



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE MICROALGAS CULTIVADAS  
EN AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS UTILIZANDO 2 TIPOS DE  
FOTOBIOREACTORES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Magister en  
Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento**

Presentado por María Magdalena Aray Andrade

Guayaquil - Ecuador

2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por su amor infinito que me permitió concluir una meta más en mi vida, por sus bendiciones diarias que me fortalecen para continuar en mi desarrollo profesional.

A mi hermana gemela María Mercedes por su amor y apoyo incondicional, que son un estímulo para seguir creciendo.

A mis padres Francisco y Josefa por su amor y guía, que nos formaron íntegramente para ser personas de bien.

A mi tutor Dr. Rafael por su confianza y motivación constante que me enseñaron a no detenerme sino a encontrar alternativas para avanzar y lograr lo que me proponga.

A mis compañeros y amigos Mariuxi, Ivan, Viviana, Zuner, Joseph y Steffany por su ayuda en la realización de este proyecto.

## **DEDICATORIA**

A los amantes de la investigación, que dedican su tiempo a explorar la biodiversidad de nuestro país, este trabajo constituye un granito de arena al esfuerzo por descubrir compuestos de potencial interés en nuestros recursos naturales

## **TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

Dr. Ramón Espinel, Ph.D  
DECANO

Dra. Patricia Manzano, Ph.D.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 1

Dr. rer nat. J. Rafael Bermúdez Monsalve, Ph.D  
DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

Dr. César Moreira Valenzuela, Ph.D  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 2

Dra. Jenny Ruales Najera, Ph.D  
CODIRECTORA DE PROYECTO DE TITULACIÓN

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral

María Magdalena Aray Andrade

## GLOSARIO

**Aclimatar:** Hacer que se acostumbre un ser vivo a climas y condiciones diferentes de los que le eran habituales.

**Aislamiento:** Técnica para separar microorganismos a partir de muestras naturales se realiza en medios sólidos o líquidos.

**Árbol filogenético:** Es un árbol que muestra las relaciones evolutivas entre varias especies u otras entidades que tienen una ascendencia común.

**Biomasa:** Materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen

**Cámara de Neubauer:** Placa de cristal de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. La porción central, que es donde se realiza el conteo, está dividida en 3 partes. En la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular que mide 3 mm x 3 mm de lado. Subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno. El cuadrado central se divide en 25 cuadrados medianos de 0,2 mm de lado y cada uno de estos cuadros se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños. El cuadrado central está formado por 400 cuadrados pequeños.

**Capacidad antioxidante:** Es la capacidad que poseen ciertas moléculas para retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

**Combustión:** Reacción química entre el oxígeno y un material oxidable, acompañada de desprendimiento de energía y que habitualmente se manifiesta por incandescencia o llama.

**Compuestos de estrés:** Son compuestos que se generan bajo condiciones de estrés como mecanismo de defensa celular, entre ellos, los carotenoides que protegen químicamente a la célula de los daños ocasionados por estrés oxidativo.

**Cultivo axénicos:** Son aquellos que contienen un solo especie de microalga, se logran al adicionar antibióticos al medio de cultivo para eliminar microorganismos susceptibles la sustancia adicionada.

**Diluciones seriadas:** Se realizan cuando la concentración del microorganismo es alta, se procede a la preparación de diluciones en una secuencia de 1:10, alcanzándose diluciones de  $10^{-7}$  o mayores.

**Eutrofización:** Incremento de sustancias nutritivas en aguas dulces de lagos y embalses, que provoca un exceso de fitoplancton.

**Fitopigmento:** Es una materia colorante que se caracteriza por dar un tono específico (verde, amarillo, rojo, etc.), insoluble en agua. Se denominan así por encontrarse en la mayoría de vegetales. El efecto de un color específico ocurre porque el pigmento tiene la propiedad de absorber todos los colores de la luz menos uno, el cual refleja hacia el observador.

**FOB:** Fórmula de pago o clave utilizada en el comercio internacional para indicar que el precio de venta de un determinado artículo incluye el valor de la mercancía y los gastos de transporte y maniobra necesarios hasta ponerla a bordo del barco que ha de transportarla al país de destino, pero excluye el seguro y el flete.

**Fotobiorreactor:** Sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo para el cultivo de microorganismos, especialmente microalgas.

**Fotoperiodo:** Duración o tiempo relativo de los periodos de la luz y oscuridad diarios a que están sometidos los organismos.

**Incinerar:** Acción y efecto de incinerar. Incinerar es reducir algo hasta cenizas.

**Metabolitos secundarios:** Son compuestos de bajo peso molecular que se sintetizan en pequeñas cantidades en los organismos, no participan en los procesos primarios del metabolismo, más bien, intervienen en múltiples procesos como adaptación al ambiente, establecimiento de simbiosis con otros organismos, mecanismos de defensa, etc.

**Pases:** En microbiología un pase consiste en transferir una pequeña cantidad de cultivo a un volumen mayor de medio fresco, para prolongar el tiempo de cultivo, evitando la senescencia asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular.

**Polifenoles:** Grupo de pigmentos con poder antioxidante que tienen más de un grupo fenol en cada molécula.

**Regiones parciales de 18S rRNA:** Es un polirribonucleótido codificado por el gen rrs. Procede de las subunidades pequeñas de los ribosomas (acrónimo ARNr SSU) que se encuentra altamente conservado, presenta regiones comunes a todos los organismos y una o más secuencias específicas cortas que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético, y raramente están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos.

**Trolox:** Es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol, de alta solubilidad en agua. Usado universalmente como estándar en diversos ensayos de actividad antioxidante.

## ÍNDICE GENERAL

Glosario .....	vi
Índice general .....	viii
Índice de tablas.....	x
Índice de imágenes .....	xi
Índice de gráficos .....	xii
Abreviaturas.....	xiii
Resumen .....	1
Capítulo 1: Introducción y Objetivos.....	2
1.1 Antecedentes y Justificación.....	2
1.2 Objetivo General.....	4
1.3 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Marco Referencial.....	4
1.4.1 Microalgas. Características .....	4
1.4.2 Clasificación de microalgas .....	5
1.4.3 Microalgas de agua dulce .....	5
1.4.4 Cultivo de microalgas.....	7
1.4.5 Sistemas de cultivo.....	8
1.4.6 Cultivo en agua residual .....	9
1.4.7 Características bioquímicas .....	9
Capítulo 2: Metodología .....	10
2.1 Recolección, aislamiento e identificación de cepas de microalgas .....	10
2.2 Aclimatación de cepas de microalgas en cultivo de aguas residuales .....	12
2.3 Cultivo en fotobiorreactores .....	12
2.4 Recolección de biomasa algal .....	13
2.5 Análisis bioquímicos.....	13
2.5.1 Tratamiento previo a los análisis.....	13
2.5.2 Humedad y cenizas .....	13
2.5.3 Lípidos totales.....	13
2.5.4 Proteínas totales .....	13
2.5.5 Carbohidratos totales .....	14
2.5.6 Fitopigmentos .....	14
2.5.7 Polifenoles y capacidad antioxidante .....	14
2.6 Aplicaciones potenciales de compuestos algales .....	14
2.7 Análisis estadístico .....	15
Capítulo 3: Resultados y Discusión .....	16
3.1 Aislamiento e identificación de cepas de microalgas .....	16
3.2 Aclimatación de cepas de microalgas en cultivo de aguas residuales .....	17
3.3 Cultivo en fotobiorreactores .....	18
3.4 Análisis bioquímicos.....	19
3.5 Aplicaciones potenciales de compuestos algales.....	26



Conclusiones y Recomendaciones.....	27
Bibliografía .....	28
Anexos.....	36
Anexo A: Parámetros evaluados en las cepas cultivadas en agua residual doméstica pretratada .....	2

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de algas más importantes en términos de abundancia.....	5
Tabla 2. Requerimientos generales para el cultivo de microalgas.....	8

## ÍNDICE DE IMÁGENES

	<i>Página</i>
Imagen 1. Esquema de trabajo.....	11
Imagen 2. Microalgas aisladas e identificadas.....	16
Imagen 3. Cultivo de Microalgas en fotobiorreactores.....	18

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<i>Página</i>
Gráfico 1. Tasas de crecimiento cepas aisladas .....	17
Gráfico 2. Tasas de crecimiento cepas cultivadas en fotobiorreactores...	19
Gráfico 3. Humedad y Cenizas .....	20
Gráfico 4. Lípidos, Proteínas y Carbohidratos.....	22
Gráfico 5. Polifenoles totales y Capacidad antioxidante .....	24
Gráfico 6. Fitopigmentos .....	25

## ABREVIATURAS

<b><u>ABTS</u></b>	2,2 '- azino - bis (3 - etilbenzotiazolina - 6 – ácido sulfónico)
<b><u>ANOVA</u></b>	Análisis de varianza
<b><u>BS</u></b>	Biomasa seca
<b><u>DPPH</u></b>	$\alpha$ , $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazil
<b><u>FOB</u></b>	Por sus siglas en inglés, Free On Board que significa Libre a bordo.
<b><u>GAE</u></b>	Equivalente de ácido Gálico

## Resumen

Las microalgas constituyen una fuente importante de múltiples compuestos de potencial interés, como son macronutrientes, vitaminas, carotenos, luteínas, ficobilinas, xantinas, etc. Usan radiación solar como fuente de energía, dióxido de carbono como fuente de carbono y pueden emplear agua residual como fuente de nutrientes.

