,71$  %) y MCH ( $42,00 \pm 4,24$  %) como mejores disolventes de extracción.

Al usar la resina como catalizador, los mejores resultados de FAME a partir de biomasa seca fue con el uso de los lípidos extraídos con AE ( $68,50 \pm 0,71$  %), MCH ( $67,00 \pm 1,41$  %) y la mezcla CM (1:2) ( $44,00 \pm 4,24$  %). El resto de los disolventes mantuvo obtenciones a FAME entre 20-40 %. Para la biomasa seca resaltan los disolventes de menor polaridad, lo cual es un indicativo de que los lípidos extraídos corresponden a compuestos moderadamente hidrófobos como los ácidos grasos. En cambio, los lípidos procedentes de biomasa húmeda que dieron lugar a los mejores rendimientos de FAME por el método indirecto fueron: CM (1:2) ( $68,00 \pm 2,83$  %), etanol ( $34,00 \pm 5,66$  %) y metanol ( $30,50 \pm 0,71$  %). Estos resultados se corresponden con los disolventes de mayor polaridad de mejores resultados en la sección de extracción de lípidos, y

como se mencionó anteriormente, esto indica la extracción de compuestos altamente hidrófilos como compuesto polares neutros, ácidos y básicos. Sin embargo, también es posible que los alcoholes hayan extraído otro tipo de compuestos no lipídicos.



**Figura 4.2.11** Porcentaje de producción de FAME de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* cultivadas en agua residual de industria cervecera con el método indirecto a partir de AGL

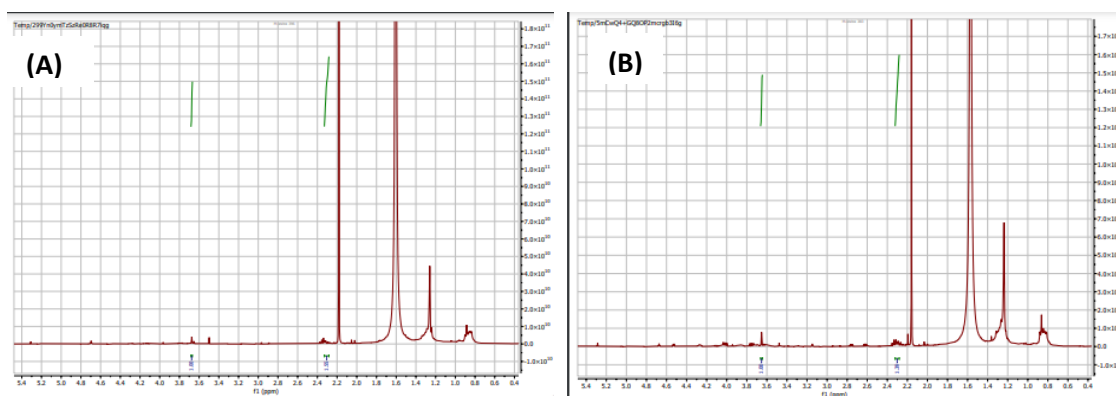
También se determinó el porcentaje de producción de FAME a partir de los AGL extraídos previamente para ambas microalgas únicamente con metanol ya que el resto de los disolventes presentaron valores de AGL más bajos. En la Figura 4.2.11 se observan los porcentajes de FAME para la especie *C. vulgaris*, encontrando mejores valores para el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con una producción de FAME de 57,50 ± 2,12 %; mientras que con la resina se produjeron 40,50 ± 3,54 % de FAME. Para la especie *S. sp.* con el uso del ácido sulfúrico como catalizador, se produjeron 58,00 ± 1,41 % de FAME a partir de los AGL extraídos previamente; mientras que con la resina se produjeron 70,50 ± 6,36 %. Respecto de los catalizadores, no se observa una inclinación hacia un tipo de catalizador en especial y la bibliografía sustenta que ambos catalizadores son muy buenos; sin embargo, el uso del catalizador homogéneo es de mayor aplicación.

No se encontró bibliografía relacionada a la producción de FAME de *C. vulgaris* o *S. sp.* con una metodología indirecta similar a la aplicada en este trabajo doctoral y que expresaran la producción de FAME en forma gravimétrica; en su lugar se encontraron publicaciones de estas especies o de otras especies del mismo género expresando producción de FAME en términos de un perfil lipídico de la biomasa analizada que es la técnica de análisis de FAME más común. Esto

no forma parte del alcance de este trabajo de investigación. Al respecto, este trabajo presenta algunos aportes a la literatura de FAME de especies de microalgas cultivadas en agua residual de industria cervecera.

Al igual que en el agua residual anterior, los resultados de producción de FAME por el método indirecto a partir de microalgas cultivadas en el agua residual de industria porcina, no cumple el criterio establecido por la norma EN 14214 para el uso de biodiesel (96,5 %). La aplicación de procedimientos para la purificación de lípidos y FAME es pertinente si se desea mejorar el rendimiento de FAME de especies cultivadas en este tipo de agua residual, aunque esto implica el aumento de los costes en la biorrefinería [96].

Las muestras de FAME producidos de forma indirecta en base seca a partir de AGL se analizaron con la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para determinar la conversión de lípidos saponificables a FAME. La Figura 4.2.12 ejemplifica los espectros de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos a partir de *Chlorella vulgaris* (Figura 4.2.12 A) y *Scenedesmus* sp. (Figura 4.2.12B) en agua residual de industria cervecera. La Tabla 4.2.5 muestra los resultados para las dos especies de microalgas analizadas en este estudio con los mejores disolventes extractores: cloroformo:metanol(1:2), metanol y etanol. Para el resto de los disolventes no hubo muestra suficiente para hacer la determinación de este análisis.



**Figura 4.2.12** Ejemplo de espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos a partir de los lípidos extraídos de la biomasa seca de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) cultivadas en agua residual de industria cervecera.

El grado de conversión de aceites de las especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de la industria cervecera hacia FAME se confirmó con el análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H. La Tabla 4.2.5 muestra que la conversión a FAME a partir de los lípidos presentó valores entre 84-93 % con el uso del catalizador homogéneo y con rangos de 83-97 % para el catalizador heterogéneo para los disolventes que mostraron mayor

capacidad de extracción de lípidos que fueron la mezcla CM (1:2), metanol y etanol; mientras que la conversión a FAME de los AGL extraídos solo se realizó a partir de metanol; para este caso resultó mejor el uso del catalizador heterogéneo con un valor de 91,33 % en comparación con el catalizador homogéneo con 88,67 %.

**Tabla 4.2.5** Conversión de FAME analizados por RMN-<sup>1</sup>H por el método indirecto

Especie	Disolvente	catalizador	% Conversión FAMES lípidos	% Conversión FAMES AGL
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cloroformo:metanol (1:2)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	92,67	*
		CT-269DR	83,33	*
	Metanol	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	85,33	88,67
		CT-269DR	99,33	91,33
	Etanol	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	84,67	*
		CT-269DR	96,67	*
<i>Scenedesmus</i> sp.	Cloroformo:metanol (1:2)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	52,67	*
		CT-269DR	43,33	*
	Metanol	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	48,67	51,33
		CT-269DR	54,00	34,67
	Etanol	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	54,67	*
		CT-269DR	58,00	*

\*: muestra sin reaccionar

La bibliografía disponible sobre el uso de la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para los lípidos de *C. vulgaris* cultivada estrictamente en agua de industria cervecera es escasa; sin embargo, en una investigación se cultivó *Chlorella vulgaris* en reactores tipo raceway empleando medio BG-11 para el cultivo durante 12 días con reposición de nutrientes a la mitad del cultivo. La extracción de lípidos con cloroformo:metanol (2:1) alcanzó un 12,39 % m/m de AGL, obteniendo 84,01 % de conversión a FAME mediante un proceso de dos pasos (una esterificación catalizada por ácido seguida de una transesterificación con catalizador básico). El análisis RMN-<sup>1</sup>H mostró fuertes señales a  $\delta=3,66$  ppm que confirman la presencia de protones del grupo metilo característico de biodiésel. Asimismo, se apreciaron múltiples resonancias a  $\delta= 0,86-0,88$  ppm que representan protones de metilos terminales (C- CH<sub>3</sub>), a  $\delta=5,3$  ppm que indican protones unidos a carbonos olefínicos (un enlace doble), a  $\delta=1,61$  ppm que indica la presencia de protones  $\beta$ -metilénicos unidos a enlaces ésteres y fuerte resonancia a  $\delta=1,30$  ppm que indica la presencia de protones de metilenos en la cadena principal del ácido graso. Esto junto a la ausencia de picos de glicéridos a  $\delta=4,2-4,3$  ppm confirman la conversión a biodiésel [288]. Los picos anteriormente indicados coinciden con el espectro que se muestra en la Figura 4.2.12 A para *Chlorella vulgaris*.

Para la especie *Scenedesmus* sp. los resultados de la Tabla 4.2.5 muestran los resultados de la conversión a FAME de forma indirecta a partir de los lípidos extraídos con la mezcla cloroformo:metanol (1:2), etanol y metanol, los valores se encuentran en el rango de 48-54 % para el catalizador homogéneo y en rangos de 43-58 % para el catalizador heterogéneo. En cambio, la conversión a FAME de los AGL extraídos resultó mejor con el uso del catalizador heterogéneo con un valor de 91,33 % en comparación con el catalizador homogéneo con 88,67 %. Los altos valores de conversión con el uso de la resina CT-269 ha sido reportado por otros investigadores, resaltando propiedades texturales, de estabilidad térmica y recuperación y reutilización de la misma [256].

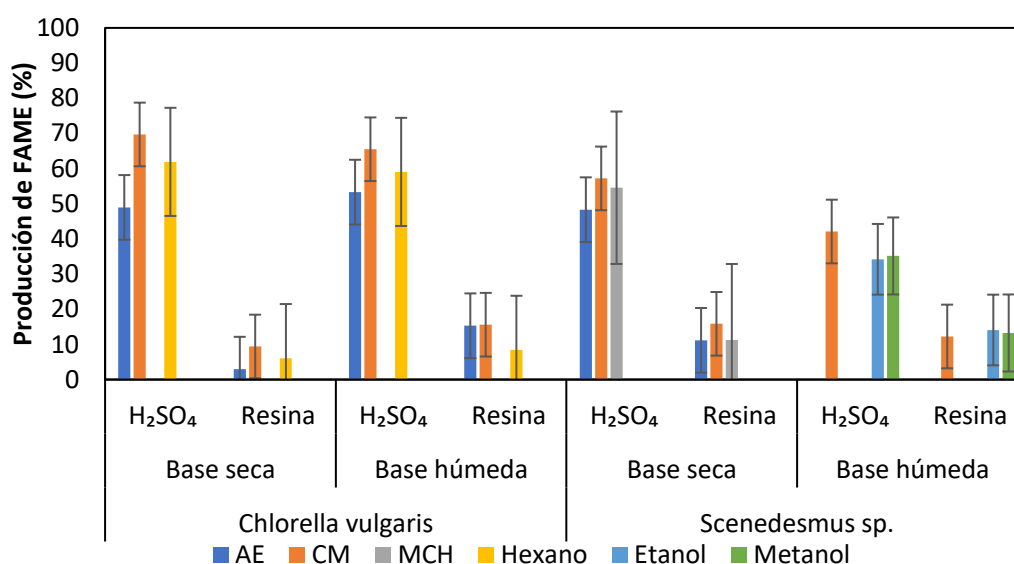
No se encontraron publicaciones que usaran la técnica de RMN-<sup>1</sup>H en agua residual de industria cervecera; sin embargo, Das et al.; (2022) reportan el uso de otras especies de la familia *Scenedesmaceae* cultivadas en otros tipo de aguas residuales. La especie *Desmodesmus maximus* se cultivó en cuatro tipos de aguas residuales: porcinas, lácteas, municipales y avícola, durante 10 días de cultivo. El agua residual porcina arrojó los mejores valores en cuanto a rendimiento de biomasa y de lípidos. La reacción de transesterificación fue catalizada con un nanocatalizador de óxido de calcio (CaO) sintetizado a partir de cáscaras de huevo calcinadas. La conversión de lípido de algas a biodiésel fue de 99 % y se comprobó mediante RMN-<sup>1</sup>H por la presencia de un pico a 3,6 ppm y tres picos próximos a 2,3 ppm relacionados a la presencia de protones metoxi (-OCH<sub>3</sub>) y protones metilénicos α-CH<sub>2</sub>, respectivamente [291].

### **c) Agua residual de piscicultura**

La Figura 4.2.13 compara los porcentajes de FAME producidos de manera indirecta a partir de los lípidos extraídos de biomasa seca y húmeda de ambas microalgas cultivadas en agua residual de piscicultura. Como se puede observar en dicha figura, claramente se aprecian dos aspectos importantes: el ácido sulfúrico dio lugar a mayores porcentaje de FAME respecto de la resina comercial, y los porcentajes de producción de FAME en base seca y húmeda no presentan grandes diferencias. Los mayores porcentajes de FAME corresponden a los lípidos extraídos en base seca con la mezcla CM (1:2) con la que se alcanzaron valores de  $69,70 \pm 0,71$  %; en segundo lugar, los lípidos extraídos con hexano que generaron  $61,90 \pm 1,70$  % de FAME y; en tercer lugar, los lípidos extraídos con AE con producciones de  $48,95 \pm 0,35$  % de FAME usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador. El resto de los disolventes registró valores de lípidos que produjeron menos del 40 % de FAME. Usando la resina comercial, resaltan los lípidos extraídos con la mezcla CM (1:2), la cual dio lugar al mayor porcentaje de FAME con un valor de  $9,40 \pm 1,70$  % y los lípidos extraídos

con hexano los cuales produjeron de  $6,1 \pm 2,55$  % de FAME. El resto de los lípidos dieron lugar a valores de producción de FAME menores de 5 %.

En cuanto a los porcentajes de FAME obtenidos de manera indirecta a partir de lípidos extraídos de biomasa húmeda para *C. vulgaris*, los resultados son mejores para el  $H_2SO_4$  respecto de la resina. Puede apreciarse que con el catalizador homogéneo y con los lípidos extraídos con la mezcla CM se alcanzaron valores de FAME de  $65,5 \pm 0,99$  %, seguido de los lípidos extraídos con hexano y AE que produjeron  $59,05 \pm 1,06$  % y  $53,30 \pm 0,99$  % de FAME, respectivamente. Con el resto de los lípidos se alcanzaron valores de producción de FAME menores al 40 %. Con el uso de la resina CT-269 se alcanzaron porcentajes de FAME de  $15,60 \pm 1,98$  % y  $15,30 \pm 13,57$  % con los lípidos extraídos a partir de la mezcla CM (1:2) y AE, respectivamente. Con los lípidos extraídos con el resto de los disolventes se obtuvieron valores de producción de FAME menores al 10 %.



**Figura 4.2.13** Porcentaje de producción de FAME de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* cultivadas en agua residual de piscicultura a partir de lípidos

A partir de la biomasa seca de la especie *Scenedesmus sp.* se observa en la Figura 4.2.13 que con el uso del catalizador homogéneo ( $H_2SO_4$ ) se obtienen los valores más altos de producción de FAME con los lípidos extraídos con la mezcla CM (1:2) ( $57,20 \pm 18,24$  %), seguido de los valores para la producción de FAME a partir de lípidos extraídos con MCH ( $54,55 \pm 2,33$  %) y AE ( $48,30 \pm 2,83$  %); el resto de los disolventes reportó porcentajes de FAME menores al 40 %.

En el caso de los lípidos de biomasa húmeda de *S. sp.* con el catalizador homogéneo, la producción de FAME con valores más altos corresponden a la de los lípidos extraídos con la



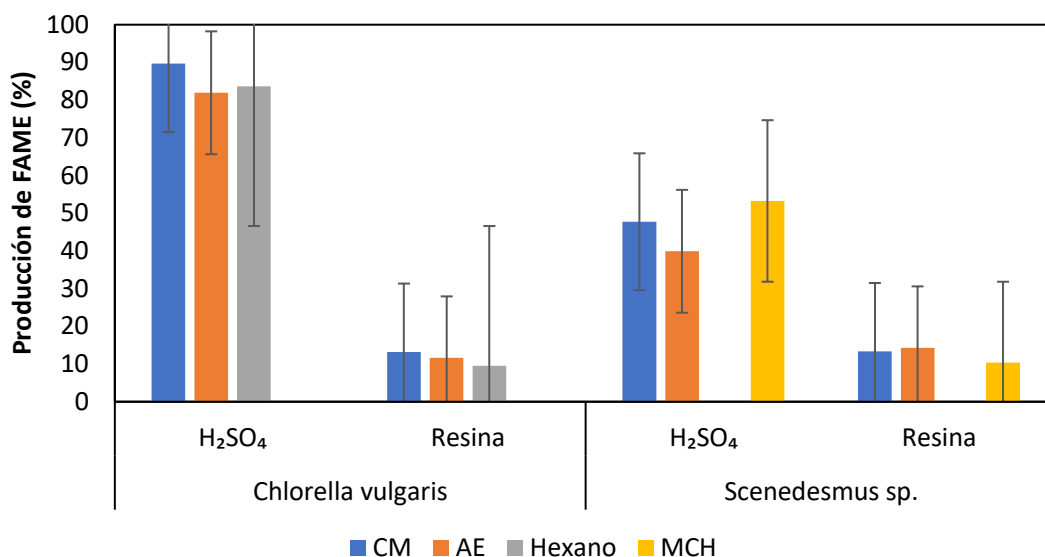
mezcla CM (1:2) ( $42,10 \pm 0,57$  %), metanol ( $35,15 \pm 1,06$  %) y etanol ( $34,20 \pm 1,13$  %). Con el uso de la resina como catalizador los mejores resultados para la biomasa seca fueron con los lípidos extraídos con los disolventes CM (1:2) ( $15,85 \pm 0,21$  %), metanol ( $11,20 \pm 0,67$  %) y etanol ( $11,15 \pm 0,21$  %). El rendimiento a FAME por el método indirecto con lípidos procedentes de biomasa húmeda no presentó diferencias respecto de la biomasa seca, y los resultados para los mismos disolventes extractores fueron:  $12,25 \pm 0,07$  % para CM (1:2);  $13,25 \pm 0,5$  % para metanol y  $14,1 \pm 0,99$  % para etanol.

Los resultados anteriores muestran la alta eficiencia del ácido sulfúrico hacia la producción de FAME para los lípidos extraídos de ambas especies en este tipo de agua residual; este catalizador es ampliamente utilizado en la producción de FAME en microalgas cultivadas en medios de cultivos muy diversos [193,290,291]. Sin embargo, llama la atención el bajo rendimiento para la resina en este tipo de agua para ambas especies. Se sospecha de algún problema en la temperatura de la reacción de transesterificación o la presencia de residuos sólidos productos de una mala separación en las etapas previas. Respecto de los porcentajes de FAME producidos y el tipo de disolvente que extrajo los lípidos de partida, se observa una tendencia hacia disolventes de baja polaridad que son capaces de disolver compuestos moderadamente hidrófobos como alcaloides, esteroides y ácidos grasos [256].

También se determinó el porcentaje de FAME producidos a partir de AGL extraídos de la biomasa seca para ambas especies y los resultados se muestran en la Figura 4.2.14 en la que para la especie *C. vulgaris* se observan mejores valores para el  $H_2SO_4$  respecto de la resina. Los disolventes empleados durante la extracción de AGL también tuvieron efecto en los porcentajes de FAME, resultando mejores porcentajes con los AGL extraídos con la mezcla CM (1:2), el hexano y el AE con valores de  $89,65 \pm 2,66$  %,  $83,65 \pm 2,76$  % y  $81,95 \pm 0,35$  %, respectivamente con el uso del  $H_2SO_4$ . La resina alcanzó valores de FAME a partir de AGL menores al 15 %, resaltando los mismos disolventes: los lípidos extraídos con el uso de CM, AE y el hexano con valores de  $13,20 \pm 1,27$  %,  $11,65 \pm 0,21$  % y  $9,55 \pm 0,92$  %, respectivamente. Con estos resultados se confirma la tendencia en la afinidad hacia los disolventes de baja polaridad como AE y MCH y de polaridad intermedia como la mezcla CM (1:2) tanto en la extracción de lípidos como en la producción de FAME.

En la Figura 4.2.14 también se muestra el porcentaje de producción de FAME a partir de AGL extraídos de biomasa seca de *Scenedesmus* sp. en la que se aprecian mejores resultados con el uso del ácido sulfúrico como catalizador de la reacción, y los mayores porcentajes correspondieron a los lípidos extraídos con MCH ( $53,25 \pm 0,21$  %), CM (1:2) ( $47,75 \pm 23,26$  %) y

AE ( $39,90 \pm 0,28$  %). El resto de los disolventes presentó rendimientos menores al 36 %. Con el catalizador heterogéneo, los mejores rendimientos corresponden a los FAME producidos a partir de AGL extraídos con AE ( $14,3 \pm 3,54$  %), la mezcla CM (1:2) ( $13,35 \pm 0,21$ ) y MCH ( $10,40 \pm 0,92$  %). El resto de los disolventes presentó rendimientos entre 8-11 %.



**Figura 4.2.14** Porcentaje de producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* cultivadas en agua residual de piscicultura con el método indirecto a partir de AGL

Los resultados de FAME producidos por *C. vulgaris* en agua residual de piscicultura demuestran el mayor rendimiento del  $H_2SO_4$  versus la resina comercial CT-269DR, y la bibliografía sugiere que el  $H_2SO_4$  no se ve afectado negativamente por la presencia de AGL, a diferencia de los catalizadores heterogéneos. Catalizadores homogéneos como el  $H_2SO_4$  catalizan simultáneamente las reacciones de esterificación y transesterificación para la obtención de biodiésel, y pueden convertir fácilmente materias lipídicas con concentraciones de AGL mayores a 6 %, a pesar de que la reacción sea más lenta que la del catalizador heterogéneo [292]. Otros autores han empleado al ácido sulfúrico como catalizador reportando rendimientos de FAME de 53,1 % y destacan su eficacia para convertir triacilglicerol y AGL a FAME [293]; por esta razón se justifica mayores porcentajes de FAME a partir de AGL en la extracción indirecta.

La literatura menciona que el rendimiento de las reacciones de transesterificación depende de varios parámetros que incluyen la temperatura, el tiempo de reacción, el catalizador empleado (ácido, básico o enzimático), relaciones biomasa: catalizador, tipo de alcohol, tipo de biomasa o aceite, entre otros [118]. En el presente estudio, todas las reacciones de transesterificación se ejecutaron a 90 °C y esto pudo haber influenciado en los resultados de

FAME, ya que se mantuvieron por debajo del 90 %. Belkhanchi et al., (2021) reportan que menores temperaturas pueden mejorar el rendimiento de FAME; por ejemplo, el uso de aceite de freír usado presentó rendimientos de 98,1 % a 18 °C y 91,02 % a 71 °C usando un catalizador básico (hidróxido de sodio – NaOH) [135].

También, algunos autores mencionan que tiempos de reacción entre 1 a 2 h presentaron rendimientos de FAME cercanos al 60,31 %; con tiempo de reacción de 3 h, la conversión se mantiene constante y tiempos de reacción más alargado no mejoraron el rendimiento manteniéndolo cerca del 60 % [293]. En el presente estudio, el tiempo de reacción empleado para las reacciones de transesterificación fue de 4 horas, y se cree que éstas condiciones pudieron desfavorecer el rendimiento de FAME.

La bibliografía sobre el porcentaje de producción de FAME a partir del método indirecto en especies cultivadas en aguas residuales de piscicultura o acuicultura es escasa. En otras investigaciones se han encontrado rendimiento de FAME de 85,6 % al emplear fertilizantes orgánicos disueltos en agua potable hasta concentraciones que simularan a un agua residual municipal que se empleó para el cultivo de la especie *C. vulgaris* con fines de producción de biodiésel [234]; dichos resultados son próximos al del presente trabajo. Además, en la caracterización de FAME de *C. vulgaris*, los mayores porcentajes de ésteres metílicos corresponden a ácidos grasos saturados como ácido palmítico, oleico y linoleico (C16:0, C18:1 y C18:2, respectivamente); y el 74 % corresponde a ácidos grasos insaturados (C16:1, C16:2, C18:1, C18:2, C18:3) que son importantes en la producción de biocombustibles ya que éste grupo de ácidos grasos mejoran las propiedades del biodiésel disminuyendo su punto de fluidez cuando se usa a bajas temperaturas, y mejorando el índice de cetano al proporcionar mayor calor de combustión [125].

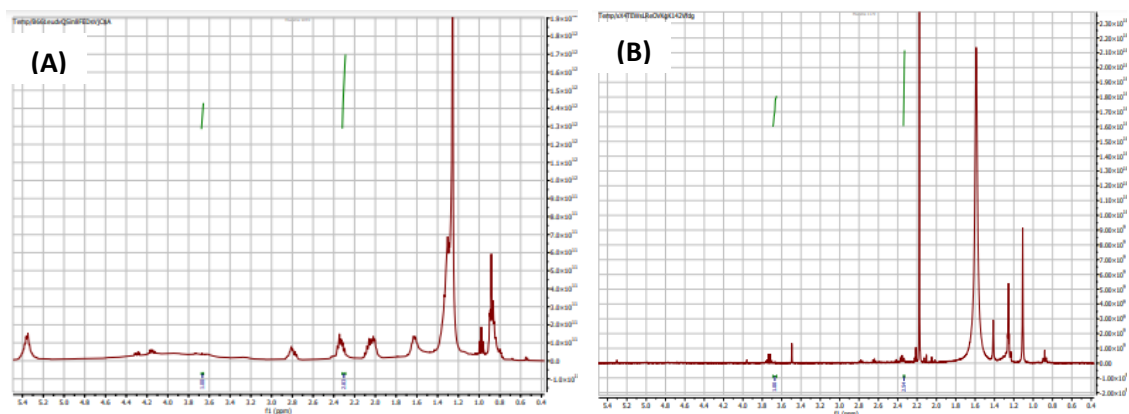
Los resultados de las Figura 4.2.13 y 4.2.14 muestran que el ácido sulfúrico resultó catalizar mejor la reacción de transesterificación para la conversión de lípidos y AGL a FAME, concordando con lo reportado en la bibliografía al comparar el rendimiento de FAME de este catalizador con otros catalizadores de naturaleza ácida, básica, homogéneos y heterogéneos con la especie *Chlorella* sp. [136]. Otros investigadores en cambio, han reportado rendimientos mayores a 97 % con el uso de la resina comercial CT-269DR en condiciones similares a la de este estudio con la especie *Isochrysis galbana* [96].

También, los rendimientos más altos para la biomasa seca frente a la biomasa húmeda son concordantes con los resultados de otros investigadores que han determinado el rendimiento a FAME de forma indirecta a partir de lípidos [119]. La biomasa húmeda presentó valores bajos

de FAME y esto puede estar relacionado a las complejidades que presenta la biomasa y el porcentaje de agua presente en ella. Sin embargo, otros autores que han trabajado con diferentes especies de microalgas resaltan que la vía húmeda resulta mejor energéticamente al evitarse la necesidad del secado de la biomasa; también resaltan que por la vía húmeda se obtiene mayor concentración de lípidos saponificables y un bajo contenido de lípidos insaponificables [96].

En comparación con las aguas residuales anteriores, en el agua residual de piscicultura se encontraron los más altos porcentajes de FAME producidos a partir del método indirecto; sin embargo, no son lo suficientemente altos para satisfacer el criterio establecido por la norma EN 14214 para el uso de biodiesel (96,5 %). Una opción para mejorar estos resultados es la purificación de lípidos y FAME con técnicas de cromatografía, aunque esto implica el aumento de los costes en la biorrefinería [96].

Las muestras de FAME producidos por el método indirecto en base seca se analizaron con la técnica de RMN-<sup>1</sup>H. La Figura 4.2.15 ejemplifica los espectros de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de los FAME producidos por el método indirecto para *Chlorella vulgaris* (Figura 4.2.15 A) y *Scenedesmus* sp. (Figura 4.2.15 B). La Tabla 4.2.6 muestra los resultados para las dos especies de microalgas analizadas en este estudio con los mejores disolventes extractores.



**Figura 4.2.15** Ejemplo de espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos a partir del método indirecto de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) cultivadas en agua residual de piscicultura.

La conversión de aceites de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. a FAME se confirmó con el análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, con la ausencia de picos de protones glicéridos entre 4,2-4,3 ppm y la presencia de picos característicos de grupos carbonil metilenos (-CH<sub>2</sub>-) a 2,2 ppm y picos de protones metoxi (CH<sub>3</sub>-) a 3,6 ppm que presenta la Figura 4.2.15 [287,288]. Para la especie *Chlorella vulgaris*, los resultados de la Tabla 4.2.6 muestran que los resultados de la conversión a FAME a partir de los lípidos extraídos para el método indirecto con valores en el

rango de 51-88 % con el uso del catalizador homogéneo y con rangos de 69-73 % para el catalizador heterogéneo con los tres mejores disolventes extractores de lípidos. La conversión a FAME de los AGL extraídos también fue mejor con el uso del catalizador homogéneo con rangos entre 69-83 % en comparación con el catalizador heterogéneo con valores de conversión entre 70-77 %.