El Ecuador tiene las condiciones ambientales adecuadas para el cultivo de microalgas durante todo el año, sin embargo, los pocos cultivos existentes sólo están enfocados en la obtención de biodiesel y producción de suplemento alimenticio a partir de la microalga *Spirulina*, sin explotar las demás aplicaciones de los compuestos algales. El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil bioquímico de microalgas de agua dulce cultivadas en aguas residuales domésticas pre-tratadas, para la obtención de bioproductos de interés comercial. Se aislaron 9 cepas de microalgas de aguas estancadas provenientes de zanjas de agua lluvia de los alrededores de los mercados de Guayaquil. Las cepas aisladas e identificadas fueron cultivadas en condiciones de laboratorio: en agua residual doméstica pre-tratada a 30 y 40°C e iluminación con fotoperíodo 12:12. Se seleccionaron 3 cepas con mayor crecimiento en ambas temperaturas: *Chorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6 y *Scenedesmus* sp. R3, las cuales se cultivaron en condiciones naturales puertas afuera en dos tipos de fotobiorreactores: cilindro y panel. Al inicio de la fase estacionaria se recolectó la biomasa por medio de filtración al vacío y centrifugación. La biomasa recolectada se secó a  $55^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. En esta biomasa seca se realizó el análisis proximal y detección de fitopigmentos. La biomasa obtenida por centrifugación fue liofilizada y se cuantificaron los polifenoles totales y su capacidad antioxidante. *Chorella* sp. M2 presentó la mayor tasa de crecimiento ( $0,57 \pm 0,001\text{d}^{-1}$ ), el más alto contenido de humedad ( $7,30 \pm 0,39\%$  BS), lípidos totales ( $23,53 \pm 4,58\%$  BS), carbohidratos ( $29,86 \pm 2,78\%$  BS) y polifenoles totales ( $5,98 \pm 0,29\text{ mg GAE/g DB}$ ). *Chlorella* sp. M6 mostró el más alto contenido de cenizas ( $11,64 \pm 0,83\%$  BS) y capacidad antioxidante ( $18,21 \pm 2,23\ \mu\text{mol Trolox/g BS}$ ), en tanto que *Scenedesmus* sp. R3 presentó el mayor porcentaje de proteínas ( $55,28 \pm 2,97\%$  BS). Existieron diferencias significativas entre cepas de microalgas y tipo de fotobiorreactor en lípidos, proteínas, carbohidratos y capacidad antioxidante. Los extractos metanólicos de las cepas de microalgas evaluadas presentaron absorbancia en las longitudes de onda de los fitopigmentos astaxantina, luteína, neoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\delta$ -caroteno. En el fotobiorreactor tipo panel se obtuvieron las absorbancias más altas de estos fitopigmentos. La microalga nativa *Chlorella* sp. M2, indistintamente del método de cultivo, es una fuente potencial de macronutrientes y polifenoles con posibles aplicaciones tanto en la industria alimenticia, como en la farmacéutica y cosmética, siendo el fotobiorreactor tipo panel más efectivo para cultivo de microalgas para la obtención de fitopigmentos.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Las microalgas constituyen una fuente importante de múltiples compuestos de potencial interés. Empleando energía solar producen de manera eficiente macronutrientes (carbohidratos, proteínas y lípidos), los cuales pueden ser utilizados como materia prima para elaboración de alimentos para animales. Varios estudios demuestran que las microalgas generan también metabolitos especiales como vitaminas (1), carotenos, luteínas, ficobilinas, xantinas, etc., en respuesta a los cambios en su hábitat, los mismos que tienen potencial uso en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética, agrícola y energética (2–4). Un ejemplo de ello constituyen algunas algas productoras de astaxantina que posee aplicaciones antiinflamatorias y antioxidantes y que además generan lípidos poli-insaturados omega 3 con aplicaciones para el cuidado de la piel y en la nutrición humana (5,6). Por otro lado, a partir de microalgas se pueden obtener compuestos con aplicaciones nano médicas, como nano partículas de plata con actividad antibacteriana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas como potencial alternativa en el tratamiento contra las bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos (7). Finalmente en el ámbito energético, éstas también representan una potencial fuente, al generar biocombustible a partir de su fracción lipídica (8,9).

En este contexto, los compuestos algales poseen valor comercial intermedio o alto; así, en el período 2010-2012 los tres principales países exportadores mundiales de productos a base de algas fueron China, Indonesia y Corea del Sur, con más de 125 millones de dólares invertidos por año cada uno (10).

En la actualidad, una alternativa interesante para el cultivo de microalgas con potencial valor productivo es la de utilizar aguas residuales domésticas (1,2,4), ya que las microalgas producen biomasa a partir de nutrientes presentes en estas aguas tales como el nitrógeno (N) y fósforo (P), reduciendo la concentración de estos elementos, lo que permite disminuir la eutrofización de los ecosistemas donde se descargan estas aguas(11). Las aguas residuales previo al cultivo de microalgas, son sedimentadas y posteriormente filtradas utilizando filtros de microfibra de vidrio para eliminar partículas grandes y bacterias (12).

El Ecuador tiene recursos naturales diversos y las condiciones ambientales adecuadas para el cultivo de microalgas durante todo el año. Sin embargo, nuestro

país importa materia prima para su industria (entre enero y noviembre del 2015, estas importaciones correspondieron a 382.6 millones USDFOB que representan 33,5% del total de importaciones nacionales (13)), y los pocos cultivos de microalgas existentes están únicamente enfocados en la obtención de biodiesel (14) y en la producción de suplemento alimenticio a partir de la microalga *Spirulina*. (15). Esto puede deberse a que no se han caracterizados bioquímicamente las microalgas presentes a nivel nacional, lo que ha reducido su potencial cultivo y uso. Adicionalmente, otro problema detectado es el inadecuado o nulo tratamiento de las aguas residuales en el Ecuador, sólo un 6,3% de aguas residuales domésticas son tratadas (16) con la consecuente contaminación de ecosistemas circundantes que pone en riesgo la seguridad alimentaria y la salud humana (17). El uso de aguas residuales como medio de cultivo algal es una alternativa factible para el tratamiento parcial de dichas aguas debido al autofinanciamiento del proceso, lo que garantiza así su implementación y continuidad en municipios o comunidades.

Es importante mencionar que los cultivos a mediana y gran escala a nivel mundial se realizan puertas afuera en fotobiorreactores, los cuales son afectados por las condiciones climáticas, como es el caso de la temperatura, de ahí la importancia de seleccionar las cepas de microalgas que se adapten al clima de nuestra costa ecuatoriana, que en el año 2015 obtuvo una temperatura máxima absoluta de 37,5°C (18), por esta razón, previamente las microalgas se cultivan en laboratorio en un rango de temperatura que cubra estos máximos, para determinar las cepas con mayor adaptabilidad y asegurar alta productividad en los cultivos puertas afuera.

En este trabajo se determinó el perfil bioquímico de microalgas de agua dulce de la costa ecuatoriana cultivadas en aguas residuales domésticas para la obtención de bioproductos de interés comercial que puedan suplir las materias primas que actualmente se importan en el País. Al mismo tiempo que, de manera efectiva, se realiza el tratamiento de las aguas residuales.



## **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el perfil bioquímico de microalgas de agua dulce cultivadas en aguas residuales domésticas pre-tratadas para la obtención de bioproductos de interés comercial

## **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el efecto en la tasa de crecimiento de 3 cepas de microalgas de agua dulce nativas al ser cultivadas en 2 tipos de fotobiorreactores utilizando aguas residuales domésticas pre-tratadas.
2. Determinar la presencia de compuestos bioquímicos algales con potencial interés.
3. Evaluar las diferencias significativas del perfil bioquímico entre las cepas de microalgas cultivadas en aguas residuales y tipos de fotobiorreactores

## **1.4 MARCO REFERENCIAL**

### **1.4.1 Microalgas. Características**

Las microalgas son microorganismos unicelulares, filamentosos o no, móviles flageladas o inmóviles, capaces de realizar fotosíntesis. Así, utilizan de manera eficiente la luz solar para producción de biocompuestos a partir de moléculas inorgánicas, especialmente nitrógeno y fosforo, que toman del medio en donde viven, consumen dióxido de carbono como fuente carbono (19), están ampliamente distribuidas en la naturaleza, pero en su mayoría viven en ambientes acuáticos, tanto en aguas saladas como aguas dulces, aunque también se encuentran en el suelo. Tienen diferentes formas, tamaño, composición química, metabolismo, y, en su mayoría poseen pared celular formada por polisacáridos (20).

Su reproducción se produce principalmente por división celular vegetativa (asexual), aunque la reproducción sexual puede ocurrir en muchas especies bajo condiciones de crecimiento apropiadas (21). Tienen un crecimiento de tipo exponencial (22), aumentando su biomasa rápidamente en los primeros días de cultivo para luego llegar a una fase estacionaria y finalmente descender.

### 1.4.2 Clasificación de las microalgas

Los biólogos han clasificado las microalgas en una variedad de clases, de acuerdo a su pigmentación, ciclo de vida y estructura celular. Los cuatro grupos más importantes de algas en términos de abundancia (23) están detallados en la tabla 1.

**Tabla 1** Grupos de algas más importantes en términos de abundancia (23).

Grupo de microalga	Especies conocidas	Hábitat
Diatomeas	100.000	Océanos, Aguas dulces y salobres
Algas verdes	8.000	Aguas dulces
Algas verde-azul	2.000	Hábitat diversos
Algas doradas	1.000	Aguas dulces

### 1.4.3 Microalgas de agua dulce

Las microalgas de agua dulce son globalmente ubicuas y muy diversas, constituyen miles de especies, con una gran variedad de formas y tamaños. Existe una enorme variedad de morfologías vegetativas de microalgas de agua dulce, entre ellas: unicelulares (motiles o no), formando colonias (de número variable de células o constantes a lo largo de su desarrollo llamado cenobio), pseudofilamentos (agregación de células de extremo a extremo pudiendo estar contenidas dentro de una matriz o envoltura gelatinosa común) y filamentos (cadena de células dispuestas de extremo a extremo, que comparten una pared transversal común).

Los grupos de microalgas de agua dulce se detallan a continuación:

**1.4.3.1 Cianobacterias:** Habitan la variedad más amplia de hábitats de agua dulce en la tierra y pueden llegar a ser importantes en las floraciones superficiales en las aguas estancadas ricas en nutrientes.

**1.4.3.2 Rhodophyta:** Presentan cloroplastos sin retículo endoplásmico externo y tilacoides no apilados, pigmentos ficobiliproteínicos y ausencia de flagelos en todas las etapas. Están restringidas en gran medida a arroyos

y ríos, pero también pueden ocurrir en otros hábitats del interior, como lagos, aguas termales.

1.4.3.3 Chlorophyta: Están muy extendidas en hábitats continentales dependiendo del grupo, por ejemplo: las clorofitas flageladas son más abundantes en aguas estancadas ricas en nutrientes, las unicelulares y colonias coccóides son comunes en el plancton de las aguas estancadas y los ríos que se mueven lentamente, la mayoría de las Chlorophyta filamentosas se unen a superficies duras o flotan en aguas estables o fluidas y los desmies son más comunes en estanques y arroyos que tienen baja conductancia y niveles moderados de nutrientes.

1.4.3.4 Euglenozoa: Son fotosintéticas tienen cloroplastos rodeados por tres membranas, poseen clorofila a y b. Son abundantes en el plancton de aguas estancadas ricas en nutrientes y materia orgánica, Algunas especies, como *Euglena mutabilis*, son especies pioneras en sitios contaminados por drenaje de minas con aguas muy ácidas (pH <3) y metales pesados elevados.

1.4.3.5 Ochrophyta: Comprende un grupo de algas que poseen cloroplastos con cuatro membranas circundantes, clorofila a y c. Puede formar esteras densas en arroyos con altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, también son comunes en suelos húmedos. En este filo se encuentran las diatomeas que viven en todos los hábitats de agua dulce, incluyendo las aguas estancadas y fluidas y los hábitats planctónicos y bentónicos. A menudo dominan tanto la biomasa como la diversidad biológica de la flora microscópica en muchos ecosistemas acuáticos.

1.4.3.6 Chrysophyceae: Se distinguen por los cloroplastos con cuatro membranas circundantes y que la fucoxantina típicamente enmascara la clorofila a y c. Están asociados con cuerpos permanentes de agua que tienen nutrientes bajos o moderados, baja alcalinidad y conductancia específica y un pH ligeramente ácido a neutro. La mayoría de los géneros tienden a ser planctónicos.