**Tabla 4.2.6** Conversión de FAME analizados por RMN-<sup>1</sup>H obtenidos por el método indirecto

Espece	Disolvente	catalizador	% Conversión FAMEs lípidos	% Conversión FAMEs AGL
<i>Chlorella vulgaris</i>	CM (1:2)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	88,67	71,33
		CT-269DR	73,33	73,33
	Hexano	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	58,67	83,33
		CT-269DR	*	70,67
	AE	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	51,33	69,33
		CT-269DR	69,33	77,33
<i>Scenedesmus sp.</i>	CM (1:2)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	69,33	82,00
		CT-269DR	22,00	*
	MCH	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	70,00	88,00
		CT-269DR	N.D.	N.D.
	AE	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	67,33	79,33
		CT-269DR	39,33	N.D.

\*: muestra sin reaccionar; N.D. no determinado (sin presencia de picos)

Para la especie *Scenedesmus sp.*, los resultados de la conversión a FAME a partir de los lípidos, los valores se encuentran en el rango de 67-70 % para el catalizador homogéneo y en rangos de 22-39 % para el catalizador heterogéneo con los tres mejores disolventes extractores de lípidos. La conversión a FAME de los AGL extraídos también fue mejor con el uso del catalizador homogéneo con rangos entre 79-88 %. Para el caso del catalizador heterogéneo, sus valores no pudieron determinarse porque no se dio la reacción o no se presentaron picos. El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es el catalizador ampliamente usado en los procesos de producción de FAME por lo que no extraña sus altos porcentajes en la conversión a FAME de las muestras analizadas.

La bibliografía reporta un trabajo con la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en reactores abiertos tipo raceways que usó lípidos extraídos de la microalga que presentaron una conversión a FAME de 84,01 % bajo radiación microonda y 1,5 % en peso de catalizador básico con KOH usando condiciones optimizadas de 15 minutos de reacción, a 60 °C y relación metanol:aceite de 10:1; igualmente se caracterizó el aceite con la técnica de RMN-<sup>1</sup>H encontrando la ausencia de picos de protones glicéridos y la presencia de picos de carbonos metilos a 3,66 ppm que

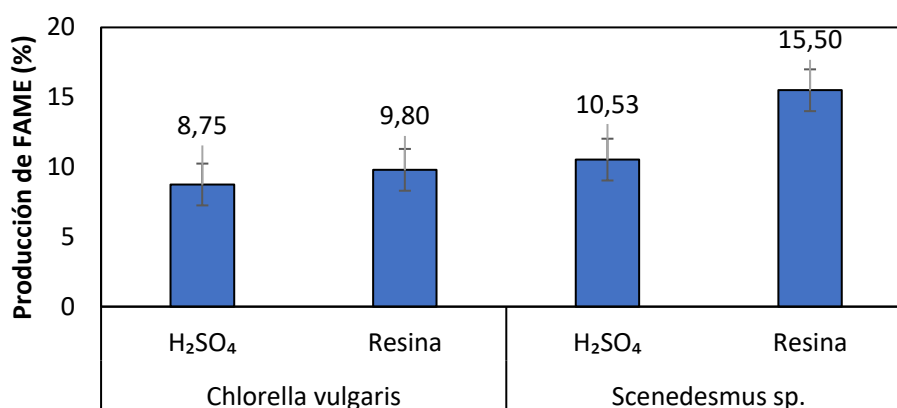
confirman la conversión de lípidos a biodiésel [288]. Estos valores se encuentran en el rango de los resultados encontrados para la misma especie en el presente trabajo, aunque con condiciones diferentes para la reacción de transesterificación.

Mukherjee et al.; (2022) indica que la conversión de FAME de lípidos a partir de lípidos extraídos con hexano y cloroformo fue de 90 % y 80 %, respectivamente para el proceso de verificación de las propiedades antioxidantes y antibacteriales de la especie *Scenedesmus obliquus*, y su caracterización cualitativa a partir de la técnica de RMN-<sup>1</sup>H mostró los picos distintivos de ésteres metílicos a 3,6 ppm, de carbonos  $\alpha$ - metilénicos a 2,3 ppm para las muestras de ambos disolventes [284].

#### 4.2.3.2 Método directo

##### a) Agua residual de industria porcina

A partir de la biomasa directa de las dos especies de microalgas se produjeron FAME para ambas especies cultivadas en ARFP; dichos resultados se muestran en la Figura 4.2.16.



**Figura 4.2.16** Porcentaje de producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* cultivadas en agua residual de industria porcina con el método directo

Para la especie *C. vulgaris* puede apreciarse que la obtención directa de FAME fue ligeramente mejor con el catalizador heterogéneo (resina CT-269DR) con un valor de  $9,80 \pm 0,71$  %, respecto del catalizador homogéneo ( $H_2SO_4$ ), el cual alcanzó producción de FAME de  $8,75 \pm 0,21$  %. La Figura también muestra que para la especie *S. sp.* la producción directa de FAME fue mejor con el catalizador heterogéneo (resina CT-269DR) con un valor de  $15,50 \pm 4,79$  %, respecto del catalizador homogéneo ( $H_2SO_4$ ), el cual alcanzó una producción de  $10,53 \pm 3,05$  %. Para ambas especie de evidencia un rendimiento muy bajo para la producción de FAME con el método directo; esto puede deberse a las barreras físicas y químicas presentes en la biomasa de

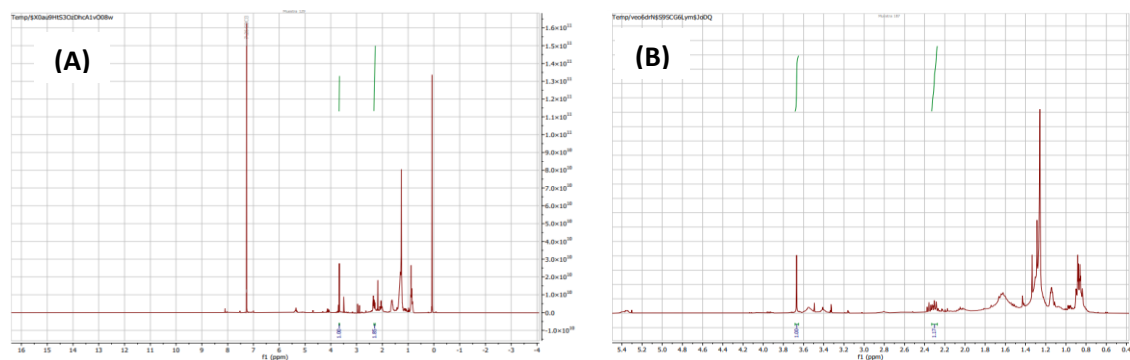
microalgas que no se tienen cuando se hacen procedimientos de extracción previo como en el método indirecto.

No se encontró bibliografía sobre el análisis de FAME producidos directamente a partir de microalgas cultivadas en aguas de industria porcina, aunque sí en otros tipos de medios de cultivos y aguas residuales. Otros autores optaron por realizar la producción de FAME por el método directo a partir de biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris* cultivada en el medio comercial BG-11. Los resultados de FAME total para los tratamientos se mantuvieron en el rango de 17-26 %. El estudio demostró el papel importante del P en la productividad de lípidos para la especie estudiada [294].

Otras especies del género *Scenedesmus* han sido analizadas en términos de su porcentaje de obtención de FAME, tal es el caso de la especie *Scenedesmus acuminatus* cultivada en agua residual procedente de la cría de cerdos cuyos resultados de FAME directos fueron de 54,65 % empleando ácido sulfúrico como catalizador y metanol como disolvente extractor [295]. Los resultados de este estudio con el uso de aguas residuales de industria porcina durante 11 días, sin dilución y sin reposición de nutrientes durante el tiempo de cultivo a escala de laboratorio evidencian que las especies de estudio no producen posteriormente valores de porcentajes en peso de FAME mediante el método directo con potencial para la obtención de biocombustibles; sin embargo, no se descarta el uso de este medio de cultivo con fines industriales, puesto que algunas variaciones en la etapa de cultivo, tales como dilución del agua residual original para reducir la carga orgánica y turbidez, suministro de aireación diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>, reposición de nutrientes y/o periodos de estrés por déficit nutricional, etc. podrían ayudar a mejorar los resultados [216,220,296].

Para verificar la conversión a FAME se realizó la caracterización de los FAME obtenidos de la biomasa directa con la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de protón RMN-<sup>1</sup>H para ambas especies en base seca y así poder determinar la conversión de lípidos saponificables a FAME. La Figura 4.2.17 ejemplifica los espectros de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos para *Chlorella vulgaris* (Figura 4.2.17A) y *Scenedesmus* sp. (Figura 4.2.17 B).

El grado de conversión de aceites de las especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en ARFP hacia FAME se confirmó con el análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, considerando la ausencia de picos de protones glicéridos entre 4,2-4,3 ppm y la presencia de picos característicos de grupos carbonil metilenos (-CH<sub>2</sub>-) a 2,2 ppm y picos de protones metoxi (CH<sub>3</sub>-) a 3,6 ppm que presenta la Figura 4.2.17 [287,288].



**Figura 4.2.17** Ejemplo de espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos a partir de la biomasa directa de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) cultivadas en agua residual de industria porcina.

**Tabla 4.2.7** Conversión de FAME por RMN-<sup>1</sup>H analizados con el método directo.

Especie	catalizador	% Conversión FAMES biomasa directa
<i>Chlorella vulgaris</i>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	53,33
	CT-269DR	80,67
<i>Scenedesmus</i> sp.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	54,00
	CT-269DR	80,53

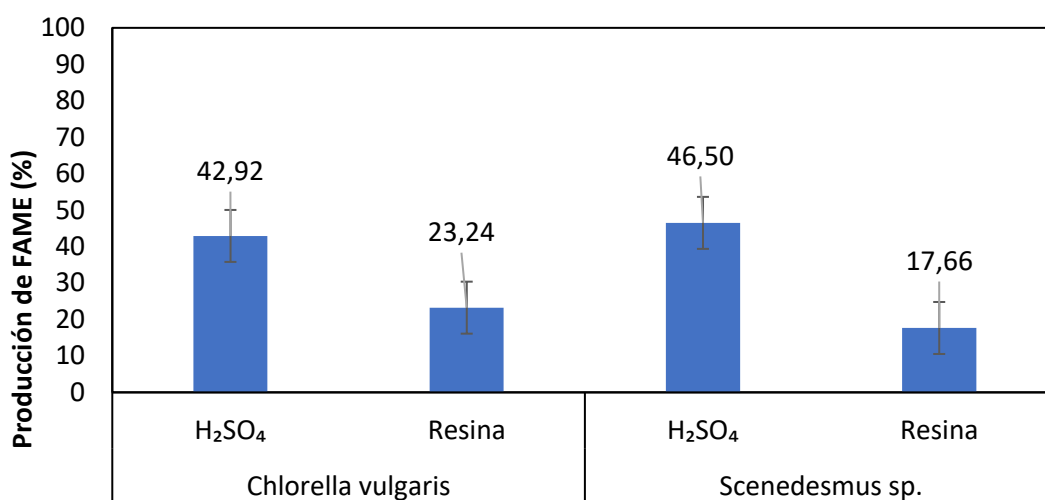
La Tabla 4.2.7 muestra los resultados para las dos especies de microalgas analizadas en este estudio con la biomasa directa; se aprecia en ambos casos que el catalizador heterogéneo (resina) tuvo resultados ligeramente mayores en comparación con el uso del catalizador homogéneo (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). No es común encontrar bibliografía específica sobre el uso de la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para los lípidos de *C. vulgaris* cultivada estrictamente en agua de industria porcina; sin embargo, otros autores han usado otros tipos de aguas residuales para el cultivo de especies del género *Chlorella* en aguas residuales. La especie *Chlorella sorokiniana* fue cultivada en agua residual no tratada diluida y no diluida de la industria láctea como una fuente de bajo coste para la producción de biodiésel. El perfil lipídico mostró una conversión a FAME de 73,68 ± 2,64 % a través de la transesterificación de los lípidos y los espectros de RMN-<sup>1</sup>H confirmaron la existencia de FAME característicos del biodiésel con señales en 3,42-3,60 ppm a que corresponden al grupo terminal -OCH<sub>2</sub>- de la parte glicérido del material lipídico, así como picos en las señales 5,23-5,29 ppm y 3,42-3,60 ppm correspondientes a carbonos insaturados y monoglicéridos [297].

#### **b) Agua residual de la industria cervecera**

La producción de FAME también se realizó de manera directa empleando biomasa microalgal seca de las dos especies cultivadas en agua residual de industria cervecera mediante la reacción

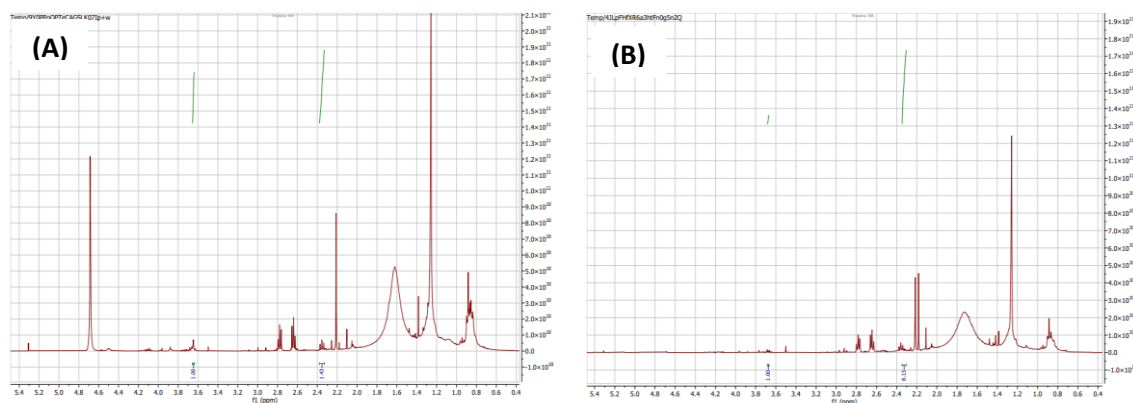


de transesterificación con dos tipos de catalizadores ácidos: uno homogéneo como el ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y uno heterogéneo (resina comercial CT-269DR). Los resultados de FAME por el método directo se muestran en la Figura 4.2.18. Para la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de industria cervecera se aprecia que en la producción directa de FAME fue mejor con el catalizador homogéneo empleando ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) con  $42,92 \pm 6,32$  %, mientras que el catalizador heterogéneo (resina CT-269DR) alcanzó un valor de producción de  $23,24 \pm 2,53$  %. En cuanto a la reacción con biomasa directa para *Scenedesmus* sp., los porcentajes de FAME fueron de  $46,50 \pm 4,01$  % para el catalizador homogéneo, y de  $17,66 \pm 2,14$  % con el uso de la resina comercial CT-269DR.



**Figura 4.2.18** Porcentaje de producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria cervecera con el método directo

Las muestras de FAME producidos de forma directa en base seca se analizaron con la técnica de RMN- $^1H$ . La Figura 4.2.19 muestra los espectros de RMN- $^1H$  para la determinación de FAME producidos para *Chlorella vulgaris* (Figura 4.2.19 A) y *Scenedesmus* sp. (Figura 4.2.19 B). La Tabla 4.2.8 muestra los resultados para las dos especies de microalgas analizadas con el método directo mostrando que para la biomasa directa de la especie *Chlorella vulgaris* el catalizador homogéneo ( $H_2SO_4$ ) tuvo resultados mayores en comparación con el uso del catalizador heterogéneo (resina). En cambio, para el caso de la especie *Scenedesmus* sp., los resultados de la Tabla 4.2.6 muestran que para la biomasa directa el catalizador heterogéneo obtuvo un resultado mayor en comparación con el uso del ácido homogéneo.



**Figura 4.2.19.** Ejemplo de espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos a partir de la biomasa directa de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus* sp. (B) cultivadas en agua residual de industria cervecera.

**Tabla 4.2.8** Conversión de FAME por RMN-<sup>1</sup>H analizados con el método directo.

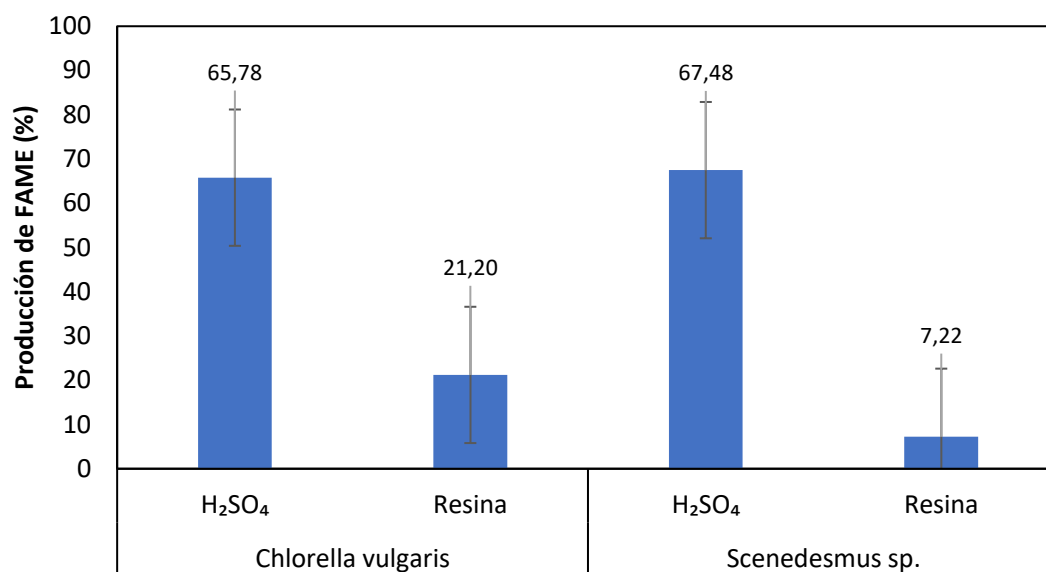
Especie	catalizador	% Conversión FAMES
		biomasa directa
<i>Chlorella vulgaris</i>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	95,33
	CT-269DR	92,67
<i>Scenedesmus</i> sp.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	42,00
	CT-269DR	67,33

En otra investigación se analizó el rendimiento a biodiésel de los lípidos generados por *Scenedesmus* sp. cultivada en medio BG-11. La reacción de transesterificación fue catalizada por un catalizador heterogéneo de óxido de calcio sintetizado a partir de cáscaras de huevo; la conversión a FAME se caracterizó mediante RMN-<sup>1</sup>H, observando la presencia de un pico a 3,9 ppm correspondiente a protones metoxi de ésteres metílicos (-OCH<sub>3</sub>) y picos a 2,3 ppm que confirman la presencia de protones α metilénicos (-α CH<sub>2</sub>-) [285].

### c) Agua residual de piscicultura

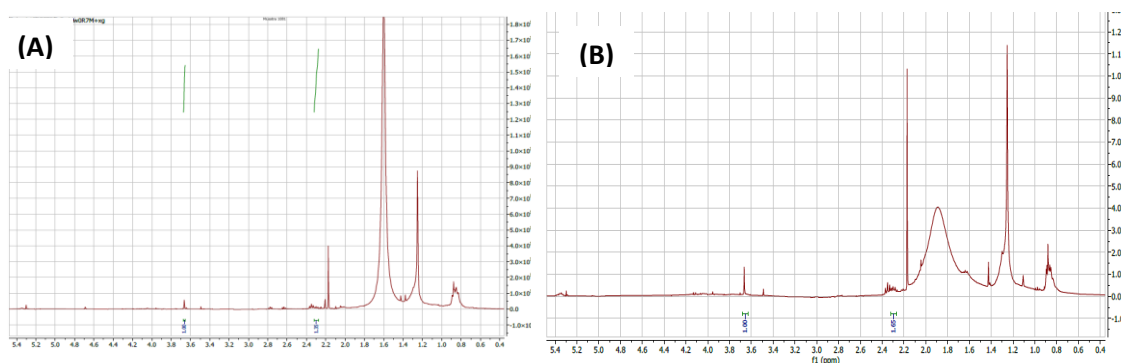
Para el caso de las microalgas crecidas en agua residual de piscicultura, también se determinaron los porcentajes de producción de FAME para ambas microalgas a partir de la transesterificación de la biomasa directa. Los resultados se muestran en la Figura 4.2.20 en la que se aprecia que para la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de piscicultura el porcentaje de producción de FAME fue superior con el catalizador homogéneo con un valor de 65,78 ± 29,33 %, respecto del catalizador heterogéneo el cual alcanzó una producción de 21,20 ± 0,66 %. En cuanto al método directo con la especie *Scenedesmus* sp., los porcentajes de

FAME fueron de  $67,47 \pm 3,01$  % para el catalizador homogéneo, y de  $7,22 \pm 2,76$  % con el uso de la resina comercial CT-269DR, de forma análoga a la anterior especie.



**Figura 4.2.20** Porcentaje de producción de FAME de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* cultivadas en agua residual de piscicultura a partir del método directo

Las muestras de FAME producidos de forma directa en base seca se analizaron con la técnica de RMN-<sup>1</sup>H con el propósito de determinar la conversión de lípidos saponificables a FAME. La Figura 4.2.21 muestra los espectros de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de los FAME producidos para *Chlorella vulgaris* (Figura 4.2.21 A) y *Scenedesmus sp.* (Figura 4.2.21B). La Tabla 4.2.9 muestra los resultados para las dos especies de microalgas analizadas en este estudio con los catalizadores empleados.



**Figura 4.2.21.** Ejemplo de espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos a partir de la biomasa directa de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus sp.* (B) cultivadas en agua residual de piscicultura.

**Tabla 4.2.9** Conversión de FAME por RMN-<sup>1</sup>H analizados con el método directo.

Especie	catalizador	% Conversión
		FAMES <small>biomasa directa</small>
<i>Chlorella vulgaris</i>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	90,00
	CT-269DR	85,33
<i>Scenedesmus</i> sp.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	77,33
	CT-269DR	80,00

La conversión de aceites de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. a FAME se confirmó con el análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, con la ausencia de picos de protones glicéridos entre 4,2-4,3 ppm y la presencia de picos característicos de grupos carbonil metílicos (-CH<sub>2</sub>-) a 2,2 ppm y picos de protones metoxi (CH<sub>3</sub>-) a 3,6 ppm que presenta la Figura 4.2.21 [287,288]. Los resultados de la Tabla 4.2.9 muestran que para la biomasa directa de la especie *Chlorella vulgaris* el uso del catalizador homogéneo obtuvo un resultado ligeramente superior en comparación con el uso de la resina. Para el caso de la especie *Scenedesmus* sp., la biomasa directa con el catalizador heterogéneo obtuvo un resultado mayor en comparación con el uso del catalizador homogéneo.

La bibliografía reporta conversión a FAME de 96,61 % con la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para la especie *Chlorella homosphaera* cultivada bajo condiciones de agotamiento de nitrógeno y con el uso de un catalizador heterogéneo sintetizado a partir de hojas de rábano calcinadas con una relación del 3 % en peso de catalizador y relación Metanol:aceite de 10:1 a 60 °C y 120 min de reacción [287]. En la transesterificación de *Chlorella vulgaris* con irradiación por microondas con metanol (MeOH) e hidróxido de potasio (KOH) como catalizador, la mayor conversión a FAME fue de 77,64 % empleando una relación biomasa:disolvente de 1:12, 2 % en peso del catalizador y 40 min de reacción [156].

Otros autores han empleado la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para la caracterización cualitativa de otras especies del género *Scenedesmus* con diferentes catalizadores y características del cultivo. Para la especie *Scenedesmus rotundus* se demostró la conversión de triglicéridos a ésteres metílicos de ácidos grasos con la existencia de picos característicos del grupo hidroxilo (-OH), enlaces de alcanos (C-H a 1,482 - 1,317 ppm), carbonos alfa (-CH<sub>2</sub> a 2,0; 2,32 y 2,76 ppm) próximos a carbonilos de FAME y grupos metoxi terminales (-OCH<sub>3</sub> a 3,29 - 3,6 ppm) y junto con el perfil lipídico de la especie, se determinó que la microalga tiene una cantidad elevada de ésteres metílicos entre C16 y C18 que ayudan a la producción de biodiésel de alta calidad [290].

Para *Scenedesmus* sp. también hay reportes de la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para la comprobación de la conversión a FAME. En la transesterificación ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador se alcanzó un rendimiento global de biodiésel de 59,11 % y un rendimiento de FAME de 96,5 %; asimismo, el espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostró los picos característicos de ésteres metílicos y protones -CH<sub>2</sub> a 3,66-3,7 ppm y 2,26-2,3 ppm, próximos a los picos de biodiésel comercial (3,66 y 2,31-2,28 ppm) y biodiésel de algas (3,66 y 2,32-2,28 ppm) [255]. Otros autores que han utilizado la misma especie de estudio con fines mixtos de biorremediación de aguas residuales domésticas y producción de biocombustibles bajo el enfoque de biorrefinería reportan un rendimiento de biodiésel de 97,5 %, y su caracterización a partir de la técnica de RMN-<sup>1</sup>H denotó la presencia de picos de ácidos grasos de cadena larga en el rango de 0,5-3,0 ppm, de grupos metil éster (1,12-3,65 ppm) y de componentes de ácidos grasos insaturados del biodiésel 5,148 ppm [298]. Los picos son concordantes con los mostrados por la especie *Scenedesmus* sp. en el presente estudio.

#### **4.3 Cultivo de consorcio de microalgas en agua residual de industria porcina**

Después de haber realizado los cultivos monoalgales en los tres tipos de aguas residuales considerados en la presente investigación, en la Tabla 4.3.1 se resumen los valores de los parámetros de crecimiento, de biorremediación y de contenido de lípidos más importantes hallados en la presente investigación. Los resultados indican que el cultivo en agua residual de piscicultura presenta buenos parámetros de concentración y productividad de biomasa y de lípidos; así como valores superiores para fines de biorremediación.

Como puede observarse en dicha tabla, el agua de industria porcina presentó los mayores valores de eliminación de metales pesados, principalmente hierro y cromo que se redujeron satisfactoriamente después del tratamiento con microalgas; y además, en este cultivo se obtuvo la mayor cantidad de biomasa, por ello en el siguiente apartado se seleccionó el agua de industria porcina para el estudio de cultivos en consorcio de microalgas, el cual algunos autores sugieren que aporta mejores condiciones al combinar especies de microorganismos que pueden potenciar la eliminación de nutrientes de aguas residuales y que además, ayudan a reducir costes asociados al mantenimiento de cultivo monoalgales [21,299].

El agua residual de agua de la industria porcina también se seleccionó como una opción para solventar un problema real de la gestión de este tipo de agua residual en negocios familiares dedicados a la industria porcina en el Ecuador. El grave problema ambiental de estas aguas residuales debe solventarse con urgencia, ya que dichos espacios no cuentan con plantas de tratamiento de sus aguas, sino que son descargadas a cuerpos de agua o al suelo. Incluso,

algunos lugares conocidos como “camales” operan en la clandestinidad, por lo que poder establecer el potencial de este tipo de agua residual como medio de cultivo para microalgas representa una opción para la disminución del impacto ambiental causado por esta actividad comercial. Lamentablemente no hay investigaciones publicadas en revistas indexadas sobre el impacto ambiental que genera este tipo de agua, únicamente se cuentan con algunas publicaciones generadas por reportajes en prensa impresa y de televisión. Por todo lo explicado anteriormente, se seleccionó el agua residual de la industria porcina para las pruebas que se realizaron con un consorcio de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

**Tabla 4.3.1** Resumen de características principales de cultivos individuales de microalgas en las aguas residuales consideradas en el presente estudio

Tipo de agua residual	Especie de microalga	Concentración de biomasa (g/L)	Eliminación de nutrientes (%)	Eliminación de metales (%)	Contenido de lípidos (%)	AGL (%)
Industria porcina Agua residual filtrada y autoclavada	<i>Scenedesmus</i> sp.	0,6206	NT: 68,79 PT: 60,34 COT: 60,92 DQO: 76,4	Ca: 58,89 Cr: 80 Mo: 50 Fe: 94,94	18,91 extraídos con MCH	28,02 ± 1,70 extraídos con MCH
	<i>Chlorella vulgaris</i>	0,665	NT: 87,29 PT: 53,88 COT: 73,99 DQO: 77,80	Ca: 61,91 Cr: 80 Mo: 50 Fe: 96,28	21,49 extraídos con C:M (1:2)	34,92 ± 0,02 extraídos con MCH
Industria cervecera Agua residual filtrada y autoclavada	<i>Scenedesmus</i> sp.	0,4927	NT: 71,43 PT: 66,80 COT: 39,33 DQO: 80,64	-	19,26 extraídos con C:M (1:2)	42,84 ± 5,03 extraídos con metanol
	<i>Chlorella vulgaris</i>	0,6095	NT: 20,61 PT: 22,82 COT: 7,98 DQO: 78,82	-	17,79 ± 1,57 extraídos con C:M (1:2)	38,69 ± 0,60 extraídos con metanol
Piscicultura Agua residual filtrada y autoclavada	<i>Scenedesmus</i> sp.	0,3891	NT: 98,81 PT: 97,88 COT: 94,91 DQO: 1	Ca: 18,75 Fe: 57,53	30,26 extraídos con metanol	42,13 ± 13,62 extraídos con C:M (1:2)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	0,5869	NT: 93,77 PT: 91,96 COT: 93,43 DQO: 59,12	Ca: 12,5 Fe: 76,71	23,02 extraídos con C:M (1:2)	46,56 ± 3,33 extraídos con acetato de etilo

### **4.3.1 Tratamiento de las aguas residuales de la industria porcina con consorcio de microalgas**

#### **4.3.1.1 Caracterización del agua residual antes y después del cultivo de microalgas**

Como se explicó anteriormente, el agua residual de la industria porcina puede ser una alternativa prometedora para el cultivo de microalgas al eliminar el uso de fuentes naturales de aguas y presentar buenos resultados en cuanto a la eliminación de parámetros como DQO, DBO y otras cargas contaminantes de este tipo de aguas residuales como excesos en NT, PT, COT y metales pesados [152].

En este sentido y de forma análoga a los cultivos monoalgales, el agua residual de la industria porcina se analizó en términos de la concentración de macronutrientes (NT, PT, COT, DQO, N-NH<sub>4</sub>, pH, etc.), así como en cuanto a concentración de metales presentes. El medio de control empleado para la comparación de valores de macronutrientes fue el medio Bold's Basal Medium (BBM); ampliamente empleado en el cultivo de microalgas. Nuevamente se realizó la verificación de la viabilidad del agua residual de la industria porcina como medio de cultivo para el consorcio de las microalgas de estudio mediante una comparación directa de los parámetros analizados del agua residual y del medio de control.

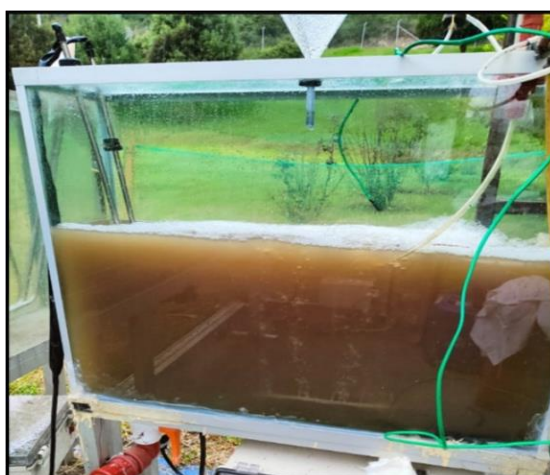
En la Tabla 4.3.2 se muestran los resultados de la caracterización inicial del agua residual de la industria porcina y del medio de control BBM previo al cultivo en consorcio de microalgas de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. En la Tabla 4.3.2, los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar. A partir de la comparación realizada puede observarse que, con excepción del PT, el contenidos de NT y COT es más alto en el agua residual de la industria porcina respecto del medio BBM.

Los cultivos en los fotobiorreactores se realizaron entre los meses de octubre de 2022 y enero de 2023, expuestos a las condiciones ambientales de la ciudad de Quito en Ecuador. El volumen del cultivo era de 60 L, empleando el 60-80 % del volumen del fotobiorreactor para dejar el espacio necesario para intercambio gaseoso y/o la posible formación de espumas por el suministro de aireación. En los fotobiorreactores se colocó inóculo de consorcio de microalgas (cultivadas originalmente en un recipiente de 1 L agregando partes iguales de cada especie durante 7 días) y agua residual de faenamiento previamente esterilizada en una proporción 1:10. Se mantuvo una aireación constante proporcionada por un compresor y diariamente se realizó control de pH y toma de muestras para análisis de cinética de crecimiento y peso seco. Con el fin de reducir costes en la etapa de cultivo, no se realizó reposición de medio durante los días de cultivo. La Figura 4.3.1 muestra el fotobiorreactor para el cultivo en consorcio expuestos a la intemperie en la ciudad de Quito – Ecuador.

**Tabla 4.3.2** Concentración inicial de macronutrientes principales, metales y otros parámetros fisicoquímicos presentes en el agua residual de la industria porcina y el medio BBM previo al cultivo de las especies de microalgas de estudio en consorcio.

Parámetros Fisicoquímicos	ARFP	BBM
Nitrógeno Total (mg/L N)	49 ± 1, 41	34,5 ± 2,83
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	18,45 ± 0,07	127,8 ± 0,42
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	80,2 ± 4,94	4 ± 0,01
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	464 ± 16	255,05 ± 9,5
Calcio (mg/L)	23,89 ± 0,72	9,43 ± 0,57
Cobre (mg/L)	0,059 ± 0,004	0,014 ± 0,001
Cromo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,02 LD
Hierro (mg/L)	1,88 ± 0,11	0,19 ± 0,01
Molibdeno (mg/L)	< 0,1 LC	< 0,1 LD
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	71,97	1,23
Níquel (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05 LC
Plomo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,004 LD
Potasio (mg/L)	25,1 ± 1,7	95,70 ± 6,98
Sodio (mg/L)	50,3 ± 3,2	105,95 ± 7,72
Turbidez (NTU)	473	0,15
pH	7,02 ± 0,6	7,01 ± 0,2

LD: Límite de Detección. LC: límite de cuantificación



**Figura 4.3.1** Imagen del fotobiorreactor con el cultivo en consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en agua residual de industria porcina.

Al finalizar los cultivos, se realizó la cosecha de estos y se eliminó el exceso de agua con centrifugaciones sucesivas para obtener la biomasa de microalgas. El líquido sobrenadante se almacenó para ser analizado y evaluar la capacidad de biorremediación de las microalgas con la eliminación de nutrientes y metales del medio. La biomasa microalgal recolectada fue analizada



en términos de su composición elemental en base seca y en contenido de lípidos totales, ácidos grasos libres (AGL).

**Tabla 4.3.3** Eliminación de nutrientes en el agua residual de la industria porcina por el consorcio de las especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

Parámetros Fisicoquímicos	Concentración Inicial	Concentración Final	Eliminación Total (%)
Nitrógeno Total (mg/L N)	48,33 ± 1,53	4,00 ± 2,00	91,72
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	18,57 ± 0,321	7,07 ± 0,51	61,93
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	85,67 ± 3,51	15,67 ± 2,52	81,71
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	464 ± 16	317 ± 4	31,68
Calcio (mg/L)	23,89 ± 0,72	17,64 ± 0,07	26,16
Cobre (mg/L)	0,059 ± 0,004	0,03 ± 0,002	49,15
Cromo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,01 LD	80
Hierro (mg/L)	1,88 ± 0,11	0,33 ± 0,02	82,45
Molibdeno (mg/L)	< 0,1 LC	0,04 ± 0,003	60
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	73,77	8,19 ± 0,49	88,89
Níquel (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05	*
Plomo (mg/L)	< 0,05 LC	< 0,05 LD	*
Potasio (mg/L)	25,1 ± 1,7	43,15 ± 2,93	-
Sodio (mg/L)	50,3 ± 3,2	44,00 ± 3,56	12,52

LC: Límite de cuantificación. LD: Límite de Detección. \*Valores fuera de rango. -Sin eliminación

La Tabla 4.3.3 muestra los porcentajes de eliminación de los parámetros fisicoquímicos analizados del agua residual de la industria porcina tomando en cuenta los valores al inicio del cultivo y en el sobrenadante final al cabo de 13 días para el consorcio de microalgas de estudio. Se aprecia una eliminación mayor al 60 % para los macronutrientes principales. La eliminación de metales como hierro y cromo también es alta (> 80 %), lo cual es una buena condición con fines de biorremediación del agua.

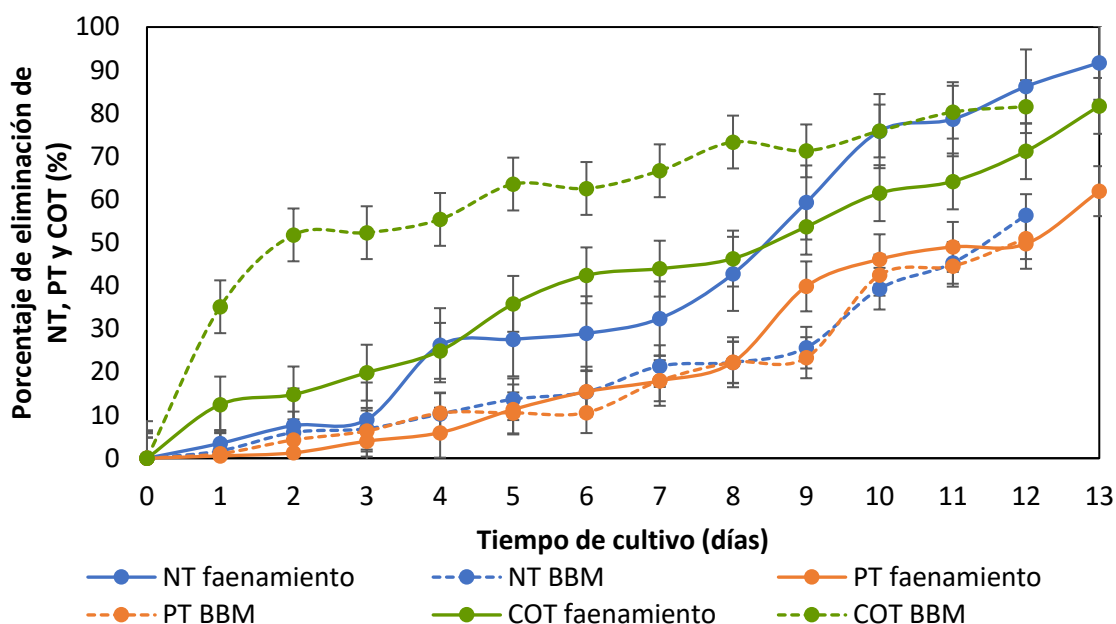
La Figura 4.3.2 muestra los porcentajes de eliminación de macronutrientes (NT, PT y COT) del cultivo en consorcio en agua residual de industria porcina y en el medio de control. El análisis del contenido de nutrientes muestra porcentajes altos de eliminación de nutrientes a lo largo de los 13 días de cultivo en el agua de la industria porcina y su control en medio BBM para las especies *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio. En la Figura 4.3.2, se observa una eliminación de NT de 91,72 % en el día 13, correspondiente a una concentración final de NT de 4,00 ± 2,00 mg/L N. Por su parte el medio BBM alcanzó una eliminación de dicho nutriente del 56,41 % después de 12 días de cultivo, correspondiente a una concentración inicial y final de 39,00 ± 2,00 mg/L N y 17,00 ± 2,00 mg/L N, respectivamente. La Figura 4.3.2 también muestra

el porcentaje de eliminación de PT y COT al cabo de 13 días de cultivo en los que se consiguió eliminar el 61,93 % del PT presente, dejando una concentración de  $7,07 \pm 0,51$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$  de PT en el día 13. El medio BBM tuvo una eliminación de 50,94 %, correspondiente a una concentración inicial y final de  $31,36 \pm 0,56$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $15,38 \pm 0,55$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ , respectivamente. La eliminación de COT fue de 81,71 %, con una concentración de COT final de  $15,67 \pm 2,52$  mg/L C. En el medio BBM la reducción fue del 81,54 % del COT en el medio, correspondiente a concentraciones iniciales y finales de  $130,00 \pm 8,00$  mg/L C y  $24,00 \pm 2,00$  mg/L C, respectivamente.

En el caso de micronutrientes y metales pesados, los resultados de la Tabla 4.3.3 indican eliminaciones mayores al 80 % de nitrógeno amoniacal, Fe y Cr del medio de cultivo; eliminación del 60 % del Mo presente en el medio, y reducciones menores del 50 % para Cu, Ca y Na. Para K se observó un incremento de concentración; mientras que para Ni y Pb no fue posible calcular el porcentaje de eliminación ya que las concentraciones estuvieron fuera del rango de sensibilidad de la técnica de análisis empleada.

Diversos estudios demuestran que el N es un factor limitante para el crecimiento de microalgas por lo que concentraciones óptimas de N en el medio de cultivo permite la síntesis de metabolitos de la microalga y su crecimiento; sin embargo, concentraciones de N mayores de 150 mg/L, son tóxicas para las microalgas [191]. Por su parte, el P también es importante para el crecimiento de microalgas y su eliminación en el medio de cultivo está asociada al almacenamiento de fosfatos en el citoplasma (en forma de polisacáridos, lípidos y polímeros, principalmente), crecimiento celular y biosorción a través de la pared celular [102]. La eliminación de estos nutrientes en aguas residuales es importante puesto que su inadecuada eliminación podría conducir a la eutrofización de las aguas o daños ambientales [300].

En la presente investigación, se cultivó un consorcio de microalgas de las especies *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en agua residual de industria porcina con concentraciones de NT similar al del medio control (Medio BBM), pero con deficiencias de PT respecto del control. Los resultados de la eliminación de NT (91,72 %) y PT (61,93 %) en el cultivo en consorcio son mayores frente a los valores para estos mismos parámetros para los cultivos monoalgales en el mismo tipo de agua residual (*Chlorella vulgaris*: NT: 87,29 %; PT: 53,88 % y *Scenedesmus* sp.: NT: 68,79 %; PT: 60,34 %) obtenidos en este trabajo doctoral (sección 4.1).



**Figura 4.3.2** Porcentaje de eliminación de nutrientes en términos de NT (mg/L N vs. Tiempo), de PT (mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  vs. Tiempo) y COT (mg/L C vs. Tiempo) del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria porcina durante 13 días.

Algunos autores reportan que los cultivos en consorcio pueden llegar a alcanzar más del 15 % en eficiencias de eliminación, e incluso menores tiempos de cultivo y tiempos de retención hidráulica [21,30,299,301,302]. Un grupo de investigadores etíopes realizaron un estudio similar al presente cultivando especies de *Chlorella* y *Scenedesmus* de manera individual y en consorcio, en agua residual de matadero anaeróbicamente tratada (no se indican las especies ni la procedencia del agua del matadero), encontrando rangos de eliminación de NT: 96,74-97,47 %;  $\text{N-NO}_3^-$ : 91,49-92,91 % y  $\text{N-NH}_4^+$ : 97,94-99,46 % [303]. Estos valores son comparables a los encontrados en la presente investigación, pudiendo estar relacionados estos resultados al tratamiento anaerobio del agua residual de faenamiento de la investigación citada.

Hernández et al., (2016) emplearon agua residual de la industria porcina para el cultivo de un consorcio de microalga-bacterias en dos estanques de algas de alta tasa (high rate algal ponds por su nombre en inglés), de 75 L con condiciones controladas de temperatura dentro del laboratorio y en invernaderos con fines de aplicaciones en el área de biocombustibles. El agua residual de la industria porcina (ST:  $753 \pm 18$  mg/L, DQOT:  $1621 \pm 81$  mg/L,  $\text{N-NH}_4^+$ :  $9,2 \pm 0,5$  mg/L, PT:  $1,4 \pm 0,1$  mg/L) se diluyó tres veces con agua corriente antes de realizar el cultivo. El consorcio estuvo conformado por microalgas de las especies *Chlamydomonas subcaudata*, *Anabaena* sp., *Phormidium tergestirum* y *Nitzschia* sp., junto con bacterias procedentes de lodo aeróbico tomado del reactor de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas

residuales. Los estanques o reactores tuvieron una eliminación de DQO y PT de 92 % y 71 %, respectivamente para los reactores ubicados en laboratorio y de 86 % y 91 % para los reactores ubicados en invernaderos [41].

En otro estudio en Brasil, Pompei et al., (2023) cultivaron consorcios de microalgas y cianobacterias nativas en un efluente de agua residual anaeróbicamente tratada de una planta depuradora de aguas. *Tetrademus* sp. y *Mychonastes homosphaera* fueron las especies dominantes durante el estudio realizado en fotobiorreactores interiores y expuestos a la intemperie. Tras de 7 días de cultivo la eliminación de NT y PT fue de 85 % y 88 %, respectivamente. Los autores asocian esta alta eliminación con las condiciones de alta irradiancia ( $1600 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) y temperatura ( $30,4 \pm 3,8 \text{ }^\circ\text{C}$ ), característica de zonas tropicales [81].

Entre los consorcios más estudiados se encuentra el consorcio microalga-bacteria, el cual incluye un conjunto de interacciones que favorecen el rendimiento en el tratamiento de aguas residuales, con incrementos en la eliminación de nutrientes. Estas interacciones, en algunos casos simbiótica y en otros casos antagónica, incluyen transferencia de masa, energía y genes [21,304]. Sin embargo, otros tipos de consorcios también han demostrado ser eficientes para la eliminación de nutrientes; tal es el caso de consorcios microalgas-levaduras, microalgas-hongos, microalgas-cianobacterias, comunidades microbianas, etc. [21,30,79,301,305,306]. Además, el uso de consorcios contribuye a la reducción de costes correspondientes a la etapa de esterilización de las aguas residuales como medios de cultivo.

En la presente investigación, el consorcio se mantuvo en un cultivo mixotrófico empleando luz como fuente de energía y fuentes de carbono orgánico e inorgánico de manera simultánea. El suministro de  $\text{CO}_2$  se realizó con aireación mediante burbujeo de aire filtrado del ambiente como principal fuente de carbono inorgánico, y el agua residual de faenamiento aportó el carbono orgánico. Al cabo de 13 días, el consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. alcanzó una eliminación de 81,71 % de COT, con una baja eliminación de DQO (31,68 %). Sin embargo, el estudio de investigadores etíopes de especies de *Chlorella* y *Scenedesmus* de forma individual y en consorcio en agua residual de faenamiento anaeróbicamente tratada reporta una mayor eliminación de DQO (86,74-93,11 %) para el cultivo en consorcio [303], frente al presente estudio.

## **Eliminación de otros parámetros fisicoquímicos y metales pesados en agua residual de industria porcina**

La Tabla 4.3.3 presenta también la eliminación total de ciertos micronutrientes y metales pesados analizados en el agua residual de industria porcina donde se comparan las concentraciones iniciales y finales del cultivo en consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Entre los metales pesados se incluyen mercurio, cobre, hierro, plomo, zinc, plata, cadmio, arsénico, níquel, cobalto, estaño, cromo y elementos del grupo del platino: rutenio, paladio, iridio, rodio, osmio y platino; caracterizados por tener densidad mayor a cinco veces la densidad del agua [168,307,308]. Estos metales no son biodegradables y se bioacumulan en la cadena trófica causando serias afecciones a la salud. En la actualidad se emplean métodos químicos para su eliminación tales como oxidación, adsorción y tratamientos con membranas que resultan costosos y poco eficientes para la eliminación de estos metales a bajas concentraciones [187,308–310].

En el apartado 4.1 se discutió sobre la capacidad de eliminación de nutrientes y metales pesados de las especies individuales; cada uno de los nutrientes y metales analizados juegan un papel importante para el óptimo crecimiento de las microalgas; por ejemplo, en el caso del Ca es indispensable para las funciones de la pared celular de las microalgas [164], y es importante para la floculación de las mismas en las etapas de cultivo, especialmente en las condiciones de pH alto, las sales de calcio precipitan en el medio [165].

En la literatura de estudios de consorcios con fines de biorremediación de aguas residuales es escasa la información publicada sobre Mg, Na y K; los autores indican que su presencia en el medio de cultivo es esencial y que, en el caso de remediación de aguas, iones competitivos como calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) compiten con los iones de metales pesados por los sitios activos en la superficie celular de microalgas y bacterias, pudiendo reducir la capacidad de eliminación de metales pesados y la eficiencia del consorcio para tal fin [311].

Si bien concentraciones de Cu mayores a 2 mg/L impiden el proceso de la fotosíntesis afectando el crecimiento de la microalga [186], su presencia en el medio de cultivo es fundamental para el sistema de transporte de electrones; y como cofactor de ciertas enzimas [164]. Estudios demuestran que las microalgas en monocultivos son capaces de eliminar del 32-45 % del Cu presente en aguas residuales [189], y que dicha eliminación está asociada a los valores del pH del medio; pues cerca del pH neutro, se mejora la adsorción de Cu [201]. En el caso del Fe, este es un cofactor necesario para varios sistemas enzimáticos relacionados al crecimiento de la microalga; incluso algunos autores afirman que existe una relación entre un

alto contenido de Fe y la limitación de N para la alta productividad lipídica de especies del género *Chlorella* [202]. En comparación con los cultivos individuales en este mismo tipo de agua residual, el cultivo en consorcio fue menos eficiente para la reducción de Fe; sin embargo, eliminó Cu, a diferencia de los cultivos monoalgales cuya concentración de Cu se incrementó.

La eliminación de Cr del consorcio del presente estudio (80 %) es similar a la eliminación alcanzada por las especies individuales cultivadas en agua de industria porcina (apartado 4.1) y mayor a la eficiencia de *C. vulgaris* como especie individual hacia la eliminación de Cr reportada por otros autores próxima al 58 % [189]. En una investigación se evaluó un lodo granular aeróbico conformado por un consorcio alga-bacteria para la eliminación de Cr en forma de Cr (VI), Cr (III) y Cr total. El proceso de biosorción de parte del sistema de lodo granular aeróbico con este consorcio, permitió la eliminación de 99,3 % de Cr(VI) en condiciones de pH de 2 y en tan solo 6 horas de biosorción; a pH de 6, la eliminación total de Cr fue de 89,1 %. Para Cr (III) se alcanzó una eliminación de 66,8 %, resaltando que esta eliminación es debida a acumulación intracelular en los microorganismos [312].

Muchos autores indican que las microalgas requieren del consumo de trazas de Mo para procesos enzimáticos y de metabolismo celular [313]; sin embargo, es escasa la literatura de eliminación de este metal; en el presente estudio, la eliminación de Mo fue de aproximadamente 50 % y 60 % para los monocultivos y el cultivo en consorcio, respectivamente. En el área de Ingeniería de Nanomateriales se ha estudiado el disulfuro de molibdeno ( $\text{MoS}_2$ ) por sus excelentes propiedades mecánicas, termodinámicas, por lo que su uso en el área electrónica se ha expandido trayendo consigo daños a ecosistemas por sus efectos adversos a organismos acuáticos.

Para el caso del Ni y Pb no fue posible determinar un porcentaje de eliminación en este estudio pues se mantuvo fuera del rango de medición de la técnica, pero se sabe que concentraciones elevadas de Ni afectan el crecimiento de las microalgas, aunque es necesario para las especies que metabolizan urea en el medio y el Pb en concentraciones mayores a 5  $\mu\text{mol/L}$  destruyen la clorofila debido al incremento del estrés inhibitor en el proceso de la fotosíntesis, lo cual afecta al crecimiento celular [190].

La Tabla 4.3.4 muestra los límites máximos permisibles para la descarga al sistema de alcantarillado municipal que establece la normativa ambiental vigente en el Acuerdo Ministerial N° 097 A y su comparación con la reducción de nutrientes alcanzada en el ARFP con cultivo en consorcio de las microalgas de estudio [73]. Puede observarse que el tratamiento con el consorcio da cumplimiento a todos los parámetros considerados para la descarga permitido al

sistema de alcantarillado público; a diferencia de las especies individuales en el mismo tipo de agua residual que no dio cumplimiento al valor mínimo de descarga de fósforo (P); esto destaca el potencial de biorremediación de las microalgas en el consorcio.

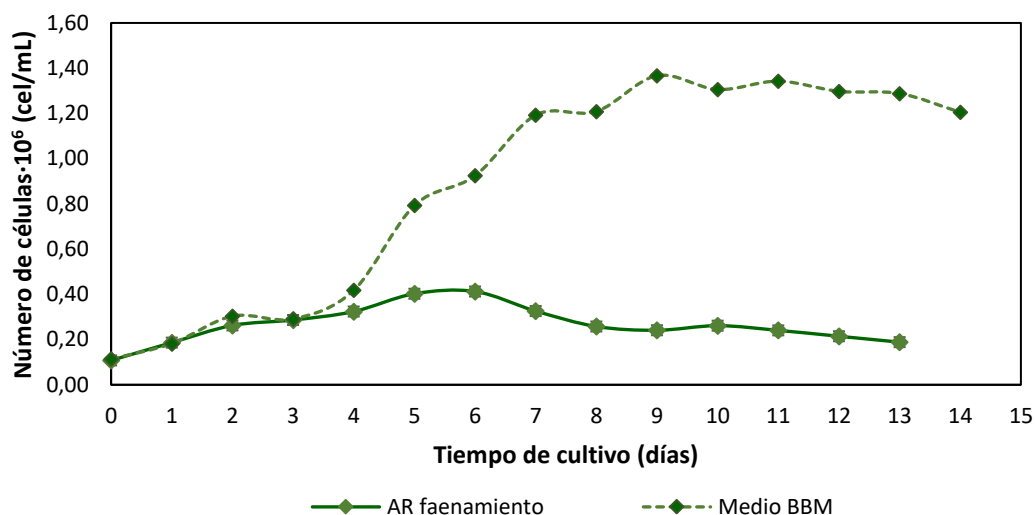
**Tabla 4.3.4** Comparación de límites de descarga de la normativa ambiental ecuatoriana vigente con la concentración final de parámetro fisicoquímicos posterior al tratamiento de agua residual de industria porcina con un consorcio conformado por las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

Parámetros Fisicoquímicos	Límite de descarga	Concentración Final	Cumplimiento de norma ambiental
Nitrógeno Total (mg/L N)	60,0	4,00 ± 2,00	Si
Fósforo Total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	15,00	7,07 ± 0,51	Si
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	N.R.	15,67 ± 2,52	-
Demanda Química de Oxígeno (mg/L O <sub>2</sub> )	500	317 ± 4	Si
Calcio (mg/L)	N.R.	17,64 ± 0,07	-
Cobre (mg/L)	1,00	0,03 ± 0,002	Si
Cromo (mg/L)	0,5	< 0,01 LD	Si
Hierro (mg/L)	25,00	0,33 ± 0,02	Si
Molibdeno (mg/L)	N.R.	0,04 ± 0,003	-
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	N.R.	8,19 ± 0,49	-
Níquel (mg/L)	2,00	< 0,05	Si
Plomo (mg/L)	0,5	< 0,05 LD	Si
Potasio (mg/L)	N.R.	43,15 ± 2,93	-
Sodio (mg/L)	N.R.	44,00 ± 3,56	-

N.R.: no reportado

#### 4.3.1.2 Crecimiento de la biomasa en el agua residual seleccionada

La Figura 4.3.3 presenta el crecimiento celular para las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio durante 13 días en el agua residual de la industria porcina sin reposición de nutrientes durante el tiempo de cultivo (resultados por triplicado). El cultivo en consorcio inició con una concentración celular de  $1,08 \cdot 10^5 \pm 4,69 \cdot 10^3$  cel/mL, apreciando una fase exponencial desde el día 1 al día 6 con un incremento de concentración hasta  $4,13 \cdot 10^5 \pm 6,05 \cdot 10^4$  cel/mL; y desde el día 6 a 13 se aprecia notoriamente la fase de muerte celular con una reducción en la concentración de  $1,89 \cdot 10^5 \pm 1,97 \cdot 10^4$  cel/mL.

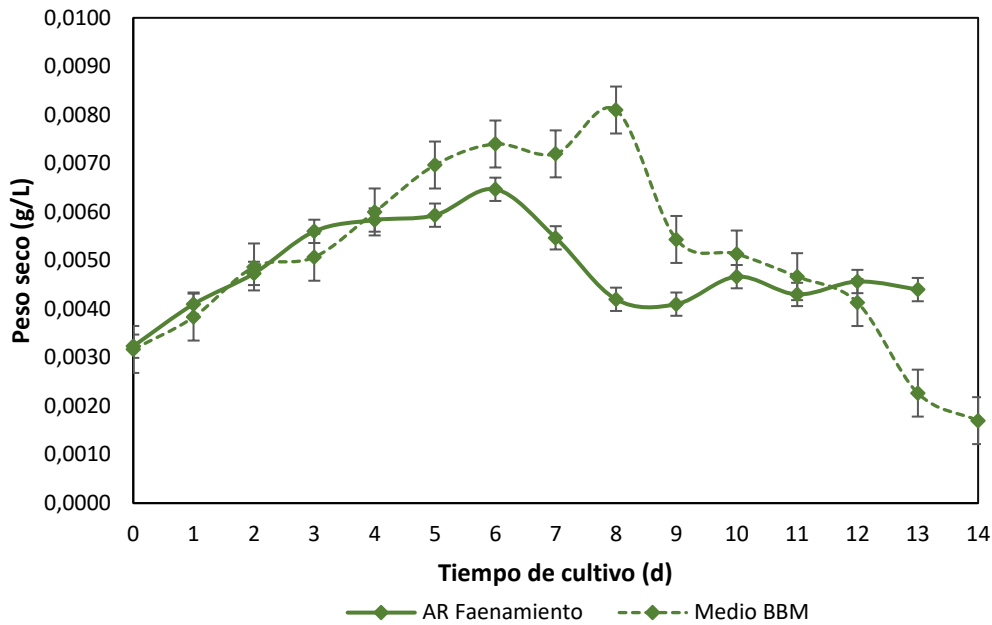


**Figura 4.3.3** Crecimiento celular del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria porcina y su control en medio BBM.