1.4.3.7 Haptophyta: Caracterizadas por cloroplastos con cuatro membranas circundantes, fucoxantina que enmascara la clorofila a y c y un apéndice único asociado con el aparato flagelar. Se encuentran en lagos y estanques.

1.4.3.8 Synurophyta: Poseen cloroplastos con cuatro membranas circundantes, fucoxantina que enmascara la clorofila a y c y las escalas silíceas. Son exclusivamente fitoplancton de agua dulce en lagos, estanques y ríos que fluyen lentamente (24).

#### 1.4.4 Cultivo de microalgas

Las microalgas son microorganismos cultivables con buenos rendimientos, debido a su alta tasa de crecimiento. Los factores a considerar para su cultivo son (25,26):

1.4.4.1 Nutrientes: Después del  $\text{CO}_2$ , las microalgas tienen mayor requerimiento de nitrógeno y fósforo, nutrientes esenciales por ser organismos autótrofos. Otros elementos como el sodio, hierro, cobre, zinc, molibdeno, cobalto, manganeso y vitaminas son también necesarios para el metabolismo algal (26).

1.4.4.2 Luz: Factor indispensable para el proceso de fotosíntesis, a mayor intensidad lumínica mayor tasa de crecimiento, sin embargo pasado el límite de saturación por luz, se produce fotoinhibición con su consecuente disminución de productividad (25). Es importante que exista una adecuada homogenización del cultivo para lograr uniformidad en la intensidad lumínica a todas las microalgas de un cultivo y evitar fotoinhibición en las células cercanas a la superficie y su falta en las que se encuentran en el interior, debido al auto-bloqueo de la luz, especialmente en cultivos con alta densidad celular (4).

1.4.4.3 Temperatura: Para cada especie de microalga existe una temperatura óptima donde alcanzan su mayor tasa de crecimiento, sin embargo algunas de ellas se pueden adaptar a cambios de temperaturas hasta ciertos rangos, por lo que, el control de la temperatura es indispensable, especialmente en los cultivos cerrados (25).

1.4.4.4 pH: Al igual que la temperatura, las microalgas tienen su rango de pH óptimo para su mayor productividad. El pH del cultivo depende de la composición del medio de cultivo, la actividad y respiración microbiana, la productividad algal y adición del  $\text{CO}_2$  (26).

1.4.4.5 Dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ): Las microalgas utilizan el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono, por lo que es un parámetro esencial en su cultivo, incrementándose el requerimiento del  $\text{CO}_2$  durante la fase exponencial de crecimiento algal, siendo necesario su suministro en cultivos con alta productividad (26).

Los requerimientos generales para el cultivo de microalgas se recopilan en la tabla 2:

**Tabla2:** Requerimientos generales para el cultivo de microalgas (27)

Parámetro	Rango
Temperatura (°C)	16-27
Salinidad (g.l <sup>-1</sup> )	0 – 40
Intensidad de luz (lux)	1.000 – 10.000 depende de la densidad celular
Fotoperiodo	16:8 - 24:0
pH	7-9

#### 1.4.5 Sistemas de cultivo

Para el cultivo de microalgas puertas afuera existen dos tipos generales de diseños: abiertos (estanques) o cerrados (fotobiorreactores) (28).

1.4.5.1.Sistemas abiertos: En este tipo de sistemas, las microalgas están expuestas a las condiciones ambientales. Los más utilizados para el cultivo comercial de microalgas son los conocidos como raceway, que son estanques ovalados de poca profundidad con canales y paletas para favorecer la recirculación del cultivo. En estos sistemas es difícil mantener cultivos axénicos, debido a que, puede haber contaminación causada por agentes externos (25).

1.4.5.2.Sistemas cerrados: Estos sistemas facilitan el control de los parámetros de cultivo y permiten realizar monocultivos y con alta densidad celular. Son llamados fotobiorreactores, debido a que en ellos se llevan a cabo reacciones químicas entre organismos vivos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos, utilizando la energía lumínica. Son transparentes de plástico o vidrio, de diversas formas, cilíndricas, planas, tubulares, espirales y serpentines; con agitación mediante burbujeo. En menor escala se utilizan los de bolsa plástica (26).

#### 1.4.6 Cultivo en agua residual

Para el tratamiento de aguas residuales domésticas existen varios procesos, entre ellos, el cultivo de microalgas, la cual es una alternativa rentable, debido a que estas remueven el nitrógeno y fósforo de las aguas residuales, utilizándolos para generar bio-compuestos como proteínas, lípidos, carbohidratos, fitopigmentos, entre otros. Estos compuestos tienen potenciales aplicaciones industriales y tecnológicas (1,2,4). Varios estudios han demostrado la efectividad de estos cultivos para la remoción de nitrógeno y fósforo de aguas servidas y al mismo tiempo la producción de compuestos como por ejemplo biocombustibles (1,8,11,29–31).

#### 1.4.7 Características bioquímicas

El contenido químico de las microalgas varía entre especies e inclusive entre individuos de una misma especie. Generalmente las proteínas constituyen la mayor proporción de su peso seco, contienen lípidos, sílice, glicoproteínas que forman parte de la estructura de las paredes celulares (32). Su composición química depende de la disponibilidad de nutrientes y de las condiciones ambientales en las que crecen; por ejemplo ante la deficiencia de nitrógeno y temperaturas elevadas, las microalgas aumentan la producción de lípidos, y bajo condiciones de estrés como variaciones de temperatura, intensidad lumínica, ciclos de luz/oscuridad, concentración de nutrientes, pH, especies reactivas de oxígeno, generan metabolitos especiales como carotenoides: astaxantina, luteína, neoxantina,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno (33–36).

Las microalgas poseen altos contenidos de macronutrientes en su biomasa seca, como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* que pueden alcanzar altos niveles de proteínas en el rango de 41 a 58 % y 50 a 58% y de lípidos 10 a 22% y 12 a 14%, respectivamente (37,38). Cuando se cultivan en aguas residuales también producen altas cantidades de macronutrientes, como *C. vulgaris* que presenta un contenido proteico del 38,56% y lípido del 42,53% (39). Al igual que *Chlorococcum* sp. y *Ankistrodesmus falcatus* con un contenido lipídico de 30,55% (40) y 36,54% (41) respectivamente. Además, varios estudios muestran que las microalgas tienen altos contenidos de compuestos fenólicos y actividad antioxidante (42–44) como *C. vulgaris* y *Chlorella pyrenoidosa* (45), inclusive en algunas especies cultivadas en aguas residuales industriales como *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp., *Dunaliella*, *esmodesmus* (46).

## CAPÍTULO 2

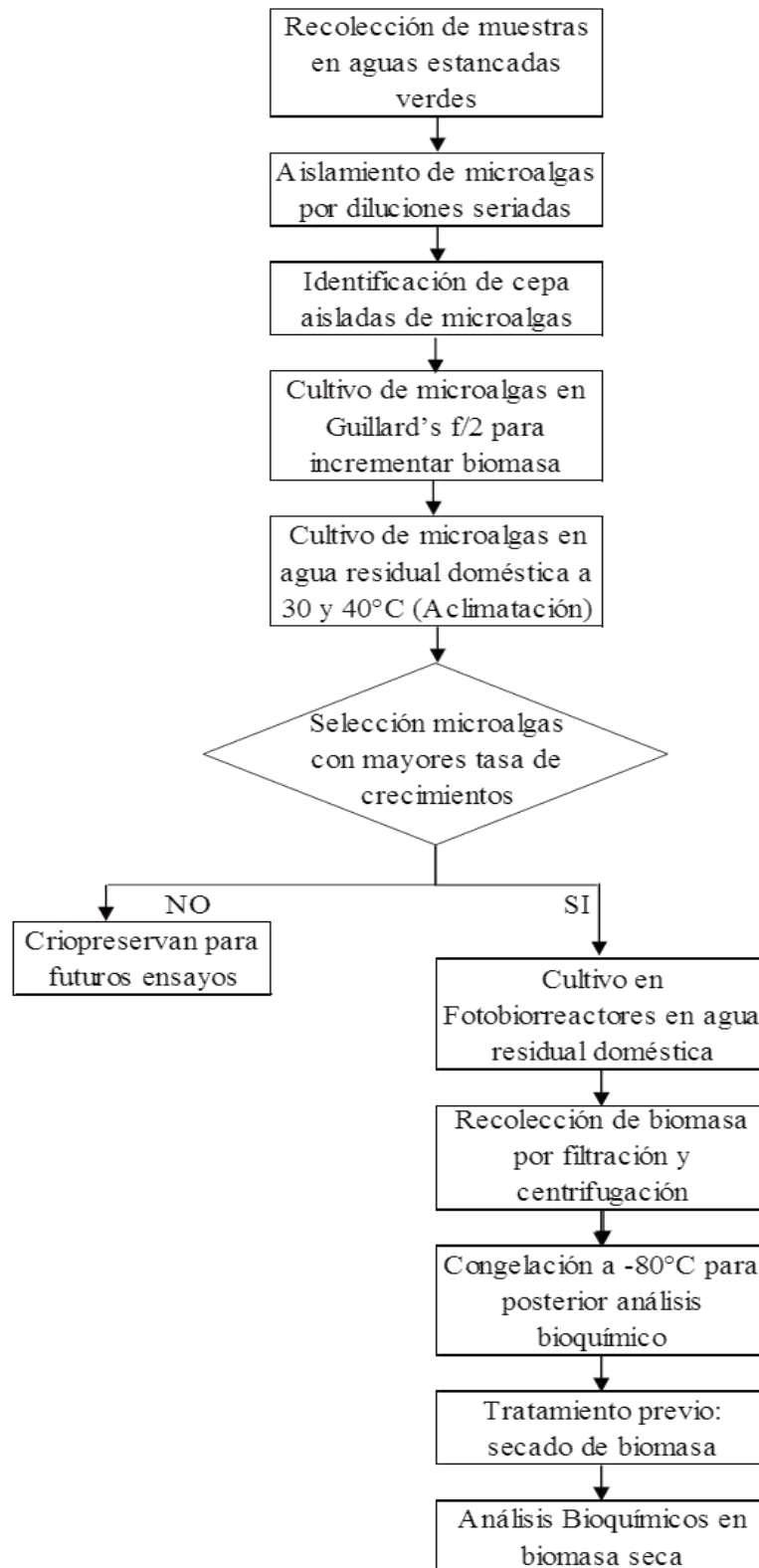
### METODOLOGÍA

Este trabajo es parte del proyecto de investigación ESPOL G1-DI-2015 “Propuesta de un diseño integral para la generación de productos algales con valor añadido a partir de aguas residuales domésticas”. El pre-tratamiento y evaluación del efecto de la actividad de microalgas sobre las aguas residuales domésticas fue realizado por investigadores asociados al mismo, que pertenecen a la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la ESPOL. En la imagen 1 se esquematiza el trabajo realizado.