En la misma figura se muestra el crecimiento celular de las especies en consorcio en el medio BBM empleado como medio de control durante 14 días; en este medio se registró una fase de crecimiento exponencial del día 1 al 9 con un aumento en la concentración desde  $1,82 \cdot 10^5 \pm 2,26 \cdot 10^2$  cel/mL hasta  $1,37 \cdot 10^6 \pm 3,88 \cdot 10^3$  cel/mL, seguidamente se aprecia una fase estacionaria comprendida entre los días 9-12, y la fase de muerte celular con una disminución en la concentración celular de  $1,21 \cdot 10^6 \pm 2,43 \cdot 10^3$  cel/mL. Comparando ambos cultivos, se aprecia un crecimiento similar desde la siembra hasta el día 4 en el que hubo un despunte en el crecimiento celular del consorcio en el medio sintético BBM, respecto del cultivo en el ARFP.

La Figura 4.3.4 muestra el peso seco del consorcio conformado por las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. durante 13 días de cultivo en el agua residual de industria porcina y su comparación con el consorcio de las mismas especies cultivado en el medio de control BBM (resultados por triplicado). Para el agua residual, el peso seco inicia en el día cero con  $0,0032 \pm 0,0018$  g/L, del día 1 al día 6 se observa una fase exponencial alcanzando una concentración de  $0,0065 \pm 0,0033$  g/L; y desde el día 6 al 13 el peso seco registró una disminución en su valor hasta  $0,0044 \pm 0,0016$  g/L al finalizar el cultivo. Para el medio de control BBM se observaron valores mayores para el peso seco en comparación con los valores obtenidos en el agua residual de industria porcina, iniciando con valores de  $0,0032 \pm 0,0032$  g/L al inicio del cultivo, valores máximos de peso seco al día 8 con  $0,0081 \pm 0,0003$  g/L y finalizando con registros de peso seco de  $0,0017 \pm 0,0007$  g/L.





**Figura 4.3.4** Peso seco de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio en agua residual de industria porcina y su control en medio BBM.

En la Tabla 4.3.5 se registran los resultados de la generación de biomasa y la productividad de las especies en consorcio obtenidos con agua residual de industria porcina y su control en medio BBM; puede apreciarse que el agua residual de faenamiento fue capaz de aportar los nutrientes requeridos para el crecimiento del consorcio de manera muy similar al medio de control sintético; asimismo, las productividades volumétricas y específicas del consorcio son cercanas al del medio de cultivo tomando en cuenta la diferencia de 1 día entre cada cultivo (13 días para el agua residual y 14 días para el medio control). En cuanto a la tasa de crecimiento y tiempo de duplicación, puede apreciarse que en el medio sintético el consorcio creció y se duplicó más rápido en comparación con el agua residual.

Las especies que conforman el consorcio en el presente trabajo han sido ampliamente estudiadas y son conocidas por tener altas tasas de crecimiento, alta eficiencia fotosintética y una gran adaptabilidad a condiciones ambientales adversas [215,227,303]. En cuanto al crecimiento celular, se destaca que en las curvas de crecimiento no se presentó una fase de latencia o adaptación al medio residual y comparando el crecimiento celular del consorcio de microalgas en el agua residual de industria porcina y en el medio de control BBM, se observa que, pese a que hubo un mayor crecimiento celular en el medio sintético, la mayor productividad se apreció para el consorcio cultivado en el agua residual; lo cual confirma la robustez de las especies y su adaptabilidad para crecer en el agua residual. Por otro lado, comparando el crecimiento de las especies en monocultivos del presente trabajo doctoral (sección 4.1) con el

cultivo en consorcio, se aprecian mayores valores para las especies individuales en el mismo tipo de agua de faenamiento.

**Tabla 4.3.5** Generación de biomasa y productividad del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en el cultivo en agua residual de industria porcina y su control en BBM.

Parámetro de crecimiento de cultivo	ARFP	BBM
Concentración de biomasa (g/L)	0,5171	0,5268
Productividad volumétrica (g/L·d)	0,0398	0,0376
Productividad específica (d <sup>-1</sup> )	0,0769	0,0714
Tasa de crecimiento específica (μ)	0,1588	0,2149
Tiempo de duplicación (t <sub>D</sub> ) (d)	4,3648	3,2259

Las diferencias entre los parámetros de crecimientos analizados pueden estar asociados a la disponibilidad de macro y micronutrientes de ambos medios, así como a la cantidad de materia orgánica suspendida que incrementa el peso seco, ligeras variaciones en las condiciones ambientales de los cultivos, el color y el pH del medio, el cual puede incidir en el crecimiento celular [173,314]. También, aunque se procuró mantener los cultivos lo más axénicos posible, bajo el microscopio se observaron bacterias en el consorcio a partir del sexto día de cultivo, por lo que también la presencia de estas bacterias pudo haber afectado el crecimiento de las microalgas. Incluso, bajo el microscopio se observó que la especie *Chlorella vulgaris* predominaba en el cultivo en relación con *Scenedesmus* sp.

Sin embargo, la bibliografía respecto del uso de agua de industria porcina como medio de cultivo para estas especies en consorcio es escasa. En un estudio similar al de esta investigación, Bedane y Asfaw (2023) emplearon un efluente de faenamiento (no indica el tipo de animal faenado) anaeróbicamente tratado para el cultivo de especies de *Chlorella* y *Scenedesmus* en monocultivos y en consorcio, para evaluar la eficiencia para la eliminación de contaminantes. Los autores reportaron concentración y productividad de biomasa de  $1,4 \pm 0,1$  g/L y  $0,18$  g/L·d para las especies de *Chlorella*,  $1,17 \pm 0,12$  g/L y  $0,21$  g/L·d para las especies de *Scenedesmus* y,  $1,5 \pm 0,13$  g/L y  $0,23$  g/L·d para el consorcio, respectivamente. Este estudio realizado en Etiopía resalta el uso de microalgas y consorcios para biorremediación de las aguas residuales y como una alternativa para la producción de biomasa con fines de obtención de bioenergía [303].

Algunos autores hacen referencia a la limitada eficiencia de eliminación de metales pesados de los sistemas de cultivos con microalgas; esta baja eficiencia para la eliminación de metales está asociada a baja concentración de biomasa, baja tasa de crecimiento celular y limitada tolerancia a la toxicidad de ciertos metales pesados de parte de las microalgas. En este sentido,

los consorcios microalga-bacteria suelen presentar mejores eficiencia en eliminación de metales pesados gracias a relaciones sinérgicas entre los dos tipos de microorganismos para la transformación de éstos metales pesados en formas menos tóxicas; igualmente, la alta concentración de biomasa que se alcanza en los consorcios ayuda a incrementar la eficiencia en la eliminación de metales [315,316].

Perales et al., (2023) usaron un consorcio conformado por microalgas y bacterias cultivadas en agua residual de un sistema de acuicultura intensiva con recirculación de nutrientes (recirculating aquaculture system – RAS, por sus siglas en inglés), durante 28 día; las especies predominantes en los reactores eran microalgas del género *Chlorella*, diatomeas, cianobacterias filamentosas y algunos protozoos ciliados, amebas y bacterias marinas del género *Vibrio*. Los resultados indican una concentración de biomasa de  $0,185 \pm 0,008$  g/L, productividad de  $0,033 \pm 0,005$  g/L·d y una tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de  $0,724 \pm 0,137$  d<sup>-1</sup> para cultivos por lotes; mientras que en modo de operación semicontinuo, los valores de concentración de biomasa, productividad y tasa específica de crecimiento fueron  $0,122 \pm 0,008$  g/L,  $0,044 \pm 0,009$  g/L·d y  $0,722 \pm 0,117$  d<sup>-1</sup> [317]. Estos valores son próximos a los encontrados en la presente investigación.

En la bibliografía consultada sobre consorcios de microorganismos, el reporte de datos de tasa de crecimiento específica o tiempo de duplicación es muy escaso, por lo que este trabajo presenta esta novedad para el establecimiento de datos referenciales de crecimiento celular sobre la línea base del estudio de consorcios de microalgas en aguas residuales tratadas de faenamiento animal. La razón del tratamiento de este tipo de aguas residuales que normalmente incluye filtración, dilución y/o esterilización se debe a que este tipo de aguas contiene altas concentraciones de nutrientes, metales pesados, antibióticos y hormonas que pueden afectar directamente la tasa de crecimiento y la producción de biomasa de las microalgas [84].

En cuanto a la etapa de cosechado, tradicionalmente en cultivos monoalgales se emplean procesos como centrifugación, coagulación-floculación, liofilización, etc., que representan el 30 % de los costes de producción de biomasa de microalgas, en especial en cultivos a gran escala; por ello, algunos autores han optado por el uso de consorcios alga-cianobacteria que pueden formar agregados que sedimentan con facilidad y que reducen los requerimientos de aireación considerando parámetros como tiempo de retención hidráulico (TRH) y tiempo de retención de sólidos (TRS) [55]. Otro beneficio de este tipo de agregados alga-cianobacteria es la eficiencia

en la transferencia de masa entre las especies [198], la autoprotección en escenarios de depredadores y estrés ambiental [199] y altas eficiencias en la eliminación de nutrientes [21].

En cultivos en consorcio, la literatura recomienda optar por consorcios de tipo microalga/cianobacteria, capaces de crear ambientes autosostenibles en carbono neutro, como ocurre de forma natural en las comunidades bacterianas; en este caso, las microalgas oxidan el carbono orgánico empleando el O<sub>2</sub> producido en la fotosíntesis y las bacterias usan O<sub>2</sub> producido por las microalgas y a cambio suministran el carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>) que las microalgas requieren para la fotosíntesis. Este balance en el aprovechamiento de gases ayuda a reducir el uso de aireación mecánica, aunque es necesario analizar los requerimientos de iluminación y nutrientes para no limitar el crecimiento de cada comunidad [319]. Sin embargo, la biomasa de este tipo de consorcios tendrá un uso limitado para la obtención de bioproductos de menor valor añadido (biofertilizantes, biocombustibles, alimentación animal, etc.) en comparación con la biomasa de cultivos monoalgales que puede emplearse para bioproductos mejor cotizados (nutracéuticos, cosmética y alimentación humana) [21].

#### **Caracterización elemental de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio en agua residual de industria porcina**

La biomasa seca cultivada en agua residual de la industria porcina y en medio de control BBM fue analizada a nivel elemental y su composición se muestra en la Tabla 4.36. Se aprecia la composición en peso de los elementos nitrógeno (N), carbono (C), hidrógeno (H), y oxígeno (O), observando la ausencia de azufre (S); de forma análoga a los resultados del monocultivo de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. individuales (sección 4.1 del presente trabajo).

**Tabla 4.3.6** Composición elemental de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Cultivadas en consorcio en agua residual de industria porcina y medio de control BBM

Elemento	Consorcio	
	Medio de cultivo	Consorcio
	ARFP	BBM
N	7,96	2,83
C	45,56	48,21
H	6,54	7,38
S	0,00	0,00
O	22,51	26,47

Aunque existen trabajos con consorcios en agua residual de industria porcina, los autores no reportan el análisis elemental de la biomasa obtenida. A continúan se presentan algunos trabajos que presentan datos del análisis elemental de la biomasa de consorcios diversos. En un

trabajo se reporta el uso de consorcio de microalgas verdes-bacterias conformadas por especies de *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus* y bacterias no identificadas ni cuantificadas, cultivadas en agua residual municipal no tratada (valores promedios de  $P-PO_4^{3-}$ ,  $N-NH_4^+$  y  $N-NO_3^-$  de  $4,38 \pm 2,06$  mg/L,  $46,26 \pm 5,11$  mg/L y  $0,04-0,99$  mg/L, respectivamente). Los cultivos se realizaron en reactores ubicados a la intemperie y en invernaderos no iluminados. El análisis elemental de la biomasa microalgal indicó contenidos de 6,39-6,805 % de N y 46,799-44,521 % de C; mientras que en los reactores ubicados en invernaderos los valores de N y C fueron 5,689 % y 38,739 %, respectivamente [79]. Los resultados anteriores muestran que, pese a la diversidad de medios de cultivos empleados, el análisis elemental de la biomasa cultivada se mantiene en rango porcentuales similares para los elementos analizados con algunas variaciones en los porcentajes de oxígeno, principalmente.

Análogamente a los cultivos individuales, para el caso del consorcio se determinó la cantidad de lípidos totales extraídos con el procedimiento estándar y la mezcla cloroformo:metanol (1:2 v/v); encontrando porcentajes de  $21,02 \pm 0,97$  % para la biomasa seca del consorcio. Este valor de lípidos totales extraídos a partir de la biomasa seca del cultivo en consorcio es próximo al resultado de lípidos totales para la biomasa seca para *C. vulgaris* en el cultivo individual.

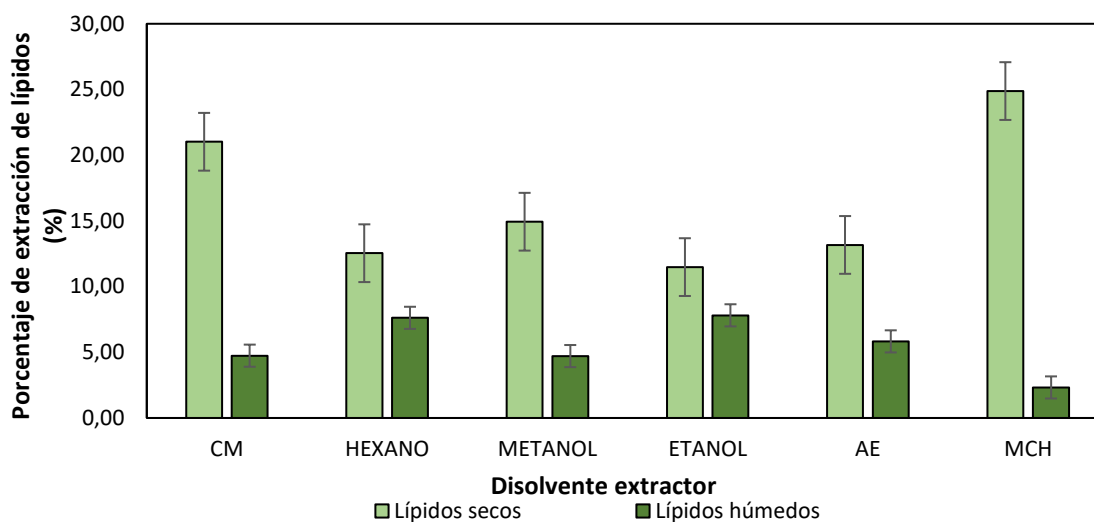
#### **4.3.2 Aprovechamiento energético de la biomasa obtenida**

A continuación, se presenta esta sección en la que se hizo uso de la biomasa del consorcio de microalgas cultivadas en ARFP como una opción de valorización energética a partir de la obtención de lípidos, AGL y FAME para identificar su potencial uso para la producción de biocombustibles y de esta forma aplicar un aprovechamiento integral de la biomasa con base en principios de economía circular.

##### **4.3.2.1 Obtención de lípidos totales**

Análogamente a los cultivos anteriores, la extracción de lípidos totales se realizó con seis disolventes: metanol, etanol, acetato de etilo, metilciclohexano, hexano y la mezcla cloroformo:metanol (1:2), empleando biomasa seca y biomasa húmeda del consorcio conformado por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria porcina. La Figura 4.3.5 muestra el contenido de lípidos totales de biomasa húmeda y biomasa seca para el consorcio. El etanol mostró la mayor extracción de lípidos en la biomasa húmeda ( $7,81 \pm 0,88$  %), mientras que para la biomasa seca el mejor disolvente fue metilciclohexano con  $24,88 \pm 2,66$  %. Otro disolvente que presentó un contenido de lípidos superior al 20 % m/m fue la mezcla estándar cloroformo:metanol (1:2) en base seca ( $21,02 \pm 0,97$  %); el resto de los

disolventes presentó porcentajes de lípidos extraídos menores a 20 %. Sin embargo, al comparar los valores porcentuales del cultivo en consorcio con el de las especies individuales, se observan mayores porcentajes de lípidos totales extraídos en el consorcio de las microalgas de estudio, lo cual es un muy interesante resultado para el consorcio.



**Figura 4.3.5** Porcentaje de extracción de lípidos en biomasa seca y húmeda del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria porcina

Los mejores valores de extracción de lípidos para la biomasa seca se encontraron con disolventes de baja y media polaridad como el metilciclohexano y la mezcla cloroformo: metanol (1:2), respectivamente. Este tipo de disolventes es capaz de extraer compuestos moderadamente hidrófobos; aunque la mezcla CM (1:2) puede extraer lípidos polares gracias a la acción del metanol. Este comportamiento es similar al de los cultivos monoalgales desarrollados en el apartado 4.2. El hecho de que MCH supere el valor máximo de lípidos extraíbles según los métodos de extracción estándar con CM (1:2) puede deberse a que también se dé la extracción de otros compuestos no lipídicos que afectaron el peso de la muestra de lípidos.

En cuanto a la biomasa húmeda, la extracción de lípidos se mantuvo debajo del 10 % de lípidos para todos los disolventes extractores probados, siendo el etanol el mejor disolvente extractor (7,81 %); en segundo lugar, se encuentra hexano (7,62 %), y el tercer lugar lo ocupa el acetato de etilo (5,83 %). Estos valores también son similares a los obtenidos para los cultivos individuales con el mismo tipo de agua residual, resaltando la barrera que genera el agua en los procesos de extracción de lípidos. La Tabla 4.3.7 muestra los valores de productividad volumétrica de lípidos para cada uno de los disolventes extractores.

**Tabla 4.3.7** Productividad volumétrica de lípidos para biomasa seca y húmeda del consorcio conformado por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivado en agua residual de industria porcina.

Productividad volumétrica de lípidos (g/L·d)		
Disolvente	Biomasa seca	Biomasa húmeda
Cloroformo:metanol (1:2)	$1,62 \cdot 10^{-4}$	$7,49 \cdot 10^{-5}$
Hexano	$9,66 \cdot 10^{-5}$	$1,19 \cdot 10^{-4}$
Acetato de etilo	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$9,50 \cdot 10^{-5}$
Metilciclohexano	$1,92 \cdot 10^{-4}$	$3,74 \cdot 10^{-5}$
Metanol	$1,15 \cdot 10^{-4}$	$7,44 \cdot 10^{-5}$
Etanol	$8,86 \cdot 10^{-5}$	$1,21 \cdot 10^{-4}$

La Figura 4.3.5 y la Tabla 4.3.7 también demuestran que la cantidad de lípidos extraídos en biomasa seca es mayor en comparación con los valores de la biomasa húmeda, al igual que la productividad. La productividad total de lípidos a partir de biomasa seca fue de 0,0139 g/L·d y la productividad específica fue de 0,0769 d<sup>-1</sup>, mientras que para la biomasa húmeda la productividad total de lípidos fue 0,0286 g/L·d y la productividad específica fue de 0,0769 d<sup>-1</sup>. En general los valores de productividad volumétrica obtenidos son muy bajos, y comparando con la productividad de lípidos de los cultivos individuales, se aprecian mayores valores en la productividad del consorcio de microalgas.

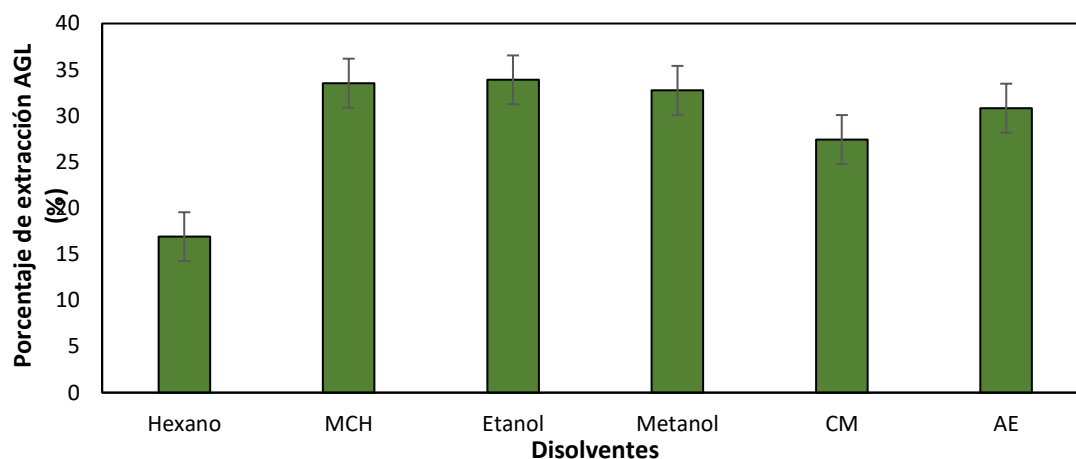
Existe poca bibliografía sobre el cultivo de consorcios de microorganismos en agua de industria porcina y en los trabajos recientes revisados, no disponen de información de contenido lipídico y/o productividad de lípidos. El estudio de Qin et al., (2016) reporta la evaluación de consorcios de cuatro grupos de microalgas cultivadas en agua residual de industria láctea autoclavada con fines de eliminación de nutrientes y aprovechar la biomasa para la obtención de biodiésel. Los grupos de consorcios fueron: grupo a) *Chlorella* sp. y *Chlorella zofingiensis* (1:1), b) *Scenedesmus* spp. y *Chlorella zofingiensis* (1:1), c) *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* spp. (1:1), y d) *Chlorella* sp., *Scenedesmus* spp. y *C. zofingiensis* (1:1:1). Para cada consorcio se reportaron contenidos de lípidos totales y productividad de lípidos de 19,44 ± 0,30 % y 0,1503 ± 0,008 mg/L·d para el consorcio a) (*Chlorella* sp. y *Chlorella zofingiensis* (1:1)); 20,62 ± 0,16 % y 0,1506 ± 0,015 mg/L·d para el consorcio b) (*Scenedesmus* spp. y *Chlorella zofingiensis* (1:1)); 19,34 ± 1,18 % y 0,1272 ± 0,084 mg/L·d para el consorcio c) (*Chlorella* sp. y *Scenedesmus* spp.); y, 19,03 ± 1,22 % y 0,1437 ± 0,033 mg/L·d para el consorcio d) (*Chlorella* sp., *Scenedesmus* spp. y *C. zofingiensis* (1:1:1)) [320]. Si bien el contenido de lípidos es similar al encontrado en el presente trabajo, hay mucha diferencia en la productividad de lípidos la cual resultó mayor en el trabajo

citado anteriormente; esto puede estar asociado a las condiciones y composición fisicoquímica del agua residual empleada.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son similares a los reportados en la bibliografía consultada. Las ligeras diferencias se pueden deber a las características del medio de cultivo y de factores externos que pueden afectar la producción de lípidos [221]. En este contexto es interesante destacar que, limitaciones en los nutrientes (N, P, C) en su fase estacionaria, variaciones en pH, temperatura, salinidad, irradiancia generan estrés en las microalgas y esto puede ayudar en la acumulación de un 15 % más de lípidos [79,251,261,321].

#### 4.3.2.2 Obtención de ácido grasos libres (AGL)

Tal y como en los cultivos anteriores y, tomando en cuenta los bajos porcentajes de lípidos totales extraídos con el uso de biomasa húmeda, los procedimientos de extracción de ácidos grasos libres se realizaron únicamente a partir de biomasa seca. La Figura 4.3.6 muestra los resultados del contenido de ácidos grasos libres para las especies *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio en agua residual de industria porcina. Las extracciones se realizaron con los seis disolventes extractores expuestos en la metodología e hidróxido de potasio (KOH) como catalizador. Resalta el etanol con  $33,89 \pm 0,03$  % de AGL en biomasa seca, seguido del MCH con  $33,54 \pm 0,03$  % y metanol con  $32,76 \pm 0,02$  % de ácidos grasos. Los menores valores de AGL fueron para AE y la mezcla CM (1:2) a 30 % y hexano con menos de 20 % en peso de AGL.



**Figura 4.3.6** Porcentaje de extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL) en biomasa seca del consorcio conformado por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivado en agua residual de industria porcina

Sin embargo, tanto los disolventes de baja polaridad (MCH), como los disolventes polares (alcoholes), presentan porcentajes de extracción de AGL en un rango muy estrecho. Este



comportamiento difiere del encontrado para los cultivos monoalgales en este tipo de agua residual, caracterizados por tener porcentajes de extracción de AGL superiores para los disolventes de baja polaridad.

Comparando con los porcentajes de AGL de las especies individuales en este mismo estudio doctoral, se aprecian porcentajes de extracción de AGL más altos en el cultivo en consorcio, resaltando su potencialidad. Son muy pocos los estudios que reportan datos de obtención de AGL para microalgas cultivadas en consorcios en aguas residuales con características similares a las de industria porcina, en la mayoría de los casos los autores optan por extraer lípidos y producir FAME y realizar directamente un análisis de perfil lipídico.

En general, estos valores son buenos y podrían mejorarse aún con variaciones en condiciones del cultivo (estrés por limitación de nitrógeno, fósforo o salinidad en el medio de cultivo), uso de catalizadores enzimáticos, uso de mezclas de disolventes (polares y no polares), así como técnicas de extracciones de AGL en condiciones supercríticas [41,251,275].

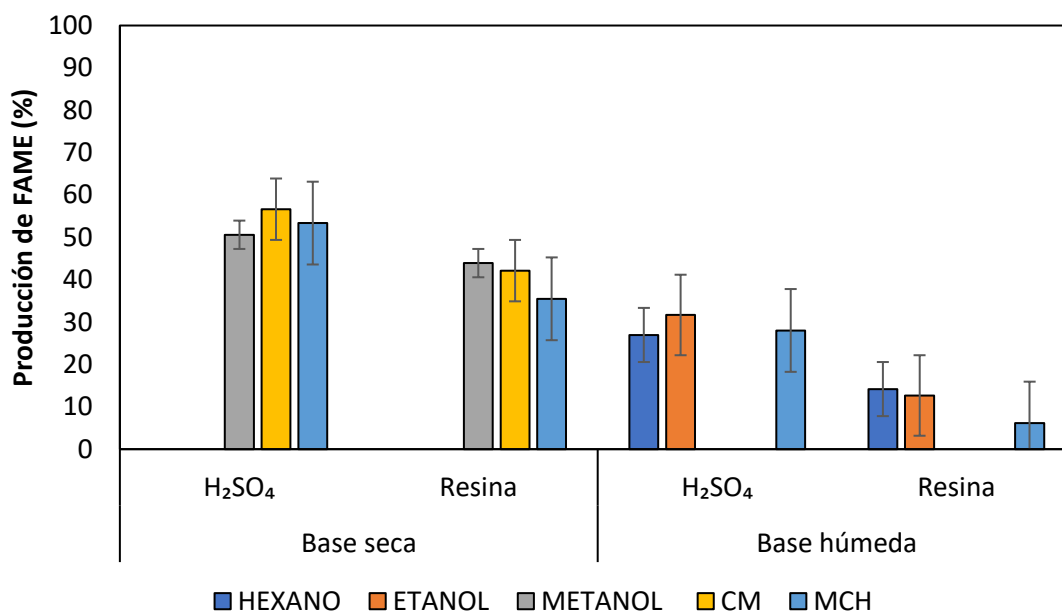
#### **4.3.2.3 Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)**

De forma análoga a los procedimientos de producción de FAME de los apartados anteriores, se llevó a cabo la obtención de FAME de manera directa empleando biomasa microalgal seca y de manera indirecta usando lípidos procedentes de biomasa seca y húmeda, y ácidos grasos libres previamente extraídos con los tres mejores disolventes resultantes de las extracciones de lípidos probados en este estudio para las especies en consorcio. Para cada caso se emplearon dos tipos de catalizadores ácidos: uno homogéneo, ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y uno heterogéneo, resina comercial CT-269DR para comprobar si los lípidos y AGL extraídos transesterifican o esterifican a FAME.