#### 2.1 Recolección, aislamiento e identificación de cepas de microalgas

Las cepas de microalgas adaptadas a las condiciones de nuestro clima se obtuvieron de aguas de color verde estancadas provenientes de zanjas de agua lluvia en los alrededores de los mercados de la ciudad de Guayaquil (Mercado Central, cooperativa Martha de Roldós, ciudadela Las Acacias) y de la Laguna del Centro Cívico, la recolección se realizó en el mes de noviembre del 2015, que presentó temperaturas medias mínima y máxima de 24 y 32°C respectivamente y con precipitaciones acumuladas de 1,2 mm (47).

En total se tomaron 24 muestras de agua, de acuerdo a lo establecido en la Norma INEN 2176 (48) para muestras puntuales en aguas estancadas, sumergiendo el recipiente plástico estéril de boca ancha en el cuerpo de agua y retirándolo luego de haberse llenado. Las muestras fueron transportadas al laboratorio manteniéndolas a temperatura ambiente y protegidas de la luz, herméticamente selladas y rotuladas (49). Inmediatamente en el laboratorio procedimos a realizar diluciones seriadas 1:10 en tubos eppendorf de 1,5 mL de cada muestra recolectada, usando medio Guillard's f/2 (50) para aislar una sola cepa de microalga. En la obtención de cultivos axénicos se trataron con cloranfenicol a una concentración final de 50 mg L<sup>-1</sup> (51). Las cepas aisladas fueron identificadas por diferenciación morfológica de acuerdo a los métodos de Wehr & Sheath (52). Cada microalga se fotografió con una cámara digital (Canon, EOS 500D, Tokio, Japón), usando un aumento de 100 en un microscopio (Motic, B1-223 A, Kowloon Bay, Hong Kong) y utilizando el software MICAM 2.0 (53) para determinar el tamaño de las células. Una vez obtenido un cultivo monocelular en una de las diluciones seriadas, estas cepas se cultivaron en medio Guillard's f/2, en condiciones de laboratorio a 30°C e iluminación con fotoperíodo 12:12, para incrementar la biomasa de cada microalga.



**Imagen 1:** Esquema de trabajo realizado en el proyecto de tesis



## 2.2 Aclimatación de cepas de microalgas en cultivo de aguas residuales

De cada microalga cultivada en medio Guillard's f/2 (20mL) se realizaron pases a fiolas que contenían 200 mL de agua residual doméstica del cantón Marcelino Maridueña pre-tratada (sedimentada, filtrada y aireada (12)) para su aclimatación. Cultivadas bajo condiciones de laboratorio a dos temperaturas: 30 y 40°C de manera secuencial (rango que cubre la temperatura máxima absoluta de 37,5°C registrada en la costa en el 2015 (18)), e iluminación con fotoperíodo 12:12. Los cultivos se realizan por triplicado de cada cepa de microalga, bajo control de las temperaturas con termómetros de vidrio y la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) a partir de recuentos diarios al microscopio en cámara de Neubauer, utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / (t - t_0)$$

Dónde N representa la densidad celular (número de células) en el tiempo t (días),  $N_0$  densidad celular al inicio del cultivo y  $t_0$  el día de inicio del cultivo (54).

## 2.3 Cultivo en fotobiorreactores

De las microalgas aisladas y aclimatadas fueron seleccionadas 3 cepas que presentaron la mayor tasa de crecimiento en ambas temperaturas, cultivadas por triplicado en el agua residual doméstica pre-tratada en dos tipos de fotobiorreactores: panel y cilindro de manera simultánea y las diferentes cepas de manera secuencial.

Cada fotobiorreactor es de vidrio y dispone de 3 litros de capacidad. Los cilindros de 115 cm de altura y 7 cm de diámetro fueron manufacturados por Saigon S.A en Quito. Los paneles de 31 cm de longitud, 50 cm de altura y 2 cm de profundidad, elaborados en una vidriería en Guayaquil. Están provistos de sistemas de agitación por inyección de aire con un flujo de 1 L/min controlado con rotámetro (SHLLJ, Zhejiang, China) con escala de 0,5 L/min. Los cultivos fueron realizados en condiciones naturales de luz y temperatura. La temperatura ambiental medida con termómetro-datalogger (Elitech, RC5, London, UK) la humedad relativa con el equipo Mebus (KW-9232CE, Alemania) y se obtuvo los valores de irradiación solar del Centro de Energías Renovables y Alternativas (CERA) a través del Laboratorio de Ensayos Térmicos y Eficiencia Energética de Ecuador (LABET) ubicado en el campus Gustavo Galindo de la ESPOL. El cultivo de cada microalga se inició con una concentración de 630 células/mL y calculando la tasa de crecimiento, anteriormente descrita.

## 2.4 Recolección de biomasa algal

Cuando las microalgas alcanzaron la fase estacionaria (alrededor del séptimo día de cultivo en todas las cepas) se recolectó la biomasa por medio de filtración al vacío para lo cual se emplearon filtros de fibra de vidrio P/N61631 TyE A/E PALL y Whatman GF/D (1 y 2,7  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro respectivamente) de acuerdo al tamaño de las microalgas, previamente combustionados a 450°C por 4 horas en una mufla (Thermolyne, 1400, Pittsburgh, EEUU). Una parte del cultivo fue centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos para los análisis de polifenoles totales y antioxidante. La biomasa recolectada fue criopreservada a -80°C en el congelador Thermo Scientific (Revco Ultima II series, EEUU) para su posterior análisis bioquímico.

## 2.5 Análisis bioquímicos

- 2.5.1 Tratamiento previo a los análisis: Los análisis fueron realizados en biomasa seca, para lo cual, la biomasa microalgal de los filtros de cada triplicado de los fotobiorreactores, se secó a 55°C  $\pm$  5°C por 24 horas en una estufa (American Scientific, DK-42, EEUU) (55). Para la determinación de Polifenoles totales y capacidad antioxidante la biomasa fue liofilizada en el equipo Stokes 902-001-08 por 24 horas (56).
- 2.5.2 Humedad y cenizas: La humedad se determinó en la estufa (American Scientific, DK-42, EEUU) a 105°C  $\pm$  5°C por 4 horas de acuerdo al método de la AOAC 925.45 B (57). A continuación, la biomasa seca fue incinerada en la mufla (Thermolyne, 1400, Pittsburgh, EEUU) a 550°C por 5 horas según método A.O.A.C. 923.03 (57) para eliminar todos los compuestos orgánicos y por diferencia obtener las cenizas. Ambos resultados expresados en porcentaje de biomasa seca (55).
- 2.5.3 Lípidos totales: La biomasa seca fue colocada en embudos de decantación con una mezcla de cloroformo, dicloro-metano y metanol (1:1:1) y agitando vigorosamente para extraer los lípidos. La fase etérea se colectó en un balón previamente tarado para su posterior recuperación de los solventes por retroevaporación a 30rpm y 50°C en un rotavapor (Heidolph, MRC 4001, Alemania). El porcentaje del extracto etéreo fue determinado por diferencia de peso expresado en porcentaje de biomasa seca (58).
- 2.5.4 Proteínas totales: La biomasa seca se analizó por micro-kjeldahl empleando el equipo Kjeltec (System 1002, Effretikon, Suiza) mediante titulación ácido clorhídrico/ácido bórico de acuerdo al método AOAC 991.20 (57) utilizando

el factor de N x 4.78 para convertir el nitrógeno en proteínas totales, factor general recomendado para microalgas (59) y expresadas en porcentaje de biomasa seca (55).

- 2.5.5 Carbohidratos totales: Los carbohidratos totales fueron determinados por diferencia de los otros componentes del análisis proximal, de acuerdo a lo siguiente: (100 % - (humedad + cenizas + proteínas + lípidos)) y expresados en porcentaje de biomasa seca.
- 2.5.6 Fitopigmentos: En la biomasa se realizó una extracción adicionando metanol p.a. al 99,9% y sonicando por 2 horas en el sonicador (VWR, 97043-970, EEUU). Los extractos fueron sometidos a un barrido UV-Visible (200-700nm) en el espectrómetro (Biotec, Synergy HT microplate reader, Winooski, VT, EE.UU) usando el metanol como blanco (60). La técnica de barrido fue utilizada para lograr la identificación de compuestos que presentan absorción en este amplio intervalo de longitud de onda. En los extractos de la biomasa algal, se determinó la presencia de absorbancia (contrarrestada del blanco) en las longitudes de ondas de fitopigmentos de interés como los carotenoides.
- 2.5.7 Polifenoles y capacidad antioxidante: Para la extracción de los polifenoles se adicionó acetona al 70% a la biomasa algal liofilizada (61), sonicada por 10 minutos en un sonicador (Branson, 32.10, Ontario; Canada) y posterior filtración con papel whatman 597. Los polifenoles totales fueron cuantificados por el método Folin-Ciocalteu y expresados como mg equivalente de ácido Gálico (GAE) por gramo de biomasa seca (61). Se determinó la capacidad antioxidante de los polifenoles por el método ABTS (62) a partir del mismo extracto acetónico y los resultados expresados como mg de trolox por gramo de biomasa seca. Para ambos análisis fue usado el espectrofotómetro (Shimadzu, UV-160 A, Kyoto, Japón) a 760 nm para Polifenoles totales y a 734 nm para antioxidante. Adicionalmente del mismo extracto fue determinada la capacidad antioxidante por el método de DPPH usando el espectrofotómetro (Biotec, Synergy HT microplate reader, Winooski, VT, EE.UU) (63).

## **2.6 Aplicaciones potenciales de compuestos algales**

Las potenciales aplicaciones de los compuestos bioquímicos obtenidos en las diferentes cepas fueron determinadas mediante búsqueda bibliográfica

## **2.7 Análisis estadístico**

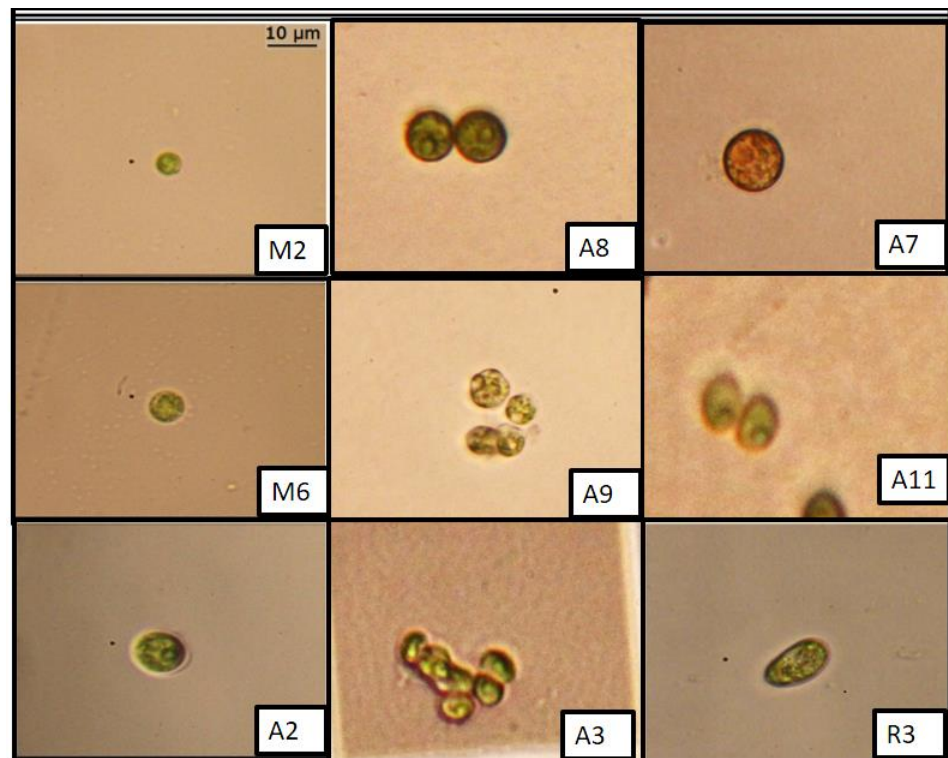
Los datos se analizaron en el software Statistica v7.0.61.0, determinando promedios y desviaciones estándares de cada parámetro, Test de Shapiro–Wilk para contrastar la normalidad de los datos, evaluación de diferencias significativas de los compuestos bioquímicos entre cepas de microalgas, el efecto del tipo de fotobiorreactor mediante análisis de ANOVA multifactorial y análisis post-hoc mediante la prueba de Tukey para determinar la significación.  $P < 0,05$  fue considerado como significativo.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Aislamiento e identificación de cepas de microalgas

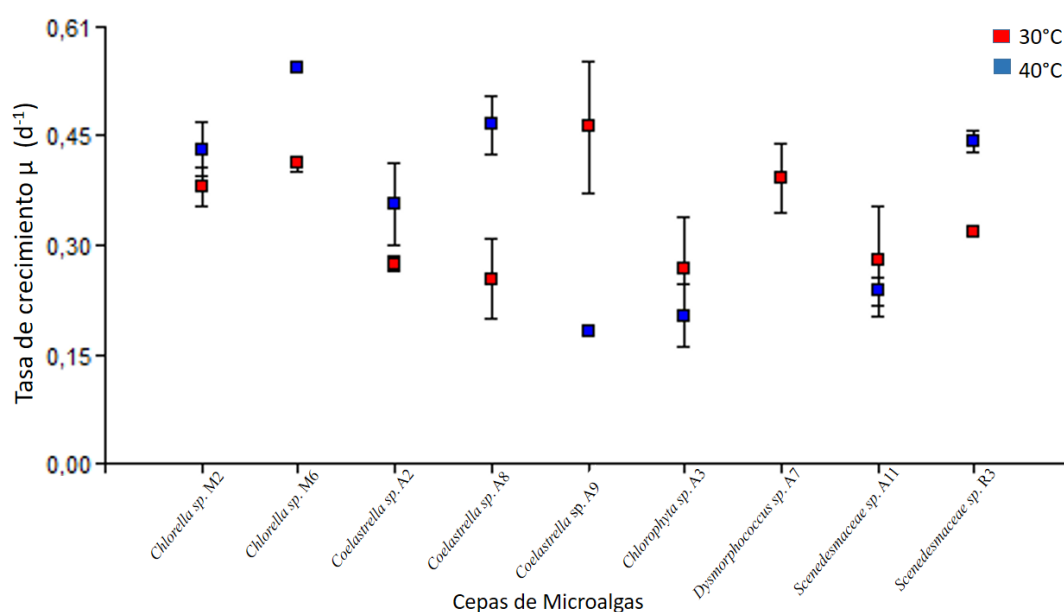
De las diluciones seriadas se asilaron e identificaron 9 cepas de microalgas: *Chlorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6, *Coelastrella* sp. A2, *Coelastrella* sp. A8, *Coelastrella* sp. A9, *Chlorophyta* sp. A3, *Dysmorphococcus* sp. A7, *Scenedesmaceae* sp. A11 y *Scenedesmus* sp. R3 (Imagen 1).



**Imagen 2:** cepas aisladas e identificadas. *Chlorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6, *Coelastrella* sp. A2, *Coelastrella* sp. A8, *Coelastrella* sp. A9, *Chlorophyta* sp. A3, *Dysmorphococcus* sp. A7, *Scenedesmaceae* sp. A11 y *Scenedesmus* sp. R3

### 3.2 Aclimatación de cepas de microalgas en cultivo de aguas residuales

Las microalgas se adaptaron a los cambios en su hábitat, sin embargo esta capacidad varió en las diferentes cepas de microalgas, esto se observó en la adaptación al cambio de temperatura de 30° a 40°C en las cepas cultivadas. *Coelastrella* sp. A9 presentó la mayor tasa de crecimiento a 30°C, sin embargo presenta gran variabilidad en sus réplicas. Las cepas *Chlorella* sp. M6, *Coelastrella* sp. A2 y *Scenedesmus* sp. R3 presentan mínimas desviaciones en sus triplicados. Ciertas cepas como *Chlorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6, *Coelastrella* sp. A2 y *Scenedesmus* sp. R3, mostraron un incremento en su tasa de crecimiento al aumentar la temperatura a 40°C. En contraste, las cepas *Coelastrella* sp. A9, *Chlorophyta* sp. A3 y *Scenedesmaceae* sp. A11 mostraron el efecto contrario. Finalmente *Dysmorphococcus* sp. A7 no creció a 40°C, lo que evidencia que esta cepa no se adaptó al incremento de temperatura, con rango de temperatura optima inferior (64). Las cepas *Chlorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6 y *Scenedesmus* sp. R3 presentaron mejor adaptabilidad (65), tuvieron tasas de crecimientos altas en ambas temperaturas con menor desviación standard, similar a lo reportado por de- Bashan (66) en *Chlorella sorokiniana* que mostró un mayor crecimiento con un aumento de la temperatura de 28 a 42°C cultivada también en agua residual. (Gráfico 1).



**Gráfico 1:** Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) de cepas aisladas al séptimo día de cultivo e inicio de fase estacionaria en agua residual doméstica pretratada a 30°C y 40°C. Cepas *Chlorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6, *Coelastrella* sp. A2, *Coelastrella* sp. A8, *Coelastrella* sp. A9, *Chlorophyta* sp. A3, *Dysmorphococcus* sp. A7, *Scenedesmaceae* sp. A11 y *Scenedesmus* sp. R3.

### 3.3 Cultivo en Fotobiorreactores

#### Objetivo específico 1

Se seleccionaron las cepas *Chlorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6 y *Scenedesmus* sp. R3 para cultivarlas en los fotobiorreactores debido a que presentaron mayor tasa de crecimiento en ambas temperaturas, 30 y 40°C (Gráfico 1), asegurando de esta manera, alta productividad al cultivarlas puertas afuera. Algunos estudios demuestran que los géneros *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. tienen alta tasa de crecimiento (67–69). Durante los días de cultivo, la temperatura ambiental osciló entre un máximo de 47,4°C y un mínimo de 18,8°C, la humedad relativa varió entre 37% y 68%. La irradiación solar tuvo un máximo de 1324 W/m<sup>2</sup>. Existieron diferencias significativas en la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) en relación al tipo de fotobiorreactores utilizados y entre las cepas cultivadas ( $F=25,22$   $p<0,0001$ ,  $df=2$ ). *Chlorella* sp. M2 presenta la mayor tasa de crecimiento, esta microalga pueden ser cultivadas en aguas residuales bajo condiciones extremas de temperatura e intensidad de luz (66). La temperatura de 47,4°C se registró el último día de cultivo de *Chlorella* sp. M6 en el fotobiorreactor panel, podría ser esta la causa de la menor tasa de crecimiento de esta cepa. (Gráfico 2, Imagen 2, Anexo A).

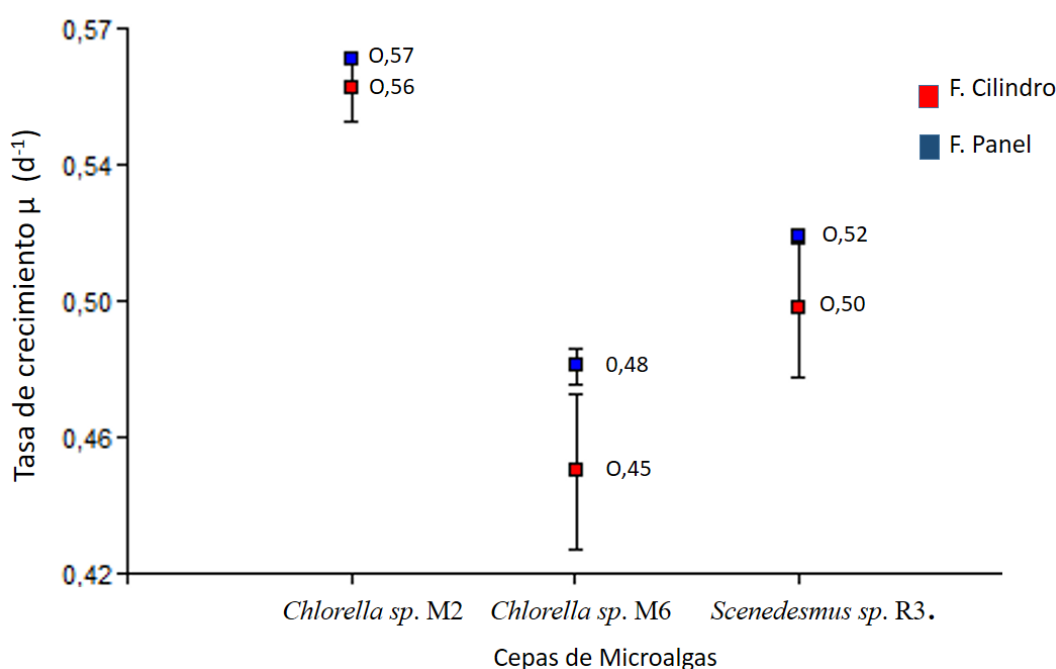


**Imagen 3:** Cultivo puertas afuera de *Chlorella* sp. M2 en los fotobiorreactores cilindros y tipo panel.

El género *Chlorella* es altamente tolerante a las condiciones de diversos hábitats, por esto, se considera como microorganismos omnipresentes. Son unicelulares de color verde, forma esférica, ovoide o elipsoidal, carecen de flagelo, tamaño de 4-10  $\mu\text{m}$  de diámetro (70), con un conjunto mínimo de organelas: un solo núcleo, cloroplasto, mitocondria, algunos peroxisomas y vacuolas, con o sin un pirenoide. Posee

reproducción exclusivamente asexual por medio de autoesporulación. Se encuentran solitarias o agrupadas y constituyen parte del fitoplancton en estanques y lagos (70,71).