##### **a) Método indirecto**

La Figura 4.3.7 muestra la producción de FAME a partir de los lípidos extraídos de biomasa seca y húmeda de microalga; el  $H_2SO_4$  tuvo mejores porcentajes de producción de FAME respecto de la resina comercial; también se aprecia que los porcentajes de producción en base seca son mejores respecto de la base húmeda. Respecto de los disolvente extractores en el paso previo de obtención de lípidos, destacan disolventes de polaridades diversas: la mezcla CM (1:2), MCH y metanol para ambos catalizadores. Para los lípidos en base seca que sirvieron de partida, resaltan en primer lugar el porcentaje de FAME producidos a partir de lípidos extraídos con la mezcla CM (1:2) (CM) con  $56,54 \pm 0,03$  %, en segundo lugar, FAME producidos a partir de lípidos extraídos con MCH con  $53,37 \pm 0,04$  %; y, en tercer lugar, FAME producidos con lípidos extraídos

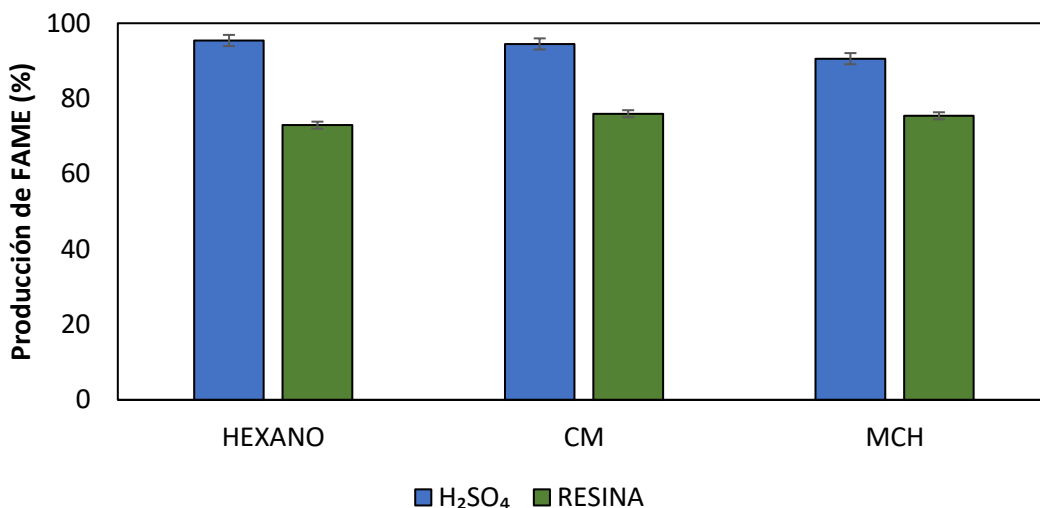
con metanol con  $50,61 \pm 0,01$  %, usando  $H_2SO_4$  como catalizador. Usando la resina comercial, resaltan los FAME producidos con los lípidos extraídos con metanol con el mayor porcentaje de FAME de  $43,92 \pm 0,05$  %, seguido de la mezcla CM (1:2) y el MCH con  $42,15 \pm 0,02$  % y  $35,50 \pm 0,03$  %, respectivamente.



**Figura 4.3.7** Porcentaje de producción de FAME de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio en agua residual de industria porcina con el método indirecto a partir de lípidos.

En cuanto a los porcentajes de FAME obtenidos de manera indirecta a partir de lípidos extraídos de biomasa húmeda, los resultados son ligeramente mejores para el  $H_2SO_4$  respecto de la resina. Puede apreciarse que con el catalizador heterogéneo los lípidos extraído con hexano dieron lugar a valores de FAME de  $14,19 \pm 0,13$  %, seguido del etanol y MCH con  $12,68 \pm 0,01$  % y  $6,17 \pm 0,03$  %, respectivamente. Por su parte, con el ácido sulfúrico se produjeron FAME a partir de lípidos extraídos con dio etanol, MCH y hexano de  $31,68 \pm 0,04$  %;  $28,03 \pm 0,02$  % y  $26,96 \pm 0,02$  %, respectivamente.

Respecto de la naturaleza de los disolventes, en el análisis de los FAME producidos no muestra que la extracción de FAME aumente al incrementarse la polaridad del disolvente empleado en la etapa de extracción; los bajos porcentajes de FAME producidos a partir de lípidos extraídos con varios disolventes no cumple los requerimientos mínimos de ésteres metílicos para su uso como biodiésel según normativa EN 14214.



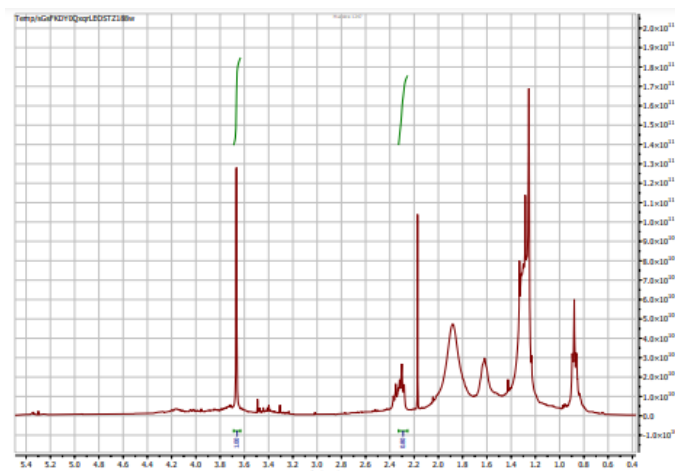
**Figura 4.3.8** Porcentaje de producción de FAME de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio en agua residual de industria porcina con el método indirecto a partir de AGL

También se determinó el porcentaje de FAME producidos a partir de AGL extraídos de biomasa seca, los resultados se muestran en la Figura 4.3.8 observando mejores valores para el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Con el uso del catalizador homogéneo, resaltan los resultados obtenidos con los lípidos extraídos con los disolventes hexano, la mezcla CM (1:2) y MCH con valores de 95,43 ± 0,02 %, 94,51 ± 0,01 % y 90,60 ± 0,06 %. Pese a contar con porcentajes altos, muy cercanos al requerimiento de la normativa EN14214; no se alcanzan los requerimientos mínimos de ésteres metílicos para su uso como biodiésel. En el caso de la resina, los porcentajes de producción de FAME a partir de AGL extraídos con la mezcla CM (1:2), MCH y hexano fueron de 75,98 ± 0,03 %, 75,43 ± 0,01 % y 72,94 ± 0,02 %, para, respectivamente. Tampoco se da cumplimiento a la normativa EN 14214 con el uso del catalizador heterogéneo.

Para verificar la conversión a FAME se caracterizaron las muestras de los FAME obtenidos por la vía indirecta en términos de conversión de lípidos saponificables con la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para las extracciones en base seca. La Figura 4.3.9 muestra un ejemplo de un espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de los FAME producidos por la vía indirecta para el consorcio de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.

La conversión de aceites del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. a biodiésel pudo confirmarse del todo con el análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H puesto que se detectó la ausencia de picos de protones glicéridos entre 4,2-4,3 ppm y la presencia de picos de protones

metoxi (CH<sub>3</sub>-) a 3,6 ppm; así como la presencia de picos característicos de grupos carbonil metilenos (-CH<sub>2</sub>-) a 2,2 ppm en la Figura 4.3.9 [287,288].



**Figura 4.3.9** Ejemplo de espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos a partir del método indirecto del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria porcina.

La Tabla 4.3.8 muestra los resultados para las dos especies de microalgas en consorcio analizadas en este estudio con los mejores disolventes extractores empleados en el método indirecto. Evaluando los resultados de la conversión a FAME a partir de los lípidos, se observan mejores valores para la resina (32-57 %) respecto del catalizador homogéneo (18-28 %) con los tres mejores disolventes extractores de lípidos. Análogamente, la conversión a FAME de los AGL extraídos también fue mejor con el uso del catalizador heterogéneo con rangos entre 37-90 % en comparación con el catalizador homogéneo con valores de conversión entre 32-43 %.

Hasta la fecha, el uso de la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para determinar el porcentaje de conversión de FAME en cultivos de consorcios con microalgas en agua residual de industria porcina es inexistente, por lo que este trabajo doctoral constituye un aporte a los cultivos en consorcio; sin embargo, entre la bibliografía consultada de publicación reciente solo se encontró un trabajo que realizó el espectro de RMN-<sup>1</sup>H para biopelículas de microalgas de la especie *Chlorella sorokiniana* UUIND6 y biopelículas de consorcio microalgas-levaduras (*Chlorella sorokiniana* UUIND6 +*Saccharomyces cerevisiae* UUIND1). Los autores indican que los espectros de la biopelícula conformada únicamente por microalga mostraron seis picos característicos en las señales de 5,2-5,5 ppm (grupos glicerilo y metilo olefínico), 2,7-2,9 ppm (dialilmetileno); 2,2-2,5 ppm (metilenos α al carbonilo); 1,9-2,1 ppm (alil metileno); 1,0-1,4 ppm (metilenos) y 0,7-1,0 ppm (metilos). Por su parte, los espectros de biopelícula del consorcio microalga-levadura mostró únicamente tres picos correspondientes a las señales de 1,5-1,8 ppm (metilenos al carbonilo); 1,0-1,4 ppm (metilenos) y 0,7-1,0 ppm (metilos) [301].

**Tabla 4.3.8** Conversión de FAME analizado mediante RMN-<sup>1</sup>H del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. con el método indirecto

Especie	Disolvente	catalizador	%	%
			Conversión FAMES lípidos	Conversión FAMES AGL
Consortio de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus</i> sp.	CM(1:2)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	28,00	43,30
		CT-269DR	32,67	90,00
	MCH	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18,67	42,70
		CT-269DR	53,33	52,67
	Metanol	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26,67	32,70
		CT-269DR	56,67	37,33

CM (1:2): cloroformo:metanol (1:2); MCH: metilciclohexano

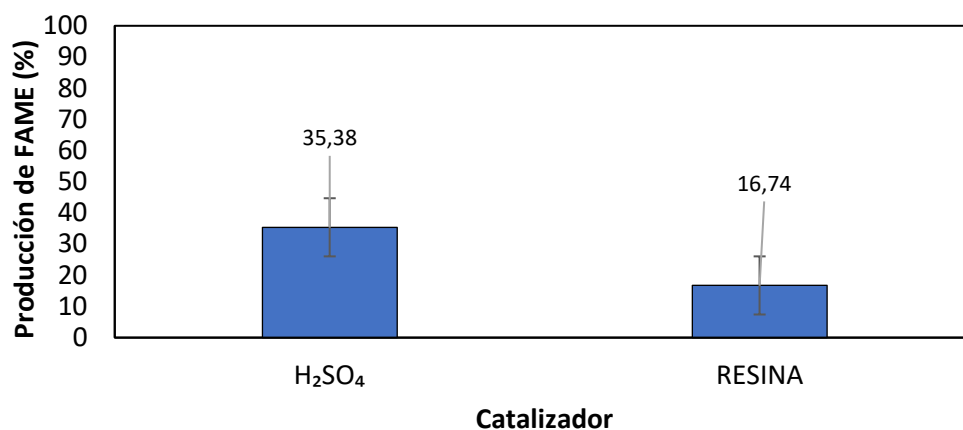
Empleando como referencia las señales que reportan los autores anteriormente citado y comparando con las señales encontradas para el consorcio de microalgas estudiados en el presente trabajo (Figura 4.4.9), puede observarse que hay la presencia de cuatro de las seis señales que reportan los autores citados; específicamente las señales 2,2-2,5 ppm (metilenos  $\alpha$  al carbonilo); 1,9-2,1 ppm (alil metileno); 1,5-1,8 ppm (metilenos al carbonilo-muy marcada); 1,0-1,4 ppm (metilenos-muy marcada) y 0,7-1,0 ppm (metilos muy marcada). Con este detalle en las señales podría inferirse que las muestras analizadas se corresponden con datos de ácidos grasos consistentes con microalgas de amplia aplicación en la obtención de biocombustibles líquidos como el biodiésel.

#### b) Método directo

La Figura 4.3.10 muestra los resultados de producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para las especies de estudio cultivadas en consorcio en agua residual de la industria porcina partiendo de la biomasa completa del consorcio. Puede apreciarse que la producción directa de FAME fue mejor con el catalizador homogéneo (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), con un valor de  $35,38 \pm 0,04$  %, respecto del catalizador heterogéneo (resina CT-269DR) con  $16,74 \pm 0,02$  %.

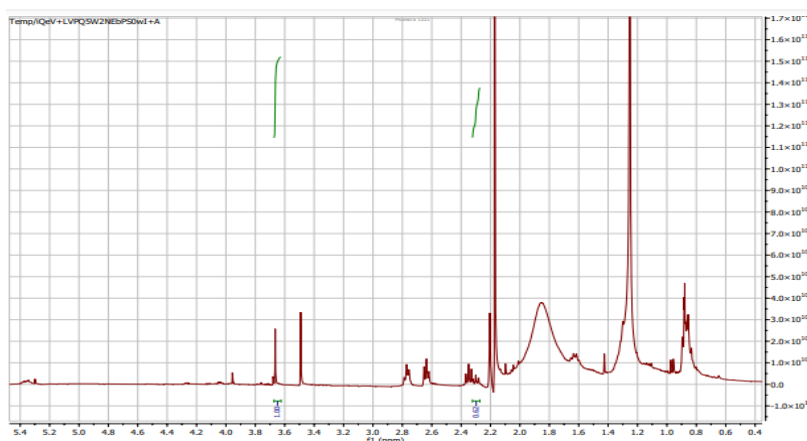
En primer lugar, comparando con las producción de FAME de las mismas especies individuales de este estudio en las que hubo mejor porcentaje de producción de FAME usando la resina como catalizador, se aprecia que en el cultivo en consorcio la producción de FAME es mayor versus las especies individuales, con mayor porcentaje de producción de FAME a partir del uso del catalizador homogéneo. Este resultado una vez más comprueba la especificidad del cultivo en consorcio. La mayoría de los trabajos que emplean H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y KOH como catalizadores de la reacción de transesterificación presentan valores próximos entre sí de los ésteres metílicos

de ácido grasos comunes al biodiésel. En el presente trabajo el catalizador homogéneo resultó más efectivo para la producción de FAME concordando con la literatura [301,322], por su parte la biomasa húmeda no arrojó buenos resultados con porcentajes bajos de FAME.



**Figura 4.3.10** Porcentaje de FAME de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio en agua residual de industria porcina con el método directo.

Para el estudio en consorcio no se encontraron trabajos de otros autores que hayan trabajado con especies en consorcio cultivadas en agua residual de mataderos de cerdos y que presenten el rendimiento gravimétrico de FAME; la mayoría de los reportes presentan perfiles de lípidos comúnmente. También se caracterizaron las muestras de los FAME obtenidos por la vía directa en términos de conversión a FAME con la técnica de RMN-<sup>1</sup>H para las extracciones en base seca. La Figura 4.3.11 muestra el espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de los FAME producidos para el consorcio de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.



**Figura 4.3.11** Ejemplo de espectro de RMN-<sup>1</sup>H para la determinación de FAME producidos a partir de la biomasa directa del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de industria porcina.

La conversión de aceites del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. a FAME pudo confirmarse con el análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H puesto que se detectó ausencia de pequeños picos de protones glicéridos entre 4,2-4,3 ppm y la presencia de un pico de protones metoxi (CH<sub>3</sub>-) a 3,6 ppm; únicamente se constató la presencia de picos característicos de grupos carbonil metilenos (-CH<sub>2</sub>-) a 2,2 ppm en la Figura 4.3.11 [287,288]. Mediante comparación de las señales que reportan los autores con las encontradas para el consorcio de microalgas estudiados en el presente trabajo, se comprobó la formación de FAME de la biomasa del consorcio.

**Tabla 4.3.9** Conversión de FAME analizado mediante por RMN-<sup>1</sup>H del consorcio de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. con el método directo

<b>Especie</b>	<b>catalizador</b>	<b>% Conversión FAMES biomasa directa</b>
<i>Consortio de Chlorella vulgaris</i> y	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	41,33
<i>Scenedesmus</i> sp.	CT-269DR	64,00

La Tabla 4.3.9 muestra los resultados para las dos especies de microalgas en consorcio analizadas en este estudio con los dos catalizadores empleados en el método directo; se aprecia que, para la biomasa directa del consorcio, el catalizador heterogéneo obtuvo un resultado mayor en comparación con el uso del ácido sulfúrico, en concordancia con los resultados obtenidos para el cultivo de las mismas especies en forma individual en este tipo de agua residual.

# **CONCLUSIONES**





### 5. Conclusiones

Como resultado del tratamiento de aguas residuales de tres tipos de industria mediante cultivos monoalgales y en consorcio, seguido de una propuesta para la valorización energética de la biomasa obtenida, las conclusiones principales extraídas en el presente trabajo se indican a continuación:

#### **Tratamiento de aguas residuales de origen industrial mediante microalgas**

Las conclusiones más importantes de este apartado en el que se realizaron los cultivos de dos especies de microalgas de forma individual en tres tipos de aguas residuales industriales son las siguientes:

- Del tratamiento del agua residual procedente del faenamiento porcino se concluye que el medio cuenta con micro y macronutrientes necesarios para el crecimiento de especies de microalgas como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. registrando concentraciones de biomasa de 0,665 g/L y 0,6206 g/L, respectivamente. Los tiempos de los monocultivos de microalgas variaron entre 11-13 días logrando buenas eliminaciones de nitrógeno total (> 60 %), fósforo total (> 50 %) y carbono orgánico total (> 60 %), por lo que tienen potencial para la biorremediación de este tipo de aguas. Además, con el tratamiento del agua se da cumplimiento a la mayoría de los parámetros que establece la normativa ambiental ecuatoriana para su vertido en el alcantarillado municipal, siendo el fósforo total la excepción.

- En el tratamiento del agua residual procedente de la industria cervecera se trabajó únicamente con cultivos monoalgales logrando crecimiento de las especies individuales *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. con concentraciones de biomasa de 0,6095 g/L y 0,4927 g/L, respectivamente. Los tiempos de los monocultivos de microalgas variaron entre 12-14 días con una buena eliminación de nitrógeno total (> 70 % para *Scenedesmus* sp., pero solo 20 % de eliminación para *Chlorella vulgaris*), pero bajas eliminaciones de fósforo total (< 60 %) y carbono orgánico total (< 40 %), por lo que su potencial para la biorremediación de este tipo de aguas caracterizadas por tener un alto contenido de carbono es limitado. Al comparar con la normativa ambiental ecuatoriana se observa que da cumplimiento a la mayoría de los parámetros para su vertido en el sistema de alcantarillado municipal con excepción de fósforo total y demanda química de oxígeno (DQO).

## Conclusiones

---

- En el tratamiento del agua residual de piscicultura se trabajó con cultivos monoalgales logrando crecimiento de las especies individuales *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. de 0,5869 g/L y 0,3891 g/L. Los tiempos de los monocultivos de microalgas variaron entre 12-13 días con los valores más altos de eliminación de nitrógeno total (> 90 %), fósforo total (> 90 %) y carbono orgánico total (> 90 %), por lo que su potencial para la biorremediación de este tipo de aguas caracterizadas por tener un alto contenido de carbono y nitrógeno es muy bueno. En este tipo de medio de cultivo hubo una eliminación del 57-77 % de Fe y se da cumplimiento a los límites establecidos en la normativa ambiental para su vertido al alcantarillado.

### Aprovechamiento energético de la biomasa obtenida

En este apartado se llevaron a cabo procesos químicos con el propósito de dar una valorización energética a la biomasa microalgal generada tras el cultivo de las microalgas en las aguas residuales. Las conclusiones más importantes son:

- Los mejores disolventes de extracción de lípidos totales de la biomasa procedente del cultivo en agua residual procedente del industria porcina fueron la mezcla cloroformo:metanol (1:2), metilciclohexano y acetato de etilo con extracciones en el rango de 14-21 % de lípidos en los cultivos monoalgales. Para la extracción de ácidos grasos libres (AGL), el rango de extracción varía de 19-34 % con los mismos disolventes extractores para ambas especies. La reacción de transesterificación produjo ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en el rango de 44-89 % para la base seca a partir de las extracciones indirectas (de lípidos y AGL) en los cultivos monoalgales, con mayores porcentajes empleando la resina comercial CT-269. Finalmente, los espectros de RMN-<sup>1</sup>H confirmaron la presencia de ácidos grasos consistentes con la composición del biodiésel; y con conversión a FAME en el rango de 70-98 % con mejores valores para la resina comercial CT-269.

- En la extracción de lípidos totales de la biomasa procedente del cultivo con agua residual de la industria cervecera los mejores disolventes extractores de lípidos totales fueron la mezcla CM (1:2), metanol y etanol con extracciones en el rango de 10-19 % de lípidos en los cultivos a partir de la biomasa seca. Para la extracción de AGL, el rango varía de 11-42 % con los mismos disolventes extractores para ambas especies. La reacción de transesterificación dio lugar a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en el rango de 19-71 % para la base seca a partir de las extracciones indirectas (de lípidos y AGL) en los cultivos monoalgales, con mejores porcentajes empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador. Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H

## Conclusiones

---

confirmaron la presencia de picos característicos, y con conversión a FAME en el rango de 46-98 % con mejores valores para la resina comercial CT-269.

- En el tratamiento de la biomasa procedente del cultivo en agua residual de piscicultura los mejores disolventes extractores de lípidos totales fueron la mezcla CM (1:2), AE y hexano para *Chlorella vulgaris* con extracciones en el rango de 11-23 % de lípidos en los cultivos a partir de la biomasa seca. Por su parte, para *Scenedesmus* sp. destacaron metanol, etanol y la mezcla CM (1:2) con extracciones en el rango de 18-30 % de lípidos totales. Para la extracción de AGL, el rango de extracción varía de 38-46 % para *C. vulgaris* empleando la mezcla CM (1:2), AE y hexano como disolventes extractores; para *Scenedesmus* sp. el rango de extracción de AGL es similar con valores de 38-42 % para los disolventes CM (1:2), AE y metanol. La reacción de transesterificación produjo ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en el rango de 19-89 % para la base seca a partir de las extracciones indirectas (de lípidos y AGL) en *C. vulgaris* y de 11-67 % para *S. sp.*, con mejores porcentajes empleando  $H_2SO_4$  como catalizador. Los espectros de RMN- $^1H$  confirmaron la presencia de picos característicos y con conversión a FAME en el rango de 51-88 % con mejores valores para el catalizador homogéneo  $H_2SO_4$ .

### **Cultivo del consorcio de microalgas en agua residual de la industria porcina**

-El crecimiento de las especies en consorcio *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. presentó una productividad de biomasa de 0,5171 g/L en cultivos 13 días a partir de los cuales se alcanzaron buenas eliminaciones de macronutrientes en términos de nitrógeno total (> 90 %), fósforo total (> 60 %) y carbono orgánico total (> 80 %), por lo que su potencial para la biorremediación de este tipo de aguas de alta carga orgánica es muy bueno y; además, ofrece eliminación de más del 80 % en el contenido de Fe y Cr, cumpliendo con los parámetros que establece la normativa ambiental ecuatoriana para su vertido al sistema de alcantarillado.

- El mejor disolventes extractor de lípidos totales para el cultivo en consorcio fue la mezcla CM (1:2) con extracciones de  $21,02 \pm 0,97$  % de lípidos en los cultivos a partir de la biomasa seca. En el caso de la biomasa húmeda, el mejor disolvente resultó ser el etanol con un contenido de lípidos de  $7,81 \pm 0,88$  %. En la extracción de AGL, el rango de extracción varía de 32-34 % para etanol, metilciclohexano y metanol como disolventes extractores. La reacción de transesterificación produjo ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en el rango de 72-95 % a partir de las extracciones indirectas de AGL, con mejores porcentajes empleando la resina comercial como catalizador. Los espectros de RMN- $^1H$  para el cultivo en

## Conclusiones

---

consorcio confirmaron la presencia de picos característicos de grupos carbonil metileno y la conversión a FAME a partir de AGL estuvo en el rango de 32-57 % con mejores valores para el catalizador heterogéneo.

A partir de las discusiones y conclusiones del presente trabajo doctoral; a continuación, se resumen algunas ideas para dar continuación a este estudio en futuras investigaciones:

- Se recomienda realizar los cultivos a escala real, especialmente el cultivo en consorcio en agua de industria porcina para confirmar los resultados del presente trabajo y verificar la eficiencia en la biorremediación de este tipo de aguas, junto con la valorización energética de la biomasa.
- Extender los cultivos durante más días hasta alcanzar la reducción completa de los macronutrientes (nitrógeno total, fósforo total y carbono orgánico total) y comprobar si al alcanzar la fase de muerte celular se ve afectado el contenido lipídico de la biomasa
- Tal y como se discutió en el presente trabajo, en la actualidad hay estudios que indican que los consorcios son beneficiosos y que no es necesario la eliminación de sólidos suspendidos en aguas residuales para el cultivo de microalgas; por ello se sugiere realizar la prueba con estas consideraciones para ahorrar la etapa de filtración gruesa y la esterilización con autoclave aquí empleado, y comprobar el rendimiento de este cultivo en términos de concentración de biomasa y eliminación de nutrientes, principalmente.
- Asimismo, se sugiere realizar un cultivo en condiciones similares para el tratamiento de aguas residuales de industria porcina (o cualquiera de las aguas de este estudio) y realizar los procedimientos de valorización energética de la biomasa obtenida empleando algún disolvente eutéctico profundo de bajo coste, y de preferencia de origen natural, para comprobar su eficiencia en la valorización como lo afirman otros investigadores.
- Finalmente, será ideal realizar el análisis de ciclo de vida (ACV) de los escenarios planteados en este estudio doctoral para la difusión de los resultados y verificar si en efecto este estudio se enmarca en el principio de la biorrefinería sostenible.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## 6. Bibliografía

- [1] Majeed, M. T., Luni, T., and Tahir, T., 2022, "Growing Green through Biomass Energy Consumption: The Role of Natural Resource and Globalization in a World Economy," *Environ Sci Pollut Res*, **29**(22), pp. 33657–33673.
- [2] Casanova, L. M., Mendes, L. B. B., Corrêa, T. de S., da Silva, R. B., Joao, R. R., Macrae, A., and Vermelho, A. B., 2022, "Development of Microalgae Biodiesel: Current Status and Perspectives," *Microorganisms*, **11**(1), p. 34.
- [3] Tang, C., Gao, X., Hu, D., Dai, D., Qv, M., Liu, D., and Zhu, L., 2023, "Nutrient Removal and Lipid Production by the Co-Cultivation of *Chlorella Vulgaris* and *Scenedesmus Dimorphus* in Landfill Leachate Diluted with Recycled Harvesting Water," *Bioresource Technology*, **369**, p. 128496.
- [4] Chiriboga, G., De La Rosa, A., Molina, C., Velarde, S., and Carvajal C, G., 2020, "Energy Return on Investment (EROI) and Life Cycle Analysis (LCA) of Biofuels in Ecuador," *Heliyon*, **6**(6), p. e04213.
- [5] Halkos, G. E., and Gkampoura, E.-C., 2020, "Reviewing Usage, Potentials, and Limitations of Renewable Energy Sources," *Energies*, **13**(11), p. 2906.
- [6] 2024, "Monthly Energy Review - January 2024."
- [7] Baležentis, T., Streimikiene, D., Zhang, T., and Liobikiene, G., 2019, "The Role of Bioenergy in Greenhouse Gas Emission Reduction in EU Countries: An Environmental Kuznets Curve Modelling," *Resources, Conservation and Recycling*, **142**, pp. 225–231.
- [8] Sreekumar, N., Giri Nandagopal, M. S., Vasudevan, A., Antony, R., and Selvaraju, N., 2016, "Marine Microalgal Culturing in Open Pond Systems for Biodiesel Production—Critical Parameters," *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, **8**(2), p. 023105.
- [9] El Bakraoui, H., Slaoui, M., Mabrouki, J., Hmouni, D., and Laroche, C., 2022, "Recent Trends on Domestic, Agricultural and Industrial Wastewaters Treatment Using Microalgae Biorefinery System," *Applied Sciences*, **13**(1), p. 68.
- [10] Guaita-Pradas, I., Rodríguez-Mañay, L. O., and Marques-Perez, I., 2023, "Competitiveness of Ecuador's Flower Industry in the Global Market in the Period 2016–2020," *Sustainability*, **15**(7), p. 5821.
- [11] Posso, F., Pulido, A., and Acevedo-Páez, J. C., 2023, "Towards The Hydrogen Economy: Estimation of Green Hydrogen Production Potential and the Impact of Its Uses in Ecuador as a Case Study," *International Journal of Hydrogen Energy*, **48**(32), pp. 11922–11942.
- [12] United Nations Department of Economic and Social Affairs, 2023, *Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2023: Edición especial*, United Nations.
- [13] "Desarrollo-Sustentable Ecuador Ministerio de Energía y Minas.Pdf."
- [14] "PANORAMA-2023 OLADE.Pdf."
- [15] Mohan, S. V., Butti, S. K., Amulya, K., Dahiya, S., and Modestra, J. A., 2016, "Waste Biorefinery: A New Paradigm for a Sustainable Bioelectro Economy," *Trends in Biotechnology*, **34**(11), pp. 852–855.
- [16] Ubando, A. T., Anderson S. Ng, E., Chen, W.-H., Culaba, A. B., and Kwon, E. E., 2022, "Life Cycle Assessment of Microalgal Biorefinery: A State-of-the-Art Review," *Bioresource Technology*, **360**, p. 127615.
- [17] Liu, Y., Lyu, Y., Tian, J., Zhao, J., Ye, N., Zhang, Y., and Chen, L., 2021, "Review of Waste Biorefinery Development towards a Circular Economy: From the Perspective of a Life Cycle Assessment," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **139**, p. 110716.
- [18] Ganesh Saratale, R., Ponnusamy, V. K., Jeyakumar, R. B., Sirohi, R., Piechota, G., Shobana, S., Dharmaraja, J., Lay, C., Dattatraya Saratale, G., Seung Shin, H., and Ashokkumar, V., 2022, "Microalgae Cultivation Strategies Using Cost-Effective Nutrient Sources: Recent Updates and Progress towards Biofuel Production," *Bioresource Technology*, **361**, p. 127691.