*Scenedesmus* sp. R3 presentó tasas altas de crecimientos al cultivarlas en el agua residual pre-tratada debido a que, este género se desarrolla abundantemente en aguas ricas en nutrientes. Además forman parte de fitoplancton de ríos, estanques y lagos. Son microalgas verdes, inmóviles, de forma elipsoidal, oval o de media luna, forman colonias de 2 a 32 células lateralmente contiguas, dispuestas en series lineales o alternas. Poseen cloroplasto parietal, generalmente con un pirenoide. (71).



**Gráfico 2:** Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) al séptimo día de cultivo e inicio de fase estacionaria en agua residual doméstica pretratada en los fotobiorreactores cilindro y panel.

### 3.4 Análisis bioquímicos

#### Objetivos específicos 2 y 3

Los resultados de humedad y cenizas se muestran en el Gráfico 3. *Chlorella* sp. M2 mostró la humedad más alta, sin diferencias significativas entre cepas ( $F=2.90$ ,  $p=0.0728$ ,  $df=2$ ) y entre tipo de fotobiorreactor ( $F=6.67$ ,  $p=0.0864$ ,  $df=1$ ). En las cenizas el valor mayor se encontró en *Scenedesmus* sp. R3 con diferencias significativas entre cepas ( $F=9.05$ ,  $p=0.0023$ ,  $df=2$ ), pero no entre tipo de fotobiorreactor ( $F=0.25$ ,  $p=0.7908$ ,  $df=1$ ). Los valores obtenidos de ambos



parámetros en las dos cepas de *Chlorellas* sp. son similares a los obtenidos por Matos en *C. vulgaris* (55), utilizando la misma metodología a pesar de la diferencia del medio de cultivo quien usó un medio comercial. Las microalgas son fuente potencial de minerales tanto para piensos como para biofertilizantes, como lo demostraron Kim y Lei (72) en la incorporación de biomasa de microalgas desgrasadas en alimentos para cerdos en destete, como fuente adecuada de hierro; el grupo de tecnología Algal de la Universidad de Qatar utilizó biomasa algal como biofertilizante para el crecimiento de plantas de sorgo, las microalgas fueron cultivadas en aguas residuales en estanques abiertos a gran escala (73).

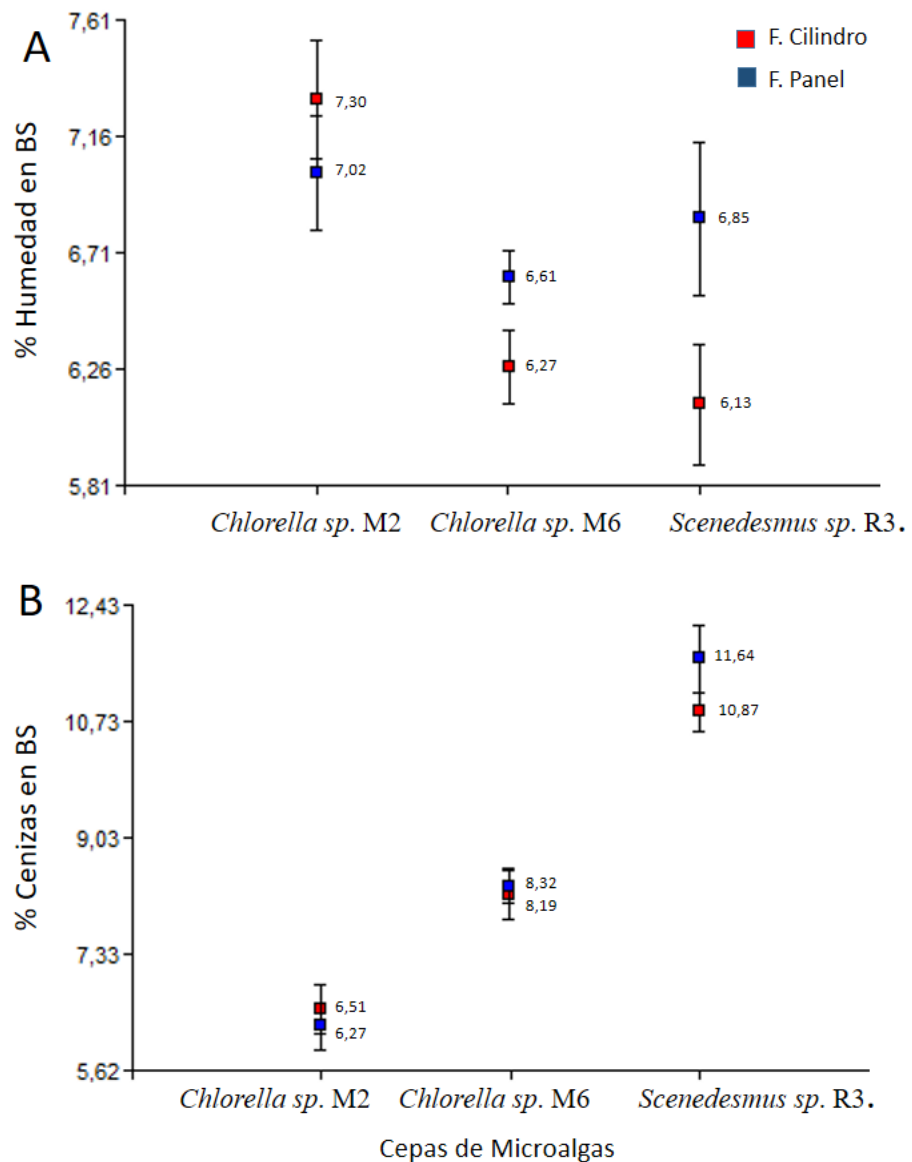


Gráfico 3: A. Humedad expresada en % en biomasa seca. B. Cenizas expresadas en % en biomasa seca. Cepas *Chlorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6, y *Scenedesmus* sp. R3

*Chlorella* sp. M2 mostró el mayor contenido de lípidos en ambos tipos de fotobiorreactores (Gráfico 4A). Existe diferencias significativas entre tipos de cepas ( $F=14.15$ ,  $p=0.0004$ ,  $df =2$ ) y entre tipo de fotobiorreactor solo en *Chlorella* sp. M6 ( $F=12.47$ ,  $p=0.0242$ ,  $df =1$ , anexo A). Esta última cepa tuvo el valor más alto en el fotobiorreactor tipo panel, podría deberse por el diseño del fotobiorreactor se reciba mayor intensidad lumínica y esta cepa sea más susceptible a este efecto, incrementando su producción de lípidos, tal como lo reporta Wang (74), el contenido de lípidos y proteínas varían con diferentes regímenes de nitrógeno y luz. Las intensidades de luz más altas tienden a inducir lípidos más neutros que la producción de lípidos polares estructurales en células de algas. Además, los cuerpos lipídicos citosólicos aumentaron tanto en número como en tamaño a medida que aumentó la intensidad de la luz (74). Los contenidos de lípidos de las dos cepas de *Chlorella* sp. y de *Scenedesmus* sp. R3 se encuentran dentro de los rangos reportados por Priyadarshani y Rath (38) para *C. vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, respectivamente.

*Chlorella* sp. M6 en el fotobiorreactor cilindro y *Scenedesmus* sp. R3 en el fotobiorreactor tipo panel obtuvieron los valores más altos en proteína (Gráfico 4 B), con diferencia significativa entre cepas y fotobiorreactor ( $F=9.70$ ,  $p=0.0017$ ,  $df=2$  y  $F=13.29$ ,  $p=0.0219$ ,  $df =1$  respectivamente, Anexo A). Las microalgas con mayor contenido de proteínas tienen un contenido lipídico total más bajo, debido a que la acumulación de lípidos en las células de las algas está directamente relacionada con la disminución de la proteína intracelular (74). Los contenidos de proteínas de las dos cepas de *Chlorella* sp. se encuentran dentro de los rangos reportados por Priyadarshani y Rath (38) para *C. vulgaris* y *Chlorella perniciosa* y la *Scenedesmus* sp. R3 dentro del rango para *S. obliquus* y *Scenedesmus quadricauda*.

*Chlorella* sp. M2 presentó el mayor contenido de carbohidratos en ambos tipos de fotobiorreactores con diferencias significativas entre tipos de cepas ( $F=6.15$ ,  $p=0.0091$ ,  $df =2$ ) y entre tipo de fotobiorreactor solo en *Chlorella* sp. M6 ( $F=17.64$ ,  $p=0.0137$ ,  $df =1$ , Anexo A). El contenido de carbohidratos en *Chlorella* sp. M2 es similar al reportado por Matos (55) y Tibbetts (75) para *C. vulgaris*. Este último autor (75) reporta que las *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. producen típicamente grandes cantidades de carbohidratos para fuente de energía y reserva de carbonos.

Las aguas residuales domésticas como la proveniente de alimentos, son abundantes en nutrientes como nitrógeno, fósforo, calcio, hierro, aluminio y carbono orgánico total, lo que constituye un adecuado medio para el cultivo de microalgas mixotróficas con rendimiento de biomasa razonablemente altos y productividad de lípidos, proteínas y carbohidratos (76), como lo reportó Zhen Wang (77) al cultivar *Scenedesmus* sp. en aguas residuales urbanas, en las cuales alcanzó una mejor tasa de crecimiento y mayor contenido de lípidos y proteínas que un medio comercial.

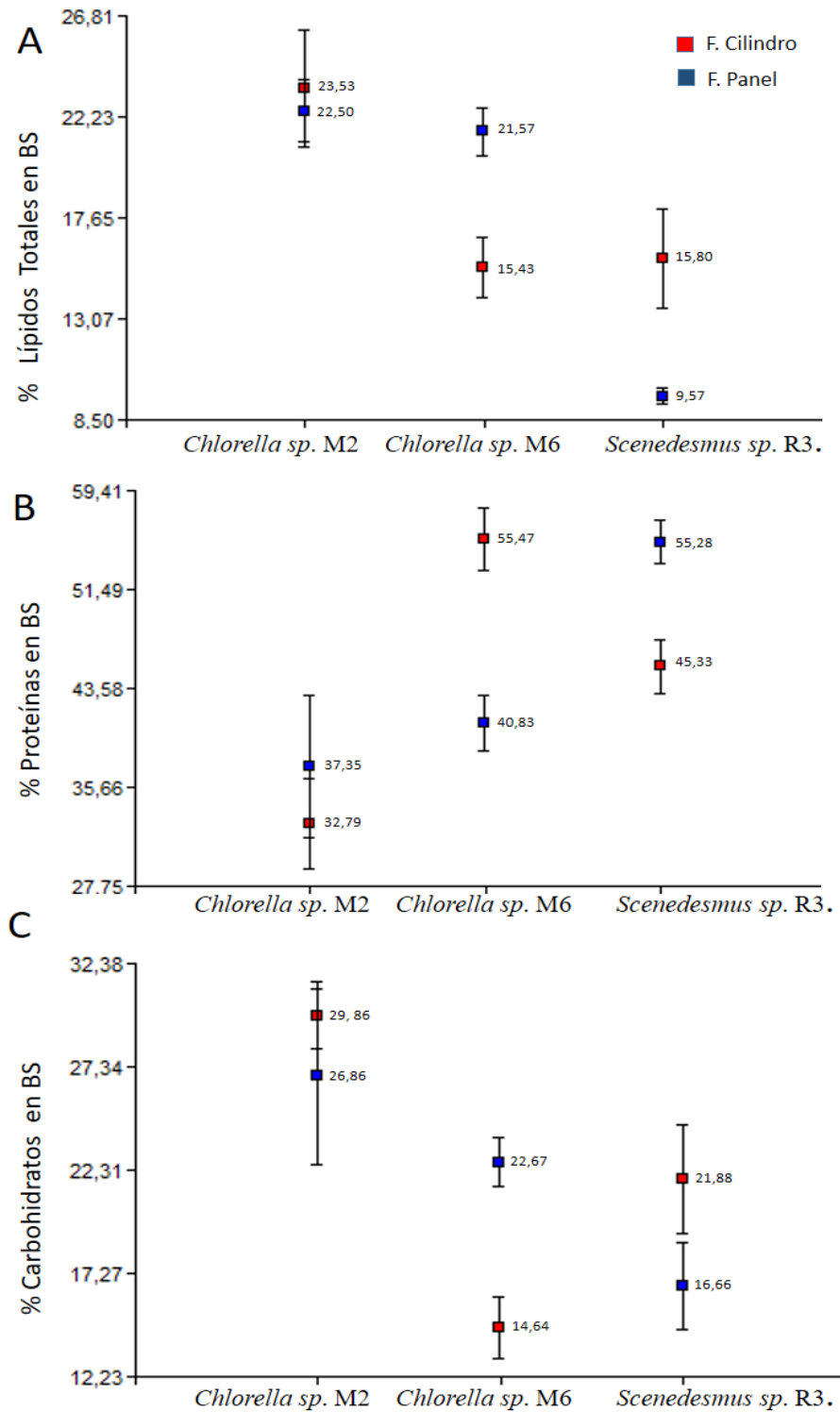
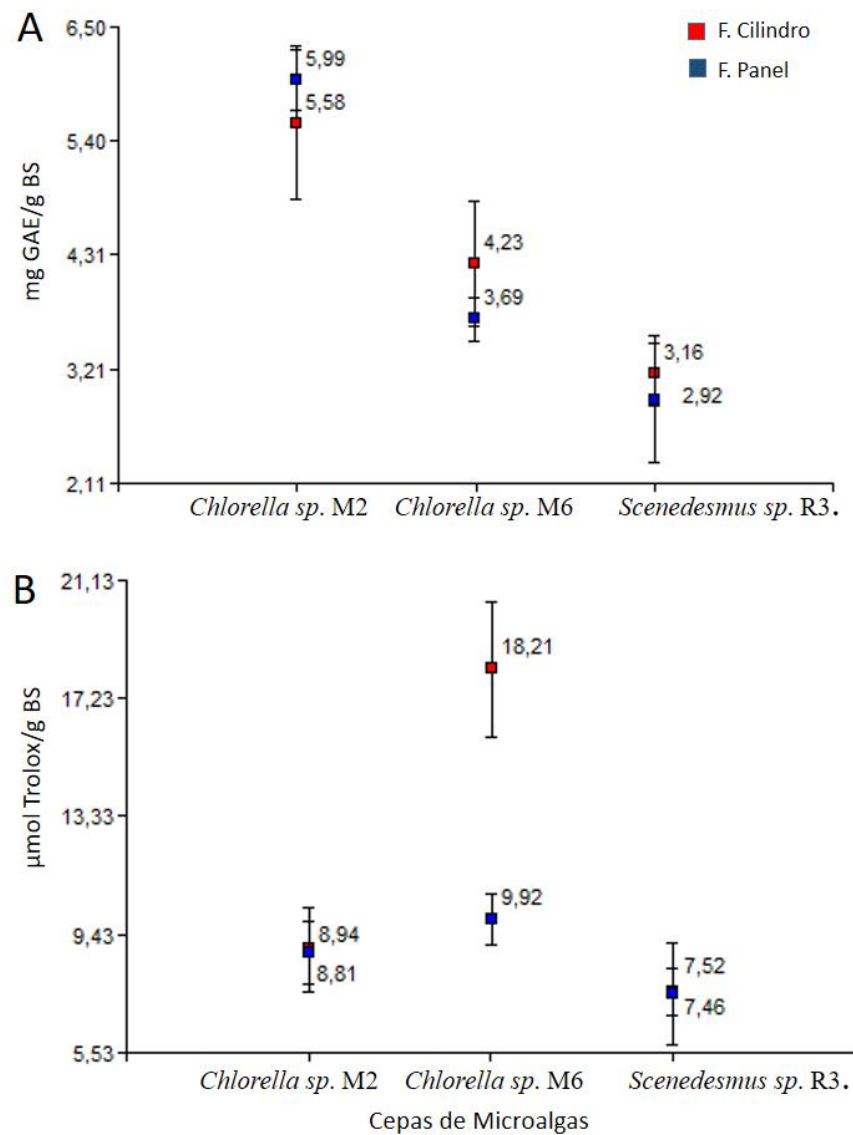


Gráfico 4. A. Lípidos expresados en % en biomasa seca. B. Proteínas expresadas en % en biomasa seca. C. Carbohidratos expresados en % en biomasa seca. Cepas *Chlorella* sp. M2, *Chlorella* sp. M6, y *Scenedesmus* sp. R3

*Chlorella* sp. M2 mostró el mayor contenido de polifenoles totales en ambos tipos de fotobiorreactores (Gráfico 5 A). Se observó que existe diferencias significativas entre tipos de cepas ( $F=9.60$ ,  $p=0.0019$ ,  $df =2$ ) y no entre tipo de fotobiorreactores ( $F=2.12$ ,  $p=0.2192$ ,  $df =1$ ). *Chlorella* sp. M6 en el fotobiorreactor cilindro mostró la mayor capacidad antioxidante por el método de ABTS (Gráfico 5 B), con diferencias significativas entre tipo de fotobiorreactor ( $F=17.30$ ,  $p=0.0225$ ,  $df =1$ , Anexo A). Se podría inferir que este comportamiento se deba, al efecto de autosombra provocado por las mismas microalgas más próximas a la superficie del cilindro, y podría también ser la razón del menor contenido lipídico determinado con respecto al fotobiorreactor tipo panel. Sin embargo, es necesario un estudio más detallado para determinar la causa real del efecto observado.

Existe también diferencias entre cepas ( $F=8.69$ ,  $p=0.0027$ ,  $df =2$ ). Varios estudios demuestran que *Chlorella* tienen un alta actividad antioxidante (42–44) Los valores obtenidos de polifenoles totales y la capacidad oxidante se encuentran dentro de los rangos reportados por otros estudios (42,45,46) en microalgas del mismo género. Por el método de DPPH *Chlorella* sp. M2 presenta mayor porcentaje de inhibición, ver anexo A.

El contenido de polifenoles totales difiere entre especies de microalgas, como lo reporta Ahmed (78), debido a que, estos polifenoles son metabolitos secundarios y compuestos de estrés que están implicados en mecanismos de protección química contra diferentes factores de stress bióticos (colonización de bacterias u otros organismos contaminantes) y abióticos (radiación UV, contaminación de metales), su producción depende de cuan desarrollado estén las vías metabólicas de síntesis de estos compuestos en cada especie. En consecuencia, la capacidad antioxidante en microalgas también varía ampliamente entre especies como lo reportó Safafar, quien evaluó 12 microalgas, entre ellas, *Chlorella*, y *Scenedesmus*, cultivadas en aguas residuales, quien observó una gran variación de la actividad antioxidante entre especies (79).



**Gráfico 5.** A. Polifenoles totales expresados en mg equivalente de ácido Gálico (GAE) por gramo de biomasa seca. B. Capacidad antioxidante expresada en mg de trolox por gramo de biomasa seca. Cepas *Chlorella sp. M2*, *Chlorella sp. M6*, y *Scenedesmus sp. R3*

Las cepas analizadas *Chlorellas sp. M2* y *M6* y *Scenedesmus sp. R3* presentaron absorbancia en las longitudes de onda de los fitopigmentos astaxantina, luteína, neoxantina,  $\alpha$ - caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\delta$ -caroteno los cuales se muestran en el Grafico 6.