## Bibliografía

---

- [19] Calijuri, M. L., Silva, T. A., Magalhães, I. B., Pereira, A. S. A. de P., Marangon, B. B., Assis, L. R. de, and Lorentz, J. F., 2022, "Bioproducts from Microalgae Biomass: Technology, Sustainability, Challenges and Opportunities," *Chemosphere*, **305**, p. 135508.
- [20] Camarena-Bernard, C., and Rout, N. P., 2018, "Native Microalgae from Eutrophic Water: Potential for Wastewater Treatment, Low-Cost Biomass, and Lipid Production," *Industrial Biotechnology*, **14**(5), pp. 257–264.
- [21] Aditya, L., Mahlia, T. M. I., Nguyen, L. N., Vu, H. P., and Nghiem, L. D., 2022, "Microalgae-Bacteria Consortium for Wastewater Treatment and Biomass Production," *Science of The Total Environment*, **838**, p. 155871.
- [22] Olguín, E. J., Sánchez-Galván, G., Arias-Olguín, I. I., Melo, F. J., González-Portela, R. E., Cruz, L., De Philippis, R., and Adessi, A., 2022, "Microalgae-Based Biorefineries: Challenges and Future Trends to Produce Carbohydrate Enriched Biomass, High-Added Value Products and Bioactive Compounds," *Biology*, **11**(8), p. 1146.
- [23] Amenorfenyo, D. K., Huang, X., Zhang, Y., Zeng, Q., Zhang, N., Ren, J., and Huang, Q., 2019, "Microalgae Brewery Wastewater Treatment: Potentials, Benefits and the Challenges," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **16**(11).
- [24] Amenorfenyo, D. K., Huang, X., Zhang, Y., Zeng, Q., Zhang, N., Ren, J., and Huang, Q., 2019, "Microalgae Brewery Wastewater Treatment: Potentials, Benefits and the Challenges," *IJERPH*, **16**(11), p. 1910.
- [25] Bustillo-Lecompte, C. F., and Mehrvar, M., 2015, "Slaughterhouse Wastewater Characteristics, Treatment, and Management in the Meat Processing Industry: A Review on Trends and Advances," *Journal of Environmental Management*, **161**, pp. 287–302.
- [26] Molina Giménez, A., and Fernández-Aracil, P., eds., 2017, *Herramientas para la gestión territorial sostenible del agua*, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alicante.
- [27] Barnharst, T., Rajendran, A., Sun, X., and Hu, B., 2023, "Process Optimization of Aquaculture Wastewater Treatment Using a Mycoalgae Biofilm," *Algal Research*, **70**, p. 103020.
- [28] Ferreira, A., Figueiredo, D., Cardeiras, R., Nabais, R., Ferreira, F., Ribeiro, B., Cordovil, C. M. d. S., Acién, F. G., and Gouveia, L., 2022, "Exploring Different Pretreatment Methodologies for Allowing Microalgae Growth in Undiluted Piggery Wastewater," *Agronomy*, **12**(3), p. 580.
- [29] Chiu, S.-Y., Kao, C.-Y., Chen, T.-Y., Chang, Y.-B., Kuo, C.-M., and Lin, C.-S., 2015, "Cultivation of Microalgal *Chlorella* for Biomass and Lipid Production Using Wastewater as Nutrient Resource," *Bioresource Technology*, **184**, pp. 179–189.
- [30] Zhao, G., Wang, X., Hong, Y., Liu, X., Wang, Q., Zhai, Q., and Zhang, H., 2022, "Attached Cultivation of Microalgae on Rational Carriers for Swine Wastewater Treatment and Biomass Harvesting," *Bioresource Technology*, **351**, p. 127014.
- [31] Bhatt, P., Bhandari, G., Turco, R. F., Aminikhoei, Z., Bhatt, K., and Simsek, H., 2022, "Algae in Wastewater Treatment, Mechanism, and Application of Biomass for Production of Value-Added Product," *Environmental Pollution*, **309**, p. 119688.
- [32] Hasan, R., 2014, "Bioremediation of Swine Wastewater and Biofuel Potential by Using *Chlorella Vulgaris*, *Chlamydomonas Reinhardtii*, and *Chlamydomonas Debaryana*," *J Pet Environ Biotechnol*, **05**(03).
- [33] Villarroel Hipp, M. P., and Silva Rodríguez, D., 2018, "Bioremediation of Piggery Slaughterhouse Wastewater Using the Marine Protist, *Thraustochytrium Kinney VAL-B1*," *Journal of Advanced Research*, **12**, pp. 21–26.
- [34] Medrano-Barboza, J., Aguirre-Bravo, A. A., Encalada-Rosales, P., Yerovi, R., and Ramírez-Iglesias, J. R., 2021, "Uso de aguas residuales de porcicultura y faenamiento para el crecimiento y obtención de biomasa algal de *Chlorella vulgaris*," *BIONATURA*, **6**(2), p. 8.
- [35] Montañó San Agustín, D., Orta Ledesma, M. T., Monje Ramírez, I., Yáñez Noguez, I., Luna Pabello, V. M., and Velasquez-Orta, S. B., 2022, "A Non-Sterile Heterotrophic Microalgal

## Bibliografía

---

- Process for Dual Biomass Production and Carbon Removal from Swine Wastewater,” *Renewable Energy*, **181**, pp. 592–603.
- [36] Xie, D., Ji, X., Zhou, Y., Dai, J., He, Y., Sun, H., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, X., and Chen, B., 2022, “Chlorella Vulgaris Cultivation in Pilot-Scale to Treat Real Swine Wastewater and Mitigate Carbon Dioxide for Sustainable Biodiesel Production by Direct Enzymatic Transesterification,” *Bioresource Technology*, **349**, p. 126886.
- [37] Zheng, M., Dai, J., Ji, X., Li, D., He, Y., Wang, M., Huang, J., and Chen, B., 2021, “An Integrated Semi-Continuous Culture to Treat Original Swine Wastewater and Fix Carbon Dioxide by an Indigenous Chlorella Vulgaris MBFJNU-1 in an Outdoor Photobioreactor,” *Bioresource Technology*, **340**, p. 125703.
- [38] Pazmiño, M. L., and Ramirez, A. D., 2021, “Life Cycle Assessment as a Methodological Framework for the Evaluation of the Environmental Sustainability of Pig and Pork Production in Ecuador,” *Sustainability*, **13**(21), p. 11693.
- [39] Luo, L., 2016, “Nutrient Removal and Lipid Production by Coelastrella Sp. in Anaerobically and Aerobically Treated Swine Wastewater,” *Bioresource Technology*, p. 7.
- [40] Hernández-Chea, R. D., Morales-Ramírez, P., Hernández, M., Toledo, A., Hun, A., Sciutto, E., and Fleury, A., 2023, “Taenia Solium Taeniasis/Cysticercosis in Guatemala: A Prevalent Public Health Problem?,” *Pathogens and Global Health*, **117**(1), pp. 5–13.
- [41] Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., Solana, M., Bertuccio, A., and García-González, M. C., 2016, “Microalgae Cultivation in High Rate Algal Ponds Using Slaughterhouse Wastewater for Biofuel Applications,” *Chemical Engineering Journal*, **285**, pp. 449–458.
- [42] Mezzomo, N., Saggiorato, A. G., Siebert, R., Tatsch, P. O., Lago, M. C., Hemkemeier, M., Costa, J. A. V., Bertolin, T. E., and Colla, L. M., 2010, “Cultivation of Microalgae Spirulina Platensis (Arthrospira Platensis) from Biological Treatment of Swine Wastewater,” *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **30**(1), pp. 173–178.
- [43] Abou-Shanab, R. A. I., Ji, M. K., Kim, H. C., Paeng, K. J., and Jeon, B. H., 2013, “Microalgal Species Growing on Piggery Wastewater as a Valuable Candidate for Nutrient Removal and Biodiesel Production,” *Journal of Environmental Management*, **115**, pp. 257–264.
- [44] Hasan, R., Zhang, B., Wang, L., and Shahbazi, A., 2014, “Bioremediation of Swine Wastewater and Biofuel Potential by Using Chlorella Vulgaris, Chlamydomonas Reinhardtii, and Chlamydomonas Debaryana,” *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, **05**(03), pp. 1–20.
- [45] Morais, E. G., Cristofoli, N. L., Maia, I. B., Magina, T., Cerqueira, P. R., Teixeira, M. R., Varela, J., Barreira, L., and Gouveia, L., 2021, “Microalgal Systems for Wastewater Treatment: Technological Trends and Challenges towards Waste Recovery,” *Energies*, **14**(23), p. 8112.
- [46] Zheng, H., Liu, M., Lu, Q., Wu, X., Ma, Y., Cheng, Y., Addy, M., Liu, Y., and Ruan, R., 2018, “Balancing Carbon/Nitrogen Ratio to Improve Nutrients Removal and Algal Biomass Production in Piggery and Brewery Wastewaters,” *Bioresource Technology*, **249**, pp. 479–486.
- [47] Zhu, L., Wang, Z., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Feng, P., and Yuan, Z., 2013, “Nutrient Removal and Biodiesel Production by Integration of Freshwater Algae Cultivation with Piggery Wastewater Treatment,” *Water Research*, **47**(13), pp. 4294–4302.
- [48] Gastl, M., and Henle, T., 2023, “A Special Issue of European Food Research and Technology: The Chemistry behind Malt and Beer Production—from Raw Material to Product Quality,” *Eur Food Res Technol*, **249**(1), pp. 1–2.
- [49] Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., and Libkind, D., 2021, “Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza,” *Revista Argentina de Microbiología*, **53**(4), pp. 359–377.
- [50] Dias, C., Santos, J. A. L., Reis, A., and Lopes da Silva, T., 2023, “The Use of Oleaginous Yeasts and Microalgae Grown in Brewery Wastewater for Lipid Production and Nutrient Removal: A Review,” *Waste Biomass Valor*.

## Bibliografía

---

- [51] Olajire, A. A., 2020, "The Brewing Industry and Environmental Challenges," *Journal of Cleaner Production*, **256**, p. 102817.
- [52] Pilone, V., Di Pasquale, A., and Stasi, A., 2023, "Consumer Preferences for Craft Beer by Means of Artificial Intelligence: Are Italian Producers Doing Well?," *Beverages*, **9**(1), p. 26.
- [53] Choi, H.-J., 2016, "Parametric Study of Brewery Wastewater Effluent Treatment Using *Chlorella Vulgaris* Microalgae," *Environmental Engineering Research*, **21**(4), pp. 401–408.
- [54] Su, Y., Zhu, X., Zou, R., and Zhang, Y., 2022, "The Interactions between Microalgae and Wastewater Indigenous Bacteria for Treatment and Valorization of Brewery Wastewater," *Resources, Conservation and Recycling*, **182**, p. 106341.
- [55] Papadopoulos, K. P., Economou, C. N., Stefanidou, N., Moustaka-Gouni, M., Genitsaris, S., Aggelis, G., Tekerlekopoulou, A. G., and Vayenas, D. V., 2023, "A Semi-Continuous Algal-Bacterial Wastewater Treatment Process Coupled with Bioethanol Production," *Journal of Environmental Management*, **326**, p. 116717.
- [56] Yirgu, Z., Leta, S., Hussien, A., Khan, M. M., and Aragaw, T., 2023, "Pretreatment of Lipid-Extracted Biomass of *Scenedesmus* Sp. Grown in Wastewater for Bioethanol Production," *Biomass Conv. Bioref.*
- [57] Dong, H., Liu, W., Zhang, H., Wang, Z., Feng, F., Zhou, L., Duan, H., Xu, T., Li, X., and Ma, J., 2023, "Enhanced Biomass Production and Wastewater Treatment in Attached Co-Culture of *Chlorella Pyrenoidosa* with Nitrogen-Fixing Bacteria *Azotobacter Beijerinckii*," *Bioprocess Biosyst Eng.*
- [58] Kukwa Donald and Chetty Manimagalay, 2022, "Biomass Production and Simultaneous Minerals Sequestration from Brewery Wastewater with Concomitant Lipid Accumulation Using Algae," *Chemical Engineering Transactions*, **96**, pp. 475–480.
- [59] Subramaniam, V., Subashchandrabose, S. R., Ganeshkumar, V., Thavamani, P., Chen, Z., Naidu, R., and Megharaj, M., 2016, "Cultivation of *Chlorella* on Brewery Wastewater and Nano-Particle Biosynthesis by Its Biomass," *Bioresource Technology*, **211**, pp. 698–703.
- [60] Navarro-López, E., Ruíz-Nieto, A., Ferreira, A., Ación, F. G., and Gouveia, L., 2020, "Biostimulant Potential of *Scenedesmus Obliquus* Grown in Brewery Wastewater," *Molecules*, **25**(3), p. 664.
- [61] Pathi Chandra Shekar, 2024, "The Sustainable Development of Fisheries and Aquaculture."
- [62] Tom, A. P., Jayakumar, J. S., Biju, M., Somarajan, J., and Ibrahim, M. A., 2021, "Aquaculture Wastewater Treatment Technologies and Their Sustainability: A Review," *Energy Nexus*, **4**, p. 100022.
- [63] Marks, D., Bayrak, M. M., and Connell, J., 2023, "Increasing Livelihood Vulnerabilities to Coastal Erosion and Wastewater Intrusion: The Political Ecology of Thai Aquaculture in Peri-urban Bangkok," *Geographical Research*, pp. 1745-5871.12580.
- [64] Kurniawan, S. B., Abdullah, S. R. S., Imron, M. F., Ahmad, A., Mohd Said, N. S., Mohd Rahim, N. F., Mohammad Alnawajha, M., Abu Hasan, H., Othman, A. R., and Purwanti, I. F., 2021, "Potential of Valuable Materials Recovery from Aquaculture Wastewater: An Introduction to Resource Reclamation," *Aquaculture Research*, **52**(7), pp. 2954–2962.
- [65] He, Y., Lian, J., Wang, L., Tan, L., Khan, F., Li, Y., Wang, H., Rebours, C., Han, D., and Hu, Q., 2023, "Recovery of Nutrients from Aquaculture Wastewater: Effects of Light Quality on the Growth, Biochemical Composition, and Nutrient Removal of *Chlorella Sorokiniana*," *Algal Research*, **69**, p. 102965.
- [66] Ghosh, S. K., ed., 2020, *Waste Management as Economic Industry Towards Circular Economy*, Springer Singapore, Singapore.
- [67] Li, Z., Yu, E., Zhang, K., Gong, W., Xia, Y., Tian, J., Wang, G., and Xie, J., 2020, "Water Treatment Effect, Microbial Community Structure, and Metabolic Characteristics in a Field-Scale Aquaculture Wastewater Treatment System," *Front. Microbiol.*, **11**, p. 930.

## Bibliografía

---

- [68] Khan, S., Das, P., Thaher, M. I., AbdulQuadir, M., Mahata, C., and Al Jabri, H., 2023, "Utilization of Nitrogen-Rich Agricultural Waste Streams by Microalgae for the Production of Protein and Value-Added Compounds," *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, **41**, p. 100797.
- [69] Satya, A. D. M., Cheah, W. Y., Yazdi, S. K., Cheng, Y.-S., Khoo, K. S., Vo, D.-V. N., Bui, X. D., Vithanage, M., and Show, P. L., 2023, "Progress on Microalgae Cultivation in Wastewater for Bioremediation and Circular Bioeconomy," *Environmental Research*, **218**, p. 114948.
- [70] Pirhonen, J., Koukka, S., and Pulkkinen, K., 2023, "Supplementing Air with CO<sub>2</sub> Stripped from Recirculating Aquaculture Improves Growth of Two Green Microalgae in Aquaculture Wastewater," *Aquaculture*, **567**, p. 739242.
- [71] Kashem, A. H. M., Das, P., AbdulQuadir, M., Khan, S., Thaher, M. I., Alghasal, G., Hawari, A. H., and Al-Jabri, H., 2023, "Microalgal Bioremediation of Brackish Aquaculture Wastewater," *Science of The Total Environment*, **873**, p. 162384.
- [72] Tejido-Nuñez, Y., Aymerich, E., Sancho, L., and Refardt, D., 2019, "Treatment of Aquaculture Effluent with *Chlorella Vulgaris* and *Tetradismus Obliquus*: The Effect of Pretreatment on Microalgae Growth and Nutrient Removal Efficiency," *Ecological Engineering*, **136**(June), pp. 1–9.
- [73] Ministerio de Ambiente, "Acuerdo ministerial 097-A."
- [74] Kumar, N., Banerjee, C., Chang, J.-S., and Shukla, P., 2022, "Valorization of Wastewater through Microalgae as a Prospect for Generation of Biofuel and High-Value Products," *Journal of Cleaner Production*, **362**, p. 132114.
- [75] Kumar, Y., Kaur, S., Kheto, A., Munshi, M., Sarkar, A., Om Pandey, H., Tarafdar, A., Sindhu, R., and Sirohi, R., 2022, "Cultivation of Microalgae on Food Waste: Recent Advances and Way Forward," *Bioresource Technology*, **363**, p. 127834.
- [76] Msanne, J., Polle, J., and Starckenburg, S., 2020, "An Assessment of Heterotrophy and Mixotrophy in *Scenedesmus* and Its Utilization in Wastewater Treatment," *Algal Research*, **48**, p. 101911.
- [77] Morillas-España, A., Ruiz-Nieto, Á., Lafarga, T., Acién, G., Arbib, Z., and González-López, C. V., 2022, "Biostimulant Capacity of *Chlorella* and *Chlamydomodium* Species Produced Using Wastewater and Centrate," *Biology*, **11**(7), p. 1086.
- [78] López-Sánchez, A., Silva-Gálvez, A. L., Zárata-Aranda, J. E., Yebra-Montes, C., Orozco-Nunnally, D. A., Carrillo-Nieves, D., and Gradilla-Hernández, M. S., 2022, "Microalgae-Mediated Bioremediation of Cattle, Swine and Poultry Digestates Using Mono- and Mixed-Cultures Coupled with an Optimal Mixture Design," *Algal Research*, **64**, p. 102717.
- [79] "Lage 2023 Chemical Composition and Species Identification of Microalgal Biomass Municipal Wastewater.Htm."
- [80] "Ramos 2014 Produccion de Biogas a Partir de Biomasa de La Microalaga *Scenedesmus* Sp. Procedente de Diferente Procesos.Pdf."
- [81] Pompei, C. M. E., Bolzani, H. R., and Da Silva, G. H. R., 2023, "Use of Native Microalgae in Anaerobic Sewage Treatment: Lab and Pilot-Scale Approaches," *J Appl Phycol*.
- [82] Molazadeh, M., Ahmadzadeh, H., Pourianfar, H. R., Lyon, S., and Rampelotto, P. H., 2019, "The Use of Microalgae for Coupling Wastewater Treatment With CO<sub>2</sub> Biofixation," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **7**, p. 42.
- [83] Salama, E.-S., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., El-Dalatony, M. M., Yang, I.-S., Min, B., and Jeon, B.-H., 2017, "Recent Progress in Microalgal Biomass Production Coupled with Wastewater Treatment for Biofuel Generation," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **79**, pp. 1189–1211.
- [84] Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Chang, S. W., Nguyen, D. D., and Kumar, S. M., 2019, "Microalgae Biomass from Swine Wastewater and Its Conversion to Bioenergy," *Bioresource Technology*, **275**, pp. 109–122.
- [85] Acién, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. M., Fernández-Sevilla, J. M., and Molina-Grima, E., 2016, "Wastewater Treatment Using Microalgae: How Realistic a

## Bibliografía

---

- Contribution Might It Be to Significant Urban Wastewater Treatment?," *Appl Microbiol Biotechnol*, **100**(21), pp. 9013–9022.
- [86] "CATALOGO\_DE\_MICROALGAS\_Y\_CIANOBIOTERIAS DEL ECUADOR.Pdf."
- [87] Han, X., Hu, X., Yin, Q., Li, S., and Song, C., 2021, "Intensification of Brewery Wastewater Purification Integrated with CO<sub>2</sub> Fixation via Microalgae Co-Cultivation," *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **9**(4), p. 105710.
- [88] Yirgu, Z., Asfaw, S. L., Dekebo, A. H., Khan, M. M., and Aragaw, T., 2023, "Simultaneous Phycoremediation and Lipid Production by Microalgae Grown in Non-Sterilized and Sterilized Anaerobically Digested Brewery Effluent," *Sustainability*, **15**(21), p. 15403.
- [89] García-Martínez, J. B., Sánchez-Tobos, L. P., Carvajal-Albarracín, N. A., Barajas-Solano, A. F., Barajas-Ferreira, C., Kafarov, V., and Zuorro, A., 2022, "The Circular Economy Approach to Improving CNP Ratio in Inland Fishery Wastewater for Increasing Algal Biomass Production."
- [90] Prono, L., 2022, "Martinus W. Beijerinck | Microbiólogo y Botánico Holandés | Británica," *Enciclopedia Británica* [Online]. Available: <https://www.britannica.com/biography/Martinus-W-Beijerinck>. [Accessed: 05-Apr-2022].
- [91] Guiry, M. D., and Guiry, G. M., 2022, "Chlorella Vulgaris Beijerinck 1890," *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [Online]. Available: <https://www.algaebase.org>.
- [92] Ru, I. T. K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M. E. A., and Nagappan, T., 2020, "*Chlorella Vulgaris* : A Perspective on Its Potential for Combining High Biomass with High Value Bioproducts," *Applied Phycology*, **1**(1), pp. 2–11.
- [93] Peter, A. P., Tan, X., Lim, J. Y., Chew, K. W., Koyande, A. K., and Show, P. L., 2022, "Environmental Analysis of Chlorella Vulgaris Cultivation in Large Scale Closed System under Waste Nutrient Source," *Chemical Engineering Journal*, **433**, p. 134254.
- [94] Hariram, V., John, J. G., Sangeethkumar, E., Gajalakshmi, B., and Ramanathan, V., 2022, "Scenedesmus Obliquus and Chlorella Vulgaris – A Prospective Algal Fuel Source," *Nat. Env. Poll. Tech*, **21**(5(Suppl)), pp. 2129–2139.
- [95] López-Pacheco, I. Y., Castillo-Vacas, E. I., Castañeda-Hernández, L., Gradiz-Menjivar, A., Rodas-Zuluaga, L. I., Castillo-Zacarias, C., Sosa-Hernández, J. E., Barceló, D., Iqbal, H. M. N., and Parra-Saldívar, R., 2021, "CO<sub>2</sub> Biocapture by Scenedesmus Sp. Grown in Industrial Wastewater," *Science of The Total Environment*, **790**, p. 148222.
- [96] "Tesisdoctoral2019 A.SanchezBayo.Pdf."
- [97] Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., and Chang, J. S., 2011, "Cultivation, Photobioreactor Design and Harvesting of Microalgae for Biodiesel Production: A Critical Review," *Bioresource Technology*, **102**(1), pp. 71–81.
- [98] Zhan, J., Rong, J., and Wang, Q., 2017, "Mixotrophic Cultivation, a Preferable Microalgae Cultivation Mode for Biomass/Bioenergy Production, and Bioremediation, Advances and Prospect," *International Journal of Hydrogen Energy*, **42**(12), pp. 8505–8517.
- [99] Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., and Chen, G., 2010, "Biodiesel Production by Microalgal Biotechnology," *Applied Energy*, **87**(1), pp. 38–46.
- [100] Yeh, K.-L., and Chang, J.-S., 2012, "Effects of Cultivation Conditions and Media Composition on Cell Growth and Lipid Productivity of Indigenous Microalga Chlorella Vulgaris ESP-31," *Bioresource Technology*, **105**, pp. 120–127.
- [101] Hossain, N., and Mahlia, T. M. I., 2019, "Progress in Physicochemical Parameters of Microalgae Cultivation for Biofuel Production," *Critical Reviews in Biotechnology*, **39**(6), pp. 835–859.
- [102] Valchev, D., and Ribarova, I., 2022, "A Review on the Reliability and the Readiness Level of Microalgae-Based Nutrient Recovery Technologies for Secondary Treated Effluent in Municipal Wastewater Treatment Plants," *Processes*, **10**(2), p. 399.
- [103] "Gupta 2015 a Mini Review Photobioreactors for Large Scale Algal Cultivation.Pdf."

## Bibliografía

---

- [104] Brennan, L., and Owende, P., 2010, "Biofuels from Microalgae-A Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-Products," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**(2), pp. 557–577.
- [105] Lutz, G. A., Zhang, W., and Liu, T., 2016, "Feasibility of Using Brewery Wastewater for Biodiesel Production and Nutrient Removal by *Scenedesmus Dimorphus*," *Environmental Technology*, **37**(12), pp. 1568–1581.
- [106] Ferreira, A., Ribeiro, B., Marques, P. A. S. S., Ferreira, A. F., Dias, A. P., Pinheiro, H. M., Reis, A., and Gouveia, L., 2017, "Scenedesmus Obliquus Mediated Brewery Wastewater Remediation and CO<sub>2</sub> Biofixation for Green Energy Purposes," *Journal of Cleaner Production*, **165**, pp. 1316–1327.
- [107] Tan, X., Xie, G.-J., Nie, W.-B., Xing, D.-F., Liu, B.-F., Ding, J., and Ren, N.-Q., 2021, "High Value-Added Biomaterials Recovery from Granular Sludge Based Wastewater Treatment Process," *Resources, Conservation and Recycling*, **169**, p. 105481.
- [108] Kuo, C.-M., Jian, J.-F., Lin, T.-H., Chang, Y.-B., Wan, X.-H., Lai, J.-T., Chang, J.-S., and Lin, C.-S., 2016, "Simultaneous Microalgal Biomass Production and CO<sub>2</sub> Fixation by Cultivating *Chlorella* Sp. GD with Aquaculture Wastewater and Boiler Flue Gas," *Bioresource Technology*, **221**, pp. 241–250.
- [109] Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., and Tuteja, N., 2014, "Biofertilizers Function as Key Player in Sustainable Agriculture by Improving Soil Fertility, Plant Tolerance and Crop Productivity," *Microb Cell Fact*, **13**(1), p. 66.
- [110] Yan, C., Zhang, L., Luo, X., and Zheng, Z., 2013, "Effects of Various LED Light Wavelengths and Intensities on the Performance of Purifying Synthetic Domestic Sewage by Microalgae at Different Influent C/N Ratios," *Ecological Engineering*, **51**, pp. 24–32.
- [111] Demirbas, M. F., 2011, "Biofuels from Algae for Sustainable Development," *Applied Energy*, **88**(10), pp. 3473–3480.
- [112] Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y., and Farid, M., 2014, "Effective Extraction of Microalgae Lipids from Wet Biomass for Biodiesel Production," *Biomass and Bioenergy*, **66**, pp. 159–167.
- [113] Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., and Wang, J., 2012, "Biodiesel Production from Algae Oil High in Free Fatty Acids by Two-Step Catalytic Conversion," *Bioresource Technology*, **111**, pp. 208–214.
- [114] Khan, M. I., Shin, J. H., and Kim, J. D., 2018, "The Promising Future of Microalgae: Current Status, Challenges, and Optimization of a Sustainable and Renewable Industry for Biofuels, Feed, and Other Products," *Microb Cell Fact*, **17**(1), p. 36.
- [115] Sacristán de Alva, M., Luna-Pabello, V. M., Cadena, E., and Ortíz, E., 2013, "Green Microalga *Scenedesmus Acutus* Grown on Municipal Wastewater to Couple Nutrient Removal with Lipid Accumulation for Biodiesel Production," *Bioresource Technology*, **146**, pp. 744–748.
- [116] Sánchez-Bayo, A., López-Chicharro, D., Morales, V., Espada, J. J., Puyol, D., Martínez, F., Astals, S., Vicente, G., Bautista, L. F., and Rodríguez, R., 2020, "Biodiesel and Biogas Production from *Isochrysis Galbana* Using Dry and Wet Lipid Extraction: A Biorefinery Approach," *Renewable Energy*, **146**, pp. 188–195.
- [117] Rajesh Banu, J., Preethi, Kavitha, S., Gunasekaran, M., and Kumar, G., 2020, "Microalgae Based Biorefinery Promoting Circular Bioeconomy-Techno Economic and Life-Cycle Analysis," *Bioresource Technology*, **302**, p. 122822.
- [118] "Tesis\_IMH\_Completa\_VF.Pdf."
- [119] Lai, Y. S., Francesco, F. D., Aguinaga, A., Parameswaran, P., and Rittmann, B. E., 2016, "Improving Lipid Recovery from *Scenedesmus* Wet Biomass by Surfactant-Assisted Disruption," *Green Chem.*, **18**(5), pp. 1319–1326.
- [120] Verspreet, J., Kuchendorf, C. M., Ackermann, B., and Bastiaens, L., 2023, "The Impact of Nutrient Limitation and Harvest Method on the Wet Preservation of *Chlorella Vulgaris* Biomass," *Bioengineering*, **10**(5), p. 600.

## Bibliografía

---

- [121] Park, J., Kim, B., Chang, Y. K., and Lee, J. W., 2017, "Wet in Situ Transesterification of Microalgae Using Ethyl Acetate as a Co-Solvent and Reactant," *Bioresource Technology*, **230**, pp. 8–14.
- [122] Halim, R., Danquah, M. K., and Webley, P. A., 2012, "Extraction of Oil from Microalgae for Biodiesel Production: A Review," *Biotechnology Advances*, **30**(3), pp. 709–732.
- [123] Sharma, Y. C., Singh, B., and Korstad, J., 2011, "A Critical Review on Recent Methods Used for Economically Viable and Eco-Friendly Development of Microalgae as a Potential Feedstock for Synthesis of Biodiesel," *Green Chem.*, **13**(11), p. 2993.
- [124] Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., and Subramaniam, S., 2011, "Lipid Classification, Structures and Tools," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1811**(11), pp. 637–647.
- [125] Soleimani, M., Samipoor, M., and Majidian, N., 2021, "Extraction Lipids from *Chlorella Vulgaris* by Supercritical CO<sub>2</sub> for Biodiesel Production," *South African Journal of Chemical Engineering*, **38**(November 2020), pp. 121–131.
- [126] Breil, C., Vian, M. A., Zemb, T., Kunz, W., and Chemat, F., 2017, "'Bligh and Dyer' and Folch Methods for Solid–Liquid–Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents," *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(4), pp. 1–21.
- [127] Luque De Castro, M. D., and García-Ayuso, L. E., 1998, "Soxhlet Extraction of Solid Materials: An Outdated Technique with a Promising Innovative Future," *Analytica Chimica Acta*, **369**(1–2), pp. 1–10.
- [128] Lepage, G., and Roy, C. C., 1984, "Improved Recovery of Fatty Acid through Direct Transesterification without Prior Extraction or Purification.," *Journal of Lipid Research*, **25**(12), pp. 1391–1396.
- [129] "Russel2023 Lipid Extraction from *Chlorella Vulgaris* & *Haematococcus Pluvialis* Using the.Htm."
- [130] Park, J. Y., Nam, B., Choi, S. A., Oh, Y. K., and Lee, J. S., 2014, "Effects of Anionic Surfactant on Extraction of Free Fatty Acid from *Chlorella Vulgaris*," *Bioresource Technology*, **166**, pp. 620–624.
- [131] Liu, Y., Lotero, E., and Goodwin, J. G., 2006, "Effect of Water on Sulfuric Acid Catalyzed Esterification," *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **245**(1–2), pp. 132–140.
- [132] Al-Widyan, M. I., and Al-Shyoukh, A. O., 2002, "Experimental Evaluation of the Transesterification of Waste Palm Oil into Biodiesel," *Bioresource Technology*, **85**(3), pp. 253–256.
- [133] Cho, H. S., Oh, Y. K., Park, S. C., Lee, J. W., and Park, J. Y., 2013, "Effects of Enzymatic Hydrolysis on Lipid Extraction from *Chlorella Vulgaris*," *Renewable Energy*, **54**, pp. 156–160.
- [134] D'oca, M. G. M., Viêgas, C. V., Lemões, J. S., Miyasaki, E. K., Morón-Villarreyes, J. A., Primel, E. G., and Abreu, P. C., 2011, "Production of FAMES from Several Microalgal Lipidic Extracts and Direct Transesterification of the *Chlorella Pyrenoidosa*," *Biomass and Bioenergy*, **35**(4), pp. 1533–1538.
- [135] Belkhanchi, H., Rouan, M., Hammi, M., Ziat, Y., and Chigr, M., 2021, "Synthesis of Biodiesel by Transesterification of Used Frying Oils (Ufo) through Basic Homogeneous Catalysts (Naoh and Koh)," *Biointerface Research in Applied Chemistry*, **11**(5), pp. 12858–12868.
- [136] Mathimani, T., Uma, L., and Prabakaran, D., 2015, "Homogeneous Acid Catalysed Transesterification of Marine Microalga *Chlorella Sp. BDUG 91771* Lipid – An Efficient Biodiesel Yield and Its Characterization," *Renewable Energy*, **81**, pp. 523–533.
- [137] UTEX, 2019, "Bold Basal Medium Recipe," *Biosci. Culture Collection of Algae*.
- [138] Nichols, H. W., and Bold, H. C., 1965, "*Trichosarcina Polymorpha* Gen. et Sp. Nov.," *Journal of Phycology*, **1**(1), pp. 34–38.

## Bibliografía

---

- [139] Stein, J., 1973, "Culture Methods and Growth Measurements," Handbook of Phycological methods. Cambridge University Press, p. 448 pp.
- [140] Chia, M. A., Lombardi, A. T., and Melão, M. da G. G., 2013, "Growth and Biochemical Composition of *Chlorella Vulgaris* in Different Growth Media," *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, **85**(4), pp. 1427–1438.
- [141] Liang, Y., Sarkany, N., and Cui, Y., 2009, "Biomass and Lipid Productivities of *Chlorella Vulgaris* under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth Conditions," *Biotechnology Letters*, **31**(7), pp. 1043–1049.
- [142] Bastidas, O., 2011, "Cell Counting with Neubauer Chamber Basic Hemocytometer Usage," *Celeromics*, pp. 1–6.
- [143] Gaspar, R., 2019, "Universidad Autónoma de Baja California," FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA.
- [144] Sánchez, J., and Martínez, Y., 2012, "Determinación de Biomasa," *Universidad Nacional de Trujillo*, pp. 1–13.
- [145] Salazar, L. E., 2012, "Evaluación de Métodos de Extracción de Aceite de Microalgas Para La Producción de Biodiesel," *Universidad de Piura*, p. 145.
- [146] Hadrich, B., Akremi, I., Dammak, M., Barkallah, M., Fendri, I., and Abdelkafi, S., 2018, "Optimization of Lipids' Ultrasonic Extraction and Production from *Chlorella Sp.* Using Response-Surface Methodology," *Lipids in Health and Disease*, **17**(1), pp. 1–9.
- [147] Bligh, E. G., and Dyer, W. J., 1959, "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification," *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**(8), pp. 911–917.
- [148] Kumar, R. R., Rao, P. H., and Arumugam, M., 2015, "Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review," *Frontiers in Energy Research*, **3**(JAN), pp. 1–9.
- [149] Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G., and Chemat, F., 2012, "'Solvent-Free' Ultrasound-Assisted Extraction of Lipids from Fresh Microalgae Cells: A Green, Clean and Scalable Process," *Bioresource Technology*, **114**, pp. 457–465.
- [150] Sánchez-Bayo, A., López, D., Morales, V., Espada, J. J., Puyol, D., Martínez, F., Astals, S., Vicente, G., Bautista, L. F., and Rodríguez, R., 2020, "Biodiesel and Biogas Production from *Isochrysis Galbana* Using Dry and Wet Lipid Extraction: A Biorefinery Approach," *Renewable Energy*, **146**, pp. 188–195.
- [151] Zhu, J., Chen, W., Chen, H., Zhang, X., He, C., Rong, J., and Wang, Q., 2016, "Improved Productivity of Neutral Lipids in *Chlorella Sp. A2* by Minimal Nitrogen Supply," *Frontiers in Microbiology*, **7**(APR), pp. 1–11.
- [152] Medrano-Barboza, J., Herrera-Rengifo, K., Aguirre-Bravo, A., Ramírez-Iglesias, J. R., Rodríguez, R., and Morales, V., 2022, "Pig Slaughterhouse Wastewater: Medium Culture for Microalgae Biomass Generation as Raw Material in Biofuel Industries," *Water*, **14**(19), p. 3016.
- [153] "Toumi 2022 Obtaining DHA-EPA Oil from Biomass of *Chlorella Sorokiana*.Pdf."
- [154] "Abedini 2014 Experimental Study and Thermodynamic Modeling for Purification of Algal Lipids.Pdf."
- [155] "ANALYTICAL METHODS USED IN THE PRODUCTION AND FUEL QUALITY ASSESSMENT OF BIODIESEL."
- [156] Adhiputra, R., Utami, M., Suyono, E. A., Budiman, A., Hariani, P. L., Pratiwi, A. S., and Wijaya, K., 2021, "Simultaneous Extraction and In-Situ Transesterification of *Chlorella Vulgaris* Using Microwave-Assisted Method for Biodiesel Production," *Korean. J. Mater. Res.*, **31**(4), pp. 181–187.
- [157] Makareviciene, P. D. V., Andrulevičiūtė, V., Skorupskaitė, V., and Kasperovičienė, J., 2011, "Cultivation of Microalgae *Chlorella Sp.* and *Scenedesmus Sp.* as a Potential Biofuel Feedstock," *Environmental Research, Engineering and Management*, **57**(3), pp. 21–27.
- [158] Hasan, R., 2014, "Bioremediation of Swine Wastewater and Biofuel Potential by Using *Chlorella Vulgaris*, *Chlamydomonas Reinhardtii*, and *Chlamydomonas Debaryana*," *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, **05**(03), pp. 3–7.



## Bibliografía

---

- [159] Canedo-López, Y., Ruiz-Marín, A., and Zavala-Loría, J. D. C., 2016, "A Two-Stage Culture Process Using *Chlorella Vulgaris* for Urban Wastewater Nutrient Removal and Enhanced Algal Lipid Accumulation under Photoautotrophic and Mixotrophic Conditions," *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, **8**(3), p. 033102.
- [160] Cao, L., Zhou, T., Li, Z., Wang, J., Tang, J., Ruan, R., and Liu, Y., 2018, "Effect of Combining Adsorption-Stripping Treatment with Acidification on the Growth of *Chlorella Vulgaris* and Nutrient Removal from Swine Wastewater," *Bioresource Technology*, **263**, pp. 10–16.
- [161] Cai, T., Park, S. Y., and Li, Y., 2013, "Nutrient Recovery from Wastewater Streams by Microalgae: Status and Prospects," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **19**, pp. 360–369.
- [162] Montañó, D. M. S., 2022, "A Non-Sterile Heterotrophic Microalgal Process for Dual Biomass Production and Carbon Removal from Swine Wastewater," *Renewable Energy*, p. 12.
- [163] Kumar, P., Patel, A. K., Singhanian, R. R., Chen, C.-W., Bhatia, S. K., and Dong, C.-D., 2024, "Development of a Novel Fe@urea Nanocomposite for Effective Harvesting of High Lutein-Producing Microalgae Biomass," *Chemical Engineering Journal*, **480**, p. 148117.
- [164] Fidalgo, P., 1995, "Variabilidad Bioquímica de Microalgas Marinas En Cultivo En Función de La Fuente de Nitrógeno," *Growth (Lakeland)*, pp. 1–20.
- [165] Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., and Muylaert, K., 2012, "Bioresource Technology Flocculation of *Chlorella Vulgaris* Induced by High pH : Role of Magnesium and Calcium and Practical Implications," *Bioresource Technology*, **105**, pp. 114–119.
- [166] Khani, M. H., and Khamseh, A. Gh., 2023, "Statistical Analysis, Equilibrium and Dynamic Study on the Biosorption of Strontium Ions on *Chlorella Vulgaris*," *J Radioanal Nucl Chem*, **332**(8), pp. 3325–3334.
- [167] Rajalakshmi, A. M., Silambarasan, T., and Dhandapani, R., 2021, "Small Scale Photo Bioreactor Treatment of Tannery Wastewater, Heavy Metal Biosorption and CO<sub>2</sub> Sequestration Using Microalga *Chlorella Sp.*: A Biodegradation Approach," *Appl Water Sci*, **11**(7), p. 108.
- [168] Yousefi, Y., Hanachi, P., Samadi, M., and Khoshnamvand, M., 2023, "Heavy Metals (Copper and Iron) and Nutrients (Nitrate and Phosphate) Removal from Aqueous Medium by Microalgae *Chlorella Vulgaris* and *Scenedesmus Obliquus*, and Their Biofilms," *Marine Environmental Research*, **188**, p. 105989.
- [169] Tambat, V. S., Tseng, Y., Kumar, P., Chen, C.-W., Singhanian, R. R., Chang, J.-S., Dong, C.-D., and Patel, A. K., 2023, "Effective and Sustainable Bioremediation of Molybdenum Pollutants from Wastewaters by Potential Microalgae," *Environmental Technology & Innovation*, **30**, p. 103091.
- [170] "Bezerra 2022 Strategy for Carbohydrate-Starch Production Enhancement *Chlorella*.Pdf."
- [171] Silva, D. A., Cardoso, L. G., De Jesus Silva, J. S., De Souza, C. O., Lemos, P. V. F., De Almeida, P. F., Ferreira, E. D. S., Lombardi, A. T., and Druzian, J. I., 2022, "Strategy for the Cultivation of *Chlorella Vulgaris* with High Biomass Production and Biofuel Potential in Wastewater from the Oil Industry," *Environmental Technology & Innovation*, **25**, p. 102204.
- [172] Katircioğlu Sinmaz, G., Erden, B., and Şengil, İ. A., 2023, "Cultivation of *Chlorella Vulgaris* in Alkaline Condition for Biodiesel Feedstock after Biological Treatment of Poultry Slaughterhouse Wastewater," *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **20**(3), pp. 3237–3246.
- [173] Sacristán De Alva, M., Luna-Pabello, V. M., Cadena, E., and Ortíz, E., 2013, "Green Microalga *Scenedesmus Acutus* Grown on Municipal Wastewater to Couple Nutrient Removal with Lipid Accumulation for Biodiesel Production," *Bioresource Technology*, **146**, pp. 744–748.
- [174] Lan Chi, N. T., Thu Hương, Đ. T., Đạo, P., and Lapcik, V., 2023, "Multi-Pollutants (Organic and Inorganic) Removal Potential of *Scenedesmus* Species on Municipal Sewage Water

## Bibliografía

---

- and Analyzed Their Phycoremediation Mechanisms,” *Environmental Research*, **232**, p. 116301.
- [175] Pham, T. L., 2019, “Removal and Bioaccumulation of Copper by the Freshwater Green Alga *Scenedesmus Sp.*,” *VJSTE*, **61**(2), pp. 65–70.
- [176] “Pradham 2019 Biosorption for Removal of Hexavalent Chromium Using Microalgae *Scenedesmus Sp.* Htm.”
- [177] “Kafil 2022 Utilization of the Microalga *Scenedesmus Quadricauda* for Cr(VI).Htm.”
- [178] Oliveira, A. P. D. S., Assemany, P., Covell, L., Tavares, G. P., and Calijuri, M. L., 2023, “Microalgae-Based Wastewater Treatment for Micropollutant Removal in Swine Effluent: High-Rate Algal Ponds Performance under Different Zinc Concentrations,” *Algal Research*, **69**, p. 102930.
- [179] Farooq, W., Lee, Y.-C., Ryu, B.-G., Kim, B.-H., Kim, H.-S., Choi, Y.-E., and Yang, J.-W., 2013, “Two-Stage Cultivation of Two *Chlorella Sp.* Strains by Simultaneous Treatment of Brewery Wastewater and Maximizing Lipid Productivity,” *Bioresource Technology*, **132**, pp. 230–238.
- [180] Yirgu, Z., Leta, S., Hussen, A., and Khan, M. M., 2020, “Nutrient Removal and Carbohydrate Production Potential of Indigenous *Scenedesmus Sp.* Grown in Anaerobically Digested Brewery Wastewater,” *Environmental Systems Research*, **9**(1).
- [181] Ye, S., Gao, L., Zhao, J., An, M., Wu, H., and Li, M., 2020, “Simultaneous Wastewater Treatment and Lipid Production by *Scenedesmus Sp. HXY2*,” *Bioresource Technology*, **302**(November 2019), p. 122903.
- [182] Zhou, W., Min, M., Li, Y., Hu, B., Ma, X., Cheng, Y., Liu, Y., Chen, P., and Ruan, R., 2012, “A Hetero-Photoautotrophic Two-Stage Cultivation Process to Improve Wastewater Nutrient Removal and Enhance Algal Lipid Accumulation,” *Bioresource Technology*, **110**, pp. 448–455.
- [183] Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., and Brányik, T., 2014, “Effect of Nutrient Supply Status on Biomass Composition of Eukaryotic Green Microalgae,” *Journal of Applied Phycology*, **26**(3), pp. 1359–1377.
- [184] Song, C., Hu, X., Liu, Z., Li, S., and Kitamura, Y., 2020, “Combination of Brewery Wastewater Purification and CO<sub>2</sub> Fixation with Potential Value-Added Ingredients Production via Different Microalgae Strains Cultivation,” *Journal of Cleaner Production*, **268**, p. 122332.
- [185] Lois-Milevicich, J., Casá, N., Alvarez, P., Mateucci, R., Busto, V., and De Escalada Pla, M., 2020, “*Chlorella Vulgaris* Biomass Production Using Brewery Wastewater with High Chemical Oxygen Demand,” *J Appl Phycol*, **32**(5), pp. 2773–2783.
- [186] Ación, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. M., Fernández-Sevilla, J. M., and Molina-Grima, E., 2016, “Wastewater Treatment Using Microalgae: How Realistic a Contribution Might It Be to Significant Urban Wastewater Treatment?,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**(21), pp. 9013–9022.
- [187] Wang, M., Gui, H., Chen, J., Li, C., Wang, C., Chen, C., Zhao, C., and Li, Y., 2022, “Experimental Study on Removal of Iron, Manganese and Copper from Water by Microalgae,” *Polish Journal of Environmental Studies*, **31**(2), pp. 1847–1855.
- [188] Wang, J., Zhou, W., Chen, H., Zhan, J., He, C., and Wang, Q., 2019, “Ammonium Nitrogen Tolerant *Chlorella* Strain Screening and Its Damaging Effects on Photosynthesis,” *Frontiers in Microbiology*, **10**(JAN), pp. 1–13.
- [189] Mubashar, M., Naveed, M., Mustafa, A., Ashraf, S., Baig, K. S., Alamri, S., Siddiqui, M. H., Zabochnicka-Świątek, M., Szota, M., and Kalaji, H. M., 2020, “Experimental Investigation of *Chlorella Vulgaris* and *Enterobacter Sp. Mn17* for Decolorization and Removal of Heavy Metals from Textile Wastewater,” *Water (Switzerland)*, **12**(11).
- [190] Hee, C. W., Shing, W. L., and 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**(April), pp. 252–255.

## Bibliografía

---

- [191] Suthar, S., and Verma, R., 2018, "Production of *Chlorella Vulgaris* under Varying Nutrient and Abiotic Conditions: A Potential Microalga for Bioenergy Feedstock," *Process Safety and Environmental Protection*, **113**, pp. 141–148.
- [192] Khatoon, H., Banerjee, S., Syakir Syahiran, M., Mat Noordin, N. Bt., Munafi Ambok Bolong, A., and Endut, A., 2016, "Re-Use of Aquaculture Wastewater in Cultivating Microalgae as Live Feed for Aquaculture Organisms," *Desalination and Water Treatment*, **57**(60), pp. 29295–29302.
- [193] Sharma, J., Kumar, S. S., Bishnoi, N. R., and Pugazhendhi, A., 2018, "Enhancement of Lipid Production from Algal Biomass through Various Growth Parameters," *Journal of Molecular Liquids*, **269**, pp. 712–720.
- [194] Lai, J., Yu, Z., Song, X., Cao, X., and Han, X., 2011, "Responses of the Growth and Biochemical Composition of *Prorocentrum Donghaiense* to Different Nitrogen and Phosphorus Concentrations," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **405**(1–2), pp. 6–17.
- [195] Singh, R., Birru, R., and Sibi, G., 2017, "Nutrient Removal Efficiencies of *Chlorella Vulgaris* from Urban Wastewater for Reduced Eutrophication," pp. 1–11.
- [196] Eixler, S., Karsten, U., and Selig, U., 2006, "Phosphorus Storage in *Chlorella Vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) Cells and Its Dependence on Phosphate Supply," *Phycologia*, **45**(1), pp. 53–60.
- [197] Kwon, G., Nam, J. H., Kim, D. M., Song, C., and Jahng, D., 2020, "Growth and Nutrient Removal of *Chlorella Vulgaris* in Ammonia-Reduced Raw and Anaerobically-Digested Piggery Wastewaters," *Environmental Engineering Research*, **25**(2), pp. 135–146.
- [198] "Andrade 2009 Biomass Production of Microalga *Scenedesmus* Sp..Pdf."
- [199] "Richmond - Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and .Pdf."
- [200] Veuthey, M. J., "Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria – Mariana Jiménez Veuthey," p. 40.
- [201] Al-Rub, F. A. A., El-Naas, M. H., Ashour, I., and Al-Marzouqi, M., 2006, "Biosorption of Copper on *Chlorella Vulgaris* from Single , Binary and Ternary Metal Aqueous Solutions," **41**, pp. 457–464.
- [202] Liu, Z. Y., Wang, G. C., and Zhou, B. C., 2008, "Effect of Iron on Growth and Lipid Accumulation in *Chlorella Vulgaris*," *Bioresource Technology*, **99**(11), pp. 4717–4722.
- [203] Vega, J. M., Herrera, J., Aparicio, P. J., Paneque, A., and Losada, M., 1971, " Role of Molybdenum in Nitrate Reduction by *Chlorella* ," *Plant Physiology*, **48**(3), pp. 294–299.
- [204] Choi, H. J., and Lee, S. M., 2013, "Performance of *Chlorella Vulgaris* for the Removal of Ammonia-Nitrogen from Wastewater," *Environmental Engineering Research*, **18**(4), pp. 235–239.
- [205] Akhtar, N., Iqbal, J., and Iqbal, M., 2004, "Removal and Recovery of Nickel(II) from Aqueous Solution by Loofa Sponge-Immobilized Biomass of *Chlorella Sorokiniana*: Characterization Studies," *Journal of Hazardous Materials*, **108**(1–2), pp. 85–94.
- [206] Universidade da Coruña. España, Abalde Alonso, J. E., Cid Blanco, A., Universidade da Coruña. España, Fidalgo Paredes, J. P., Universidade da Coruña. España, Torres Vaamonde, J. E., Universidade da Coruña. España, Herrero López, C., and Universidade da Coruña. España, 1995, *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*, Universidade da Coruña. Servizo de Publicacións.
- [207] Yan, H., and Pan, G., 2002, "Toxicity and Bioaccumulation of Copper in Three Green Microalgal Species," *Chemosphere*, **49**(5), pp. 471–476.
- [208] "Sengar 2011 APPLICATION OF PHYCOREMEDIATION TECHNOLOGY IN THE TREATMENT OF Sewage Water.Pdf."
- [209] Ajayan, K. V., Selvaraju, M., Unnikannan, P., and Sruthi, P., 2015, "Phycoremediation of Tannery Wastewater Using Microalgae *Scenedesmus* Species," *International Journal of Phytoremediation*, **17**(10), pp. 907–916.

## Bibliografía

---

- [210] “Apandi 2022 Scenedesmus Sp. Harvesting by Using Natural Coagulant after Phycoremediation of Heavy Metals.Pdf.”
- [211] “Fathi 2002 Toxicological Response of the Green alga Scenedesmus Bijuga to Mercury and Lead.Pdf.”
- [212] Vitola Romero, D., Pérez Cardozo, A., and Montes, D., 2021, “Utilización de microalgas como alternativa para la remoción de metales pesados,” *rev.investig.agrar.ambient.*, **13**(1), pp. 195–203.
- [213] “Guerrero 2014 Cultivation of Monoraphidium Sp., Chlorella Sp. and Scenedesmus Sp. Algae.Pdf.”
- [214] Tripathi, R., Gupta, A., and Thakur, I. S., 2019, “An Integrated Approach for Phycoremediation of Wastewater and Sustainable Biodiesel Production by Green Microalgae, Scenedesmus Sp. ISTGA1,” *Renewable Energy*, **135**, pp. 617–625.
- [215] Udayan, A., Pandey, A. K., Sirohi, R., Sreekumar, N., Sang, B.-I., Sim, S. J., Kim, S. H., and Pandey, A., 2022, “Production of Microalgae with High Lipid Content and Their Potential as Sources of Nutraceuticals,” *Phytochem Rev.*
- [216] López-Pacheco, I. Y., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Silva-Núñez, A., Arévalo-Gallegos, A., Barceló, D., Afewerki, S., Iqbal, H. M. N., and Parra-Saldívar, R., 2019, “Combination of Nejayote and Swine Wastewater as a Medium for Arthrospira Maxima and Chlorella Vulgaris Production and Wastewater Treatment,” *Science of the Total Environment*, **676**, pp. 356–367.
- [217] González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., García-Encina, P. A., and Muñoz, R., 2008, “Microalgae-Based Processes for the Biodegradation of Pretreated Piggery Wastewaters,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, **80**(5), pp. 891–898.
- [218] Xie, D., Ji, X., Zhou, Y., Dai, J., He, Y., Sun, H., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, X., and Chen, B., 2022, “Chlorella Vulgaris Cultivation in Pilot-Scale to Treat Real Swine Wastewater and Mitigate Carbon Dioxide for Sustainable Biodiesel Production by Direct Enzymatic Transesterification,” *Bioresource Technology*, **349**, p. 126886.
- [219] Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Chang, S. W., Nguyen, D. D., and Kumar, S. M., 2019, “Microalgae Biomass from Swine Wastewater and Its Conversion to Bioenergy,” *Bioresource Technology*, **275**, pp. 109–122.
- [220] Kim, M. K., Park, J. W., Park, C. S., Kim, S. J., Jeune, K. H., Chang, M. U., and Acreman, J., 2007, “Enhanced Production of Scenedesmus Spp. (Green Microalgae) Using a New Medium Containing Fermented Swine Wastewater,” *Bioresource Technology*, **98**(11), pp. 2220–2228.
- [221] Jia, Q., Xiang, W., Yang, F., Hu, Q., Tang, M., Chen, C., Wang, G., Dai, S., Wu, H., and Wu, H., 2016, “Low-Cost Cultivation of Scenedesmus Sp. with Filtered Anaerobically Digested Piggery Wastewater: Biofuel Production and Pollutant Remediation,” *Journal of Applied Phycology*, **28**(2), pp. 727–736.
- [222] Pandey, A., Srivastava, S., and Kumar, S., 2023, “Carbon Dioxide Fixation and Lipid Storage of Scenedesmus Sp. ASK22: A Sustainable Approach for Biofuel Production and Waste Remediation,” *Journal of Environmental Management*, **332**, p. 117350.
- [223] Faruque, M. O., Hossain, M. M., and Razzak, S. A., 2023, “Photoautotrophic Cultivation, Lipid Enhancement, and Dry Biomass Characterization of Microalgae Scenedesmus Dimorphus for Bioenergy Application,” *Arab J Sci Eng.*
- [224] Kumar, P., Patel, A. K., Chen, C.-W., Nguyen, T.-B., Chang, J.-S., Pandey, A., Dong, C.-D., and Singhanian, R. R., 2023, “Development of Dopamine-Based Magnetite Nanocomposite for Effective Harvesting of Chlorella Sorokiniana Kh12 Biomass,” *Environmental Technology & Innovation*, **29**, p. 103008.
- [225] Gómez-Luna, L., Ortega-Díaz, Y., and Tormos-Cedeño, L., “Efecto del pH sobre el crecimiento y viabilidad celular de una cepa local de Chlorella vulgaris Beijerinck.”

## Bibliografía

---

- [226] Darpito, C., Shin, W.-S., Jeon, S., Lee, H., Nam, K., Kwon, J.-H., and Yang, J.-W., 2015, "Cultivation of *Chlorella Protothecoides* in Anaerobically Treated Brewery Wastewater for Cost-Effective Biodiesel Production," *Bioprocess Biosyst Eng*, **38**(3), pp. 523–530.
- [227] Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., and Ruan, R., 2010, "Cultivation of Green Algae *Chlorella* Sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant," *Appl Biochem Biotechnol*, **162**(4), pp. 1174–1186.
- [228] Asadi, P., Rad, H. A., and Qaderi, F., 2019, "Comparison of *Chlorella Vulgaris* and *Chlorella Sorokiniana* Pa.91 in Post Treatment of Dairy Wastewater Treatment Plant Effluents," *Environ Sci Pollut Res*, **26**(28), pp. 29473–29489.
- [229] Onay, M., Sonmez, C., Oktem, H. A., and Yucel, M., 2016, "Evaluation of Various Extraction Techniques for Efficient Lipid Recovery from Thermo-Resistant Microalgae, *Hindakia*, *Scenedesmus* and *Micractinium* Species—Comparison of Lipid Extraction Me," *American Journal of Analytical Chemistry*, **07**(02), pp. 141–150.
- [230] Hasan, H. A., Muhamad, M. H., Ji, B., Nazairi, N. A., Jiat, K. W., Sim, S. I. S. W. A., and Poh, A. F. M. S., 2023, "Revolutionizing Wastewater Treatment with Microalgae: Unveiling Resource Recovery, Mechanisms, Challenges, and Future Possibilities," *Ecological Engineering*, **197**, p. 107117.
- [231] Moondra, N., Jariwala, N. D., and Christian, R. A., 2020, "Sustainable Treatment of Domestic Wastewater through Microalgae," *International Journal of Phytoremediation*, **22**(14), pp. 1480–1486.
- [232] Marchão, L., Da Silva, T. L., Gouveia, L., and Reis, A., 2018, "Microalgae-Mediated Brewery Wastewater Treatment: Effect of Dilution Rate on Nutrient Removal Rates, Biomass Biochemical Composition, and Cell Physiology," *J Appl Phycol*, **30**(3), pp. 1583–1595.
- [233] de Oliveira, C. Y. B., Abreu, J. L. E., de Oliveira, C. D. L., Lima, P. C., Gálvez, A. O., and de Macedo Dantas, D. M., 2020, "Growth of *Chlorella Vulgaris* Using Wastewater from Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Farming in a Low-Salinity Biofloc System," *Acta Scientiarum - Technology*, **42**(1), pp. 1–9.
- [234] Lam, M. K., and Lee, K. T., 2012, "Potential of Using Organic Fertilizer to Cultivate *Chlorella Vulgaris* for Biodiesel Production," *Applied Energy*, **94**, pp. 303–308.
- [235] Ramos, R., and Pizarro, R., 2018, "Growth and Bioremediation Capacity of *Chlorella Vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) Cultivated in Wastewater Generated in the Fish Farming of the Yellowtail Amberjack *Seriola Lalandi* (Perciformes: Carangidae)," *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **53**(1), pp. 75–86.
- [236] Eladel, H., Abomohra, A. E. F., Battah, M., Mohammed, S., Radwan, A., and Abdelrahim, H., 2019, "Evaluation of *Chlorella Sorokiniana* Isolated from Local Municipal Wastewater for Dual Application in Nutrient Removal and Biodiesel Production," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **42**(3), pp. 425–433.
- [237] Usha, S. Z., Rahman, M. R., Sarker, J., and ..., 2021, "Cultivation of *Chlorella Vulgaris* in Aquaculture Wastewater as Alternative Nutrient Source and Better Treatment Process," ... *Journal of Veterinary ...*, (July), pp. 42–51.
- [238] Frumento, D., Casazza, A. A., Al Arni, S., and Converti, A., 2013, "Cultivation of *Chlorella Vulgaris* in Tubular Photobioreactors: A Lipid Source for Biodiesel Production," *Biochemical Engineering Journal*, **81**, pp. 120–125.
- [239] Chioccioli, M., Hankamer, B., and Ross, I. L., 2014, "Flow Cytometry Pulse Width Data Enables Rapid and Sensitive Estimation of Biomass Dry Weight in the Microalgae *Chlamydomonas Reinhardtii* and *Chlorella Vulgaris*," *PLoS ONE*, **9**(5), pp. 1–12.
- [240] Chatla, D., Padmavathi, P., and Gatreddi, S., 2020, "Wastewater Treatment Techniques for Sustainable Aquaculture," Springer.
- [241] Illman, A. M., Scragg, A. H., and Shales, S. W., 2000, "Increase in *Chlorella* Strains Calorific Values When Grown in Low Nitrogen Medium," *Enzyme and Microbial Technology*, **27**(8), pp. 631–635.

## Bibliografía

---

- [242] Nayak, M., Jena, J., Bhakta, S., Rath, S. S., Sarika, C., Rao, B. V. S. K., Pradhan, N., Thirunavoukkarasu, M., Mishra, S. K., Panda, P. K., Prasad, R. B. N., Sukla, L. B., and Mishra, B. K., 2011, "Screening of Fresh Water Microalgae from Eastern Region of India for Sustainable Biodiesel Production," *International Journal of Green Energy*, **8**(6), pp. 669–683.
- [243] Anyanwu, R. C., Rodriguez, C., Durrant, A., and 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), p. 6108.
- [244] Baldiris-Navarro, I., Aponte, J. H. S., and Virviescas, M. T., "Validation, Characterization and Comparison of Microalgae *Chlorella Vulgaris* and *Chlamydomona Reinhardtii* Growth Kinetics."
- [245] "Quevedo 2008 *Scenedesmus* Sp GROWTH IN DIFFERENT CULTURE Mediums.Pdf."
- [246] Dourou, M., Tsolcha, O. N., Tekerlekopoulou, A. G., Bokas, D., and Aggelis, G., 2018, "Fish Farm Effluents Are Suitable Growth Media for *Nannochloropsis Gaditana*, a Polyunsaturated Fatty Acid Producing Microalga," *Eng. Life Sci.*, **18**(11), pp. 851–860.
- [247] Andreotti, V., Solimeno, A., Chindris, A., Marazzi, F., and García, J., 2019, "Growth of *Tetraselmis Suecica* and *Dunaliella Tertiolecta* in Aquaculture Wastewater: Numerical Simulation with the BIO\_ALGAE Model," *Water Air Soil Pollut*, **230**(3), p. 60.
- [248] Cardoso, L. G., Duarte, J. H., Costa, J. A. V., De Jesus Assis, D., Lemos, P. V. F., Druzian, J. I., De Souza, C. O., Nunes, I. L., and Chinalia, F. A., 2021, "Spirulina Sp. as a Bioremediation Agent for Aquaculture Wastewater: Production of High Added Value Compounds and Estimation of Theoretical Biodiesel," *Bioenerg. Res.*, **14**(1), pp. 254–264.
- [249] Maroneze, M. M., Siqueira, S. F., Vendruscolo, R. G., Wagner, R., De Menezes, C. R., Zepka, L. Q., and Jacob-Lopes, E., 2016, "The Role of Photoperiods on Photobioreactors – A Potential Strategy to Reduce Costs," *Bioresource Technology*, **219**, pp. 493–499.
- [250] Prieto-Guevara, M., Alarcón-Furnieles, J., Jiménez-Velásquez, C., Hernández-Julio, Y., Espinosa-Araujo, J., and Atencio-García, V., 2023, "Cryopreservation of the Microalgae *Scenedesmus* Sp.," *Cells*, **12**(4), p. 562.
- [251] Gour, R. S., Garlapati, V. K., and Kant, A., 2020, "Effect of Salinity Stress on Lipid Accumulation in *Scenedesmus* Sp. and *Chlorella* Sp.: Feasibility of Stepwise Culturing," *Curr Microbiol*, **77**(5), pp. 779–785.
- [252] "Alam 2013 Characterization of the Flocculating Agent from *Chlorella Vulgaris*.Htm."
- [253] Hena, S., Bhatelia, T., Patel, H., Anderson, D., Bonadeo, B., and Shah, M., 2023, "Biofixation of Carbon Dioxide Using *Chlorella Vulgaris*," *Ind. Eng. Chem. Res.*, p. acs.iecr.3c00525.
- [254] Kumar P, S., 2017, "Cultivation and Chemical Composition of Microalgae *Chlorella Vulgaris* and Its Antibacterial Activity against Human Pathogens," *JAMB*, **5**(3).
- [255] Choi, W. Y., Kang, D. H., Lee, S. Y., and Lee, H. Y., 2015, "High Quality Biodiesel from Marine Microalga, *Scenedesmus* Sp. through *in Situ* Acid Transesterification," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **90**(7), pp. 1245–1252.
- [256] "Tesis\_Gonzalo-22 01 2014.Pdf."
- [257] Rawat, I., Bholra, V., Kumar, R. R., and Bux, F., 2013, "Improving the Feasibility of Producing Biofuels from Microalgae Using Wastewater," *Environmental Technology (United Kingdom)*, **34**(13–14), pp. 1765–1775.
- [258] Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., and Bux, F., 2013, "Biodiesel from Microalgae: A Critical Evaluation from Laboratory to Large Scale Production," *Applied Energy*, **103**, pp. 444–467.
- [259] "Smith 2014 Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications.Pdf."
- [260] Qin, L., Shu, Q., Wang, Z., Shang, C., Zhu, S., Xu, J., Li, R., Zhu, L., and Yuan, Z., 2014, "Cultivation of *Chlorella Vulgaris* in Dairy Wastewater Pretreated by UV Irradiation and Sodium Hypochlorite," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **172**(2), pp. 1121–1130.

## Bibliografía

---

- [261] Sacristán de Alva, M., Luna-Pabello, V. M., Cadena, E., and Ortíz, E., 2013, "Green Microalga *Scenedesmus Acutus* Grown on Municipal Wastewater to Couple Nutrient Removal with Lipid Accumulation for Biodiesel Production," *Bioresource Technology*, **146**, pp. 744–748.
- [262] Cao, L., Zhou, T., Li, Z., Wang, J., Tang, J., Ruan, R., and Liu, Y., 2018, "Effect of Combining Adsorption-Stripping Treatment with Acidification on the Growth of *Chlorella Vulgaris* and Nutrient Removal from Swine Wastewater," *Bioresource Technology*, **263**, pp. 10–16.
- [263] Angles, E., Jaouen, P., Pruvost, J., and Marchal, L., 2017, "Wet Lipid Extraction from the Microalga *Nannochloropsis Sp.*: Disruption, Physiological Effects and Solvent Screening," *Algal Research*, **21**, pp. 27–34.
- [264] Valchev, G. S., Djondjorov, P. A., Vassilev, V. M., and Dantchev, D. M., 2017, "Van Der Waals Interactions between Planar Substrate and Tubular Lipid Membranes Undergoing Pearling Instability," *AIP Conference Proceedings*, **1895**(October).
- [265] "Abomohra 2015 Enhancement of Lipid Extraction for Improved Biodiesel Recovery from *Scenedesmus Obliquus*.Pdf."
- [266] "Ghasemi 2016 Progress on Lipid Extraction from Wet Algal Biomass Forbiodiesel Production.Pdf."
- [267] Feng, Y., Li, C., and Zhang, D., 2011, "Lipid Production of *Chlorella Vulgaris* Cultured in Artificial Wastewater Medium," *Bioresource Technology*, **102**(1), pp. 101–105.
- [268] Pérez, M., Quishpi, J., Pauta, G., León, F., Cisneros, J., Pinos, V., and Alvarado, A., 2018, "Comparación de Las Eficiencias de Recuperación de Lípidos de Las Microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* Obtenidas Con Diferentes Disolventes," *Maskana*, **9**(2), pp. 27–34.
- [269] Muhammad, G., Xu, J., Li, Z., Zhao, L., and Zhang, X., 2024, "Current Progress and Future Perspective of Microalgae Biomass Pretreatment Using Deep Eutectic Solvents," *Science of The Total Environment*, **924**, p. 171547.
- [270] "Ryckebosch 2012 Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae.Pdf."
- [271] Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., and Oh, H.-M., 2010, "Comparison of Several Methods for Effective Lipid Extraction from Microalgae," *Bioresource Technology*, **101**(1), pp. S75–S77.
- [272] Yusoff, M. F. M., Xu, X., and Guo, Z., 2014, "Comparison of Fatty Acid Methyl and Ethyl Esters as Biodiesel Base Stock: A Review on Processing and Production Requirements," *J Americ Oil Chem Soc*, **91**(4), pp. 525–531.
- [273] Du, Y., Schuur, B., Kersten, S. R. A., and Brilman, D. W. F., 2015, "Opportunities for Switchable Solvents for Lipid Extraction from Wet Algal Biomass: An Energy Evaluation," *Algal Research*, **11**, pp. 271–283.
- [274] Wils, L., Hilali, S., and Boudesocque-Delaye, L., 2021, "Biomass Valorization Using Natural Deep Eutectic Solvents: What's New in France?," *Molecules*, **26**(21), p. 6556.
- [275] Salazar, L., 2012, "Evaluación de Métodos de Extracción de Aceite de Microalgas Para La Producción de Biodiesel," *Universidad de Piura*, p. 145.
- [276] Urribarrí, A., Zabala, A., Sánchez, J., Arenas, E., Chandler, C., Rincón, M., González, E., and Mazzarri, C. A., 2014, "Evaluación Del Potencial de La Borra de Café Como Materia Prima Para La Producción de Biodiesel Evaluation of the Potential for Used Coffee Grounds as Raw Material for Biodiesel Production," *Multiciencias*, **14**(2), pp. 129–139.
- [277] Dong, T., Wang, J., Miao, C., Zheng, Y., and Chen, S., 2013, "Two-Step in Situ Biodiesel Production from Microalgae with High Free Fatty Acid Content," *Bioresource Technology*, **136**, pp. 8–15.
- [278] Andrulėviciute, V., Makareviciene, V., Skorupskaite, V., and Gumbyte, M., 2014, "Biomass and Oil Content of *Chlorella Sp.*, *Haematococcus Sp.*, *Nannochloris Sp.* and *Scenedesmus Sp.* under Mixotrophic Growth Conditions in the Presence of Technical Glycerol," *J Appl Phycol*, **26**(1), pp. 83–90.

## Bibliografía

---

- [279] Bermudez-Sierra, J. J., 2018, "Lipid extraction of the microalga *Scenedesmus* sp. with different mixture of organic solvents," **16**(2).
- [280] Custódio, L., Soares, F., Pereira, H., Barreira, L., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M. J., Rauter, A. P., Alberício, F., and Varela, J., 2014, "Fatty Acid Composition and Biological Activities of *Isochrysis Galbana* T-ISO, *Tetraselmis* Sp. and *Scenedesmus* Sp.: Possible Application in the Pharmaceutical and Functional Food Industries," *Journal of Applied Phycology*, **26**(1), pp. 151–161.
- [281] Zhang, Y., Kong, X., Wang, Z., Sun, Y., Zhu, S., Li, L., and Lv, P., 2018, "Optimization of Enzymatic Hydrolysis for Effective Lipid Extraction from Microalgae *Scenedesmus* Sp.," *Renewable Energy*, **125**, pp. 1049–1057.
- [282] Abou-Shanab, R. A. I., Ji, M. K., Kim, H. C., Paeng, K. J., and Jeon, B. H., 2013, "Microalgal Species Growing on Piggery Wastewater as a Valuable Candidate for Nutrient Removal and Biodiesel Production," *Journal of Environmental Management*, **115**, pp. 257–264.
- [283] Sánchez-Bayo, A., López-Chicharro, D., Morales, V., Espada, J. J., Puyol, D., Martínez, F., Astals, S., Vicente, G., Bautista, L. F., and Rodríguez, R., 2020, "Biodiesel and Biogas Production from *Isochrysis Galbana* Using Dry and Wet Lipid Extraction: A Biorefinery Approach," *Renewable Energy*, **146**, pp. 188–195.
- [284] Mukherjee, C., Suryawanshi, P. G., Kalita, M. C., Deka, D., Aranda, D. A. G., and Goud, V. V., 2022, "Polarity-Wise Successive Solvent Extraction of *Scenedesmus Obliquus* Biomass and Characterization of the Crude Extracts for Broad-Spectrum Antibacterial Activity," *Biomass Conv. Bioref.*
- [285] Pandit, Pr., and Fulekar, M., 2019, "Biodiesel Production from *Scenedesmus Armatus* using Egg Shell Waste as Nanocatalyst," *Materials Today: Proceedings*, **10**, pp. 75–86.
- [286] "NTE INEN 2482: Biodiesel. Requisitos."
- [287] Eldiehy, K. S. H., Daimary, N., Borah, D., Mandal, M., and Deka, D., 2023, "Biodiesel Production from *Chlorella Homosphaera* by Two-Step Catalytic Conversion Using Waste Radish Leaves as a Source for Heterogeneous Catalyst," *Appl Biochem Biotechnol*, **195**(7), pp. 4347–4367.
- [288] Sharma, A. K., Sahoo, P. K., Singhal, S., and Joshi, G., 2016, "Exploration of Upstream and Downstream Process for Microwave Assisted Sustainable Biodiesel Production from Microalgae *Chlorella Vulgaris*," *Bioresource Technology*, **216**, pp. 793–800.
- [289] Bagul, S. Y., K. Bharti, R., and Dhar, D. W., 2017, "Assessing Biodiesel Quality Parameters for Wastewater Grown *Chlorella* Sp.," *Water Science and Technology*, **76**(3), pp. 719–727.
- [290] Dixit, R., Singh, S., Enamala, M. K., and Patel, A., 2022, "Effect of Various Growth Medium on the Physiology and De Novo Lipogenesis of a Freshwater Microalga *Scenedesmus Rotundus*-MG910488 under Autotrophic Condition," *Clean Technol.*, **4**(3), pp. 733–751.
- [291] Das, V., Dunford, N., and Deka, D., 2022, "Waste Utilization and Biodiesel Production from *Desmodesmus Maximus* Grown in Swine Wastewater Using Waste Eggshells as a Catalyst," *Aquacultural Engineering*, **99**, p. 102293.
- [292] Vyas, A. P., Verma, J. L., and Subrahmanyam, N., 2010, "A Review on FAME Production Processes," *Fuel*, **89**(1), pp. 1–9.
- [293] Mathimani, T., Uma, L., and Prabakaran, D., 2015, "Homogeneous Acid Catalysed Transesterification of Marine Microalga *Chlorella* Sp. BDUG 91771 Lipid - An Efficient Biodiesel Yield and Its Characterization," *Renewable Energy*, **81**, pp. 523–533.
- [294] Chu, F.-F., Chu, P.-N., Cai, P.-J., Li, W.-W., Lam, P. K. S., and Zeng, R. J., 2013, "Phosphorus Plays an Important Role in Enhancing Biodiesel Productivity of *Chlorella Vulgaris* under Nitrogen Deficiency," *Bioresource Technology*, **134**, pp. 341–346.
- [295] Unpaprom, Y., Tipnee, S., and Rameshprabu, R., 2015, "Biodiesel from Green Alga *Scenedesmus Acuminatus*," *International Journal of Sustainable and Green Energy*, **4**(1), pp. 1–6.



## Bibliografía

---

- [296] Wen, Y., He, Y., Ji, X., Li, S., Chen, L., Zhou, Y., Wang, M., and Chen, B., 2017, "Isolation of an Indigenous *Chlorella Vulgaris* from Swine Wastewater and Characterization of Its Nutrient Removal Ability in Undiluted Sewage," *Bioresource Technology*, **243**(June 2017), pp. 247–253.
- [297] Hamidian, N., and Zamani, H., 2022, "Potential of *Chlorella Sorokiniana* Cultivated in Dairy Wastewater for Bioenergy and Biodiesel Production," *Bioenerg. Res.*, **15**(1), pp. 334–345.
- [298] Thangam, K. R., Santhiya, A., Sri, S. R. A., MubarakAli, D., Karthikumar, S., Kumar, R. S., Thajuddin, N., Soosai, M. R., Varalakshmi, P., Moorthy, I. G., and Pugazhendhi, A., 2021, "Bio-Refinery Approaches Based Concomitant Microalgal Biofuel Production and Wastewater Treatment," *Science of The Total Environment*, **785**, p. 147267.
- [299] Liu, J., Wu, Y., Wu, C., Muylaert, K., Vyverman, W., Yu, H.-Q., Muñoz, R., and Rittmann, B., 2017, "Advanced Nutrient Removal from Surface Water by a Consortium of Attached Microalgae and Bacteria: A Review," *Bioresource Technology*, **241**, pp. 1127–1137.
- [300] Vu, H. P., Nguyen, L. N., Zdarta, J., Nga, T. T. V., and Nghiem, L. D., 2020, "Blue-Green Algae in Surface Water: Problems and Opportunities," *Curr Pollution Rep*, **6**(2), pp. 105–122.
- [301] Bisht, B., Verma, M., Sharma, R., Chauhan, P. K., Pant, K., Kim, H., Vlaskin, M. S., and Kumar, V., 2023, "Development of Yeast and Microalgae Consortium Biofilm Growth System for Biofuel Production," *Heliyon*, **9**(9), p. e19353.
- [302] Chang, Y.-L., Nagarajan, D., Chen, J.-H., Yen Chen, C., Wu, Y.-J., Whang, L.-M., Lee, D.-J., and Chang, J.-S., 2023, "Microalgae-Bacteria Consortia for the Treatment of Raw Dairy Manure Wastewater Using a Novel Two-Stage Process: Process Optimization and Bacterial Community Analysis," *Chemical Engineering Journal*, **473**, p. 145388.
- [303] Bedane, D. T., and Asfaw, S. L., 2023, "Microalgae and Co-Culture for Polishing Pollutants of Anaerobically Treated Agro-Processing Industry Wastewater: The Case of Slaughterhouse," *Bioresour. Bioprocess.*, **10**(1), p. 81.
- [304] Li, X., Liu, J., Tian, J., Pan, Z., Chen, Y., Ming, F., Wang, R., Wang, L., Zhou, H., Li, J., and Tan, Z., 2023, "Co-Cultivation of Microalgae-Activated Sludge for Municipal Wastewater Treatment: Exploring the Performance, Microbial Co-Occurrence Patterns, Microbiota Dynamics and Function during the Startup Stage," *Bioresource Technology*, **374**, p. 128733.
- [305] Li, Z., Yu, E., Zhang, K., Gong, W., Xia, Y., Tian, J., Wang, G., and Xie, J., 2020, "Water Treatment Effect, Microbial Community Structure, and Metabolic Characteristics in a Field-Scale Aquaculture Wastewater Treatment System," *Frontiers in Microbiology*, **11**(June), pp. 1–13.
- [306] Sahu, S., Kaur, A., Singh, G., and Kumar Arya, S., 2023, "Harnessing the Potential of Microalgae-Bacteria Interaction for Eco-Friendly Wastewater Treatment: A Review on New Strategies Involving Machine Learning and Artificial Intelligence," *Journal of Environmental Management*, **346**, p. 119004.
- [307] Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B., Rai, J., Sharma, P., Lade, H., and Paul, D., 2015, "Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes," *Sustainability*, **7**(2), pp. 2189–2212.
- [308] Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M. E., Vega, M., and Bolado, S., 2018, "Comparative Uptake Study of Arsenic, Boron, Copper, Manganese and Zinc from Water by Different Green Microalgae," *Bioresource Technology*, **263**, pp. 49–57.
- [309] Subramaniam, V., Subashchandrabose, S. R., Thavamani, P., Chen, Z., Krishnamurti, G. S. R., Naidu, R., and Megharaj, M., 2016, "Toxicity and Bioaccumulation of Iron in Soil Microalgae," *J Appl Phycol*, **28**(5), pp. 2767–2776.
- [310] Ajiboye, T. O., Oyewo, O. A., and Onwudiwe, D. C., 2021, "Simultaneous Removal of Organics and Heavy Metals from Industrial Wastewater: A Review," *Chemosphere*, **262**, p. 128379.

## Bibliografía

---

- [311] Abdelfattah, A., Ali, S. S., Ramadan, H., El-Aswar, E. I., Eltawab, R., Ho, S.-H., Elsamahy, T., Li, S., El-Sheekh, M. M., Schagerl, M., Kornaros, M., and Sun, J., 2023, "Microalgae-Based Wastewater Treatment: Mechanisms, Challenges, Recent Advances, and Future Prospects," *Environmental Science and Ecotechnology*, **13**, p. 100205.
- [312] "Yang 2021 Insight into Cr(VI) Biosorption onto Algal-Bacterial Granular Sludge Cr(VI) Heavy Metal Consortium.Htm."
- [313] "Leong 2020 Bioremediation of Heavy Metals Using Microalgae.Htm."
- [314] Jia, Q., Xiang, W., Yang, F., Hu, Q., Tang, M., Chen, C., Wang, G., Dai, S., Wu, H., and Wu, H., 2016, "Low-Cost Cultivation of *Scenedesmus* Sp. with Filtered Anaerobically Digested Piggery Wastewater: Biofuel Production and Pollutant Remediation," *Journal of Applied Phycology*, **28**(2), pp. 727–736.
- [315] Zhao, G., Wang, X., Hong, Y., Liu, X., Wang, Q., Zhai, Q., and Zhang, H., 2022, "Attached Cultivation of Microalgae on Rational Carriers for Swine Wastewater Treatment and Biomass Harvesting," *Bioresource Technology*, **351**, p. 127014.
- [316] Abinandan, S., Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., and Megharaj, M., 2018, "Microalgae–Bacteria Biofilms: A Sustainable Synergistic Approach in Remediation of Acid Mine Drainage," *Appl Microbiol Biotechnol*, **102**(3), pp. 1131–1144.
- [317] "Perales 2023 Process for Nutrient Recycling from Intensive Aquaculture through Microalgae Bacteria Consortium.Htm."
- [318] Ansari, A. A., Abouhend, A. S., and Park, C., 2019, "Effects of Seeding Density on Photogranulation and the Start-up of the Oxygenic Photogranule Process for Aeration-Free Wastewater Treatment," *Algal Research*, **40**, p. 101495.
- [319] Lee, Y.-J., and Lei, Z., 2022, "Wastewater Treatment Using Microalgal-Bacterial Aggregate Process at Zero-Aeration Scenario: Most Recent Research Focuses and Perspectives," *Bioresource Technology Reports*, **17**, p. 100943.
- [320] Qin, L., Wang, Z., Sun, Y., Shu, Q., Feng, P., Zhu, L., Xu, J., and Yuan, Z., 2016, "Microalgae Consortia Cultivation in Dairy Wastewater to Improve the Potential of Nutrient Removal and Biodiesel Feedstock Production," *Environ Sci Pollut Res*, **23**(9), pp. 8379–8387.
- [321] Kleinert, C., and Griehl, C., 2021, "Identification of Suitable *Botryococcus Braunii* Strains for Non-Destructive in Situ Hydrocarbon Extraction," *J Appl Phycol*, **33**(2), pp. 785–798.
- [322] Ryu, B.-G., Kim, J., Han, J.-I., and Yang, J.-W., 2017, "Feasibility of Using a Microalgal-Bacterial Consortium for Treatment of Toxic Coke Wastewater with Concomitant Production of Microbial Lipids," *Bioresource Technology*, **225**, pp. 58–66.

# **ANEXOS**



## 7. Anexos

**Anexo 1.** Métodos y unidades 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 <sub>3</sub>	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).

## Anexos

**Anexo 2.** Tabla de límites de descarga al sistema de alcantarillado público expuesto en el Acuerdo Ministerial N° 097-A de Calidad Ambiental del Ministerio de Ambiente, de fecha Noviembre de 2015 que reforma al Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio de Ambiente (TULSMA).

**TABLA 8. LÍMITES DE DESCARGA AL SISTEMA DE ALCANTARILLADO PÚBLICO**

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aceites y grasas	Sust. solubles en hexano	mg/l	70,0
Explosivos o inflamables	Sustancias	mg/l	Cero
Alkil mercurio		mg/l	<b>No detectable</b>
Aluminio	Al	mg/l	5,0
Arsénico total	As	mg/l	0,1
Cadmio	Cd	mg/l	0,02
Cianuro total	CN <sup>-</sup>	mg/l	1,0
Cinc	Zn	mg/l	10,0
Cloro Activo	Cl	mg/l	0,5
Cloroformo	Extracto carbón cloroformo	mg/l	0,1
Cobalto total	Co	mg/l	0,5
Cobre	Cu	mg/l	1,0
Compuestos fenólicos	Expresado como fenol	mg/l	0,2
Compuestos organoclorados	Organoclorados totales	mg/l	0,05
Cromo Hexavalente	Cr <sup>+6</sup>	mg/l	0,5
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DBO <sub>5</sub>	mg/l	250,0
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/l	500,0
Dicloroetileno	Dicloroetileno	mg/l	1,0
Fósforo Total	P	mg/l	15,0
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg/l	20,0
Hierro total	Fe	mg/l	25,0
Manganeso total	Mn	mg/l	10,0
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,01
Níquel	Ni	mg/l	2,0
Nitrógeno Total Kjeldahl	N	mg/l	60,0
Organofosforados	Especies Totales	mg/l	0,1
Plata	Ag	mg/l	0,5
Plomo	Pb	mg/l	0,5
Potencial de hidrógeno	pH		6-9
Selenio	Se	mg/l	0,5
Sólidos Sedimentables	SD	ml/l	20,0
Sólidos Suspendidos Totales	SST	mg/l	220,0
Sólidos totales	ST	mg/l	1 600,0
Sulfatos	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	mg/l	400,0
Sulfuros	S	mg/l	1,0
Temperatura	°C		< 40,0
Tensoactivos	Sustancias Activas al azul de metileno	mg/l	2,0
Tetracloruro de carbono	Tetracloruro de carbono	mg/l	1,0
Tricloroetileno	Tricloroetileno	mg/l	1,0