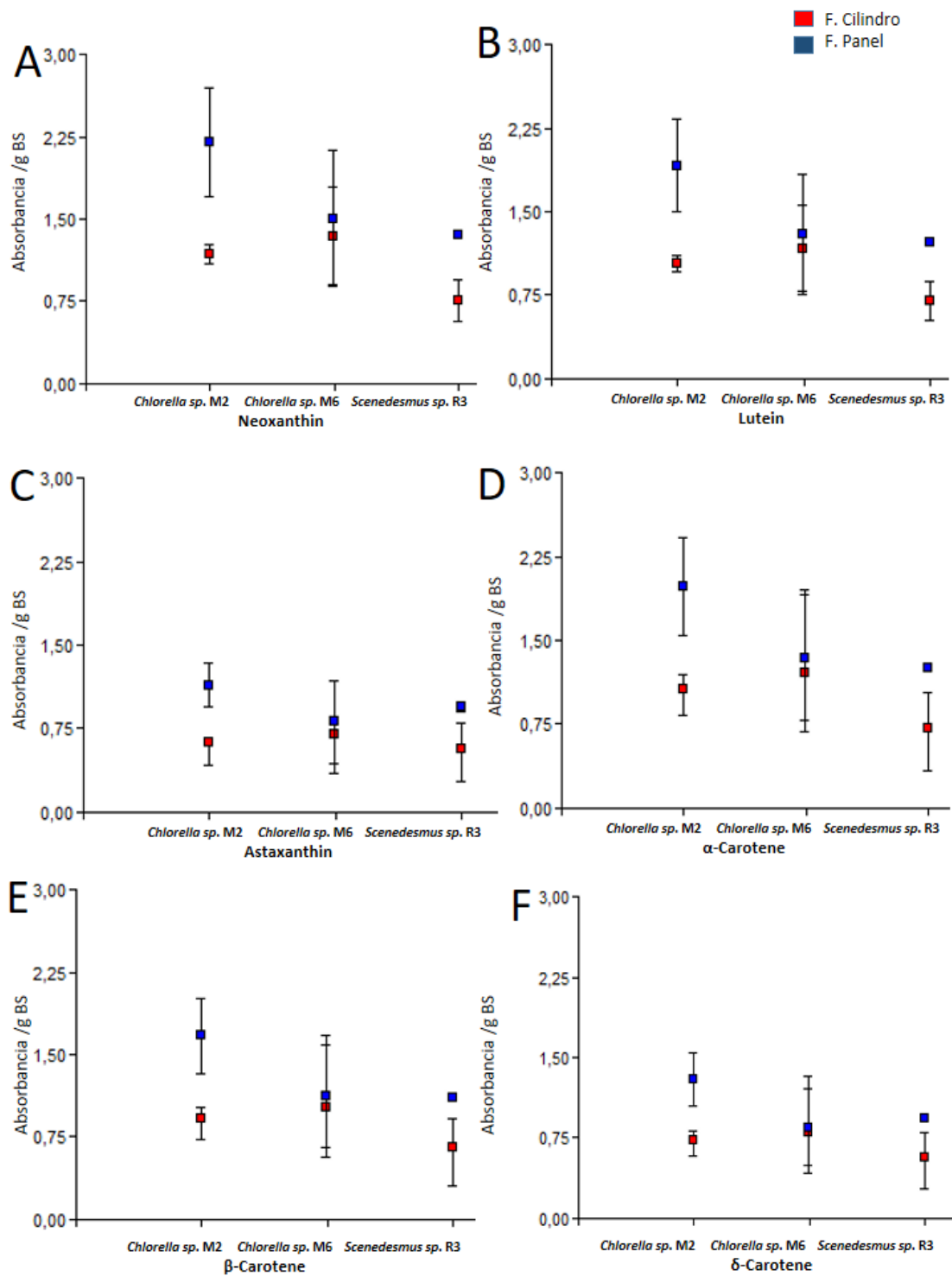


Gráfico 6: Absorbancia de Neoxantina (A), Luteína (B), Astaxantina (C),  $\alpha$ -Caroteno (D),  $\beta$ -Caroteno (E), y  $\delta$ -Caroteno (F). Todas las absorbancias se expresan por gramo de biomasa seca. Cepas *Chlorella sp. M2*, *Chlorella sp. M6*, y *Scenedesmus sp. R3*

Todos los carotenoides observados en el presente estudio, a excepción de la  $\delta$ -caroteno, han sido reportados por Paliwal (35) en algunas especies de *Chlorella* y *Scenedesmus*. Plaza et al. (80), Blanco et al. (81) y Campo et al. (82) describen como grandes productores de luteína a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. Astaxantina también ha sido identificada en *Chlorella zofingiensis* (83) y en *Scenedesmus* sp. (84). El  $\beta$ -caroteno fue descrito en *Chlorella* sp. por Nurachman (85) y en *Scenedesmus* sp. por Ishaq (84), al igual Santhosh (86) reporta Luteína y  $\beta$ -caroteno en *Chlorella* sp. y *Scenedesmus almeriensis*. En todos los fitopigmentos y en las 3 cepas existió mayor absorbancia en el fotobiorreactor tipo panel, debido probablemente a una mayor intensidad de luz, ya que ésta controla la síntesis de los carotenoides, induciendo su incremento, tal como lo observó Zhou (36) dentro del rango de 2000-8000 lux.

En resumen, *Chlorella* sp. M2 presentó la mayor tasa de crecimiento, el más alto contenido de humedad, lípidos, carbohidratos y polifenoles, sin diferencia significativa entre tipo de fotobiorreactores. *Chlorella* sp. M6 mostró el más alto contenido de proteínas y capacidad antioxidante, mientras que la *Scenedesmus* sp. R3 presentó el mayor porcentaje de cenizas. Las tres cepas presentaron absorbancia en las longitudes de onda de los fitopigmentos astaxantina, luteína, neoxantina,  $\alpha$ - caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\delta$ -caroteno.

### 3.5 Aplicaciones potenciales de compuestos algales

*Chlorella* sp. M2 y M6 pueden ser usados como materia prima para la producción de alimentos para animales por sus contenidos en lípidos, proteínas y carbohidratos. El género *Chlorella* se utiliza en la obtención de alimentos para muchos tipos de animales: gatos, perros, peces de acuario, aves ornamentales, caballos, aves de corral, vacas y toros de cría (38). La producción industrial como suplemento dietético para piensos de ganado y acuicultura por más de 70 empresas ha generado ingresos por varios miles de millones de dólares anuales (75).

Además, la biomasa de *Chlorella* sp. a través de la conversión termoquímica sirve para satisfacer la demanda de biocombustibles de segunda generación (87) .

*Scenedesmus* sp. R3 por su alto contenido de proteínas y los compuestos bioactivos que genera puede ser usada en alimentos para animales, acuicultura, biorremediación, cosméticos e industrias farmacéuticas (84).

Las cepas de *Chlorella* sp. M2 y M6 y *Scenedesmus* sp. R3 por su contenido en polifenoles con capacidad antioxidantes tienen importantes aplicaciones potenciales para las industrias farmacéutica y alimentaria (56)

Los fitopigmentos producidos por *Chlorella* sp. M2 y M6 y *Scenedesmus* sp. R3 como  $\beta$ -caroteno, astaxantina y luteína tienen aplicaciones en cosméticos, como pro-vitaminas, y en pigmentación (38)

## Conclusiones y Recomendaciones

La microalga nativa *Chlorella* sp. M2, indistintamente del método de cultivo, es una fuente potencial de macronutrientes y polifenoles con posibles aplicaciones tanto en la industria alimenticia, como en la farmacéutica y cosmética.

El fotobiorreactor tipo panel es el más efectivo para cultivo de microalgas para la obtención de fitopigmentos como astaxantina, luteína, neoxantina,  $\alpha$ - caroteno y  $\beta$ - caroteno.

El cultivo de microalgas del genero *Chlorella* y *Scenedesmus* de la costa ecuatoriana usando agua residual doméstica pretratada en fotobiorreactores tipo panel y cilindro es una alternativa factible para la obtención de biomasa con compuestos bioactivos de potencial aplicaciones a nivel biotecnológico.

Se recomienda continuar con la caracterización bioquímica de otras microalgas nativas de la costa ecuatoriana que pudiesen también ser fuentes de compuestos de interés comercial.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Zeng X, Guo X, Su G, Danquah MK, Zhang S, Lu Y, et al. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renew Sustain Energy Rev.* febrero de 2015;42:1385-92.
2. Dogaris I, Welch M, Meiser A, Walmsley L, Philippidis G. A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae. *Bioresour Technol.* diciembre de 2015;198:316-24.
3. Encarnação T, Pais AACC, Campos MG, Burrows HD. Cyanobacteria and microalgae: A renewable source of bioactive compounds and other chemicals. *Sci Prog.* 2015;98(2):145-68.
4. Markou G, Georgakakis D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl Energy.* Octubre de 2011;88(10):3389-401.
5. Gellenbeck KW. Utilization of algal materials for nutraceutical and cosmeceutical applications—what do manufacturers need to know? *J Appl Phycol.* 29 de septiembre de 2011;24(3):309-13.
6. Maurya R, Paliwal C, Chokshi K, Pancha I, Ghosh T, Satpati GG, et al. Hydrolysate of lipid extracted microalgal biomass residue: An algal growth promoter and enhancer. *Bioresour Technol.* 9 de febrero de 2016;207:197-204.
7. Sinha SN, Paul D, Halder N, Sengupta D, Patra SK. Green synthesis of silver nanoparticles using fresh water green alga *Pithophora oedogonia*. *Appl Nanosci.* 9 de octubre de 2014;5(6):703-9.
8. Park S, Kim J, Yoon Y, Park Y, Lee T. Blending water- and nutrient-source wastewaters for cost-effective cultivation of high lipid content microalgal species *Micractinium inermum* NLP-F014. *Bioresour Technol.* diciembre de 2015;198:388-94.
9. Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl Energy.* marzo de 2013;103:444-67.
10. Vigani M, Parisi C, Rodríguez-Cerezo E, Barbosa MJ, Sijtsma L, Ploeg M, et al. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends Food Sci Technol.* marzo de 2015;42(1):81-92.

11. Praveen P, Loh K-C. Nitrogen and phosphorus removal from tertiary wastewater in an osmotic membrane photobioreactor. *Bioresour Technol.* 2 de febrero de 2016;206:180-7.
12. Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, et al. Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl Biochem Biotechnol.* 24 de noviembre de 2009;162(4):1174-86.
13. BCE. Banco Central del Ecuador. Subgerencia de Programación y Regulación. Dirección Nacional de Síntesis Macroeconómica [Internet]. Banco Central del Ecuador. 2016 [citado 11 de junio de 2016]. Disponible en: <https://www.bce.fin.ec/index.php/boletines-de-prensa-archivo>
14. Biotec. Laboratorio de Biotecnología Energética [Internet]. [Citado 11 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.biotec.ec/>
15. Andes-Spirulina [Internet]. [Citado 11 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.andes-spirulina.com/>
16. Castillo A. Asociación Nacional de Empresas Municipales de Agua Potable, Alcantarillado y Servicios Conexos (ANEMAPA). En 2010.
17. Thenkabail PS, Knox JW, Ozdogan M, Gumma MK, Congalton RG, Wu Z, et al. Assessing future risks to agricultural productivity, water resources and food security: How can remote sensing help? *Photogramm Eng Remote Sens.* 2012;78(8):773782.
18. INAMHI. Boletín Climatológico Anual 2015 [Internet]. 2016 [citado 24 de febrero de 2017]. Report No.: 002. Disponible en: <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/programas-y-servicios/>
19. Colorado Gómez MA, Moreno Tirado DA, Pérez Posada JL. Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. La experiencia en La Guajira, ... *Ambiente Desarro.* 30 de junio de 2013;17(32):113-26.
20. Alarcón LR. Manual de practicas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición. UACJ; 2001. 112 p.
21. Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. Look Back at the U.s. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out Report [Internet]. National Renewable Energy Lab., Golden, CO. (US); 1998 jul [citado 5 de febrero de 2017]. Report No.: NREL/TP-580-24190. Disponible en: <https://www.osti.gov/scitech/biblio/15003040>
22. Nyholm N, Källqvist T. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ Toxicol Chem.* 1 de agosto de 1989;8(8):689-703.

23. Khan SA, Rashmi, Hussain MZ, Prasad S, Banerjee UC. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renew Sustain Energy Rev.* diciembre de 2009;13(9):2361-72.
24. Sheath RG, Wehr JD. 1 - Introduction to Freshwater Algae. En: *Freshwater Algae of North America* [Internet]. Burlington: Academic Press; 2003 [citado 15 de agosto de 2016]. p. 1-9. (Aquatic Ecology). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780127415505500027>
25. Park JBK, Craggs RJ, Shilton AN. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour Technol.* enero de 2011;102(1):35-42.
26. Hernández-Pérez A, Labbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. *Rev Biol Mar Oceanogr.* agosto de 2014;49(2):157-73.
27. FAO. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture [Internet]. Lavens, P; Sorgeloos, P.; 1996 [citado 24 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/w3732e/w3732e06.htm>
28. Castells XE. *Energía, Agua, Medioambiente, territorialidad y Sostenibilidad.* Ediciones Díaz de Santos; 2012. 1011 p.
29. Abou-Shanab RAI, Ji M-K, Kim H-C, Paeng K-J, Jeon B-H. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *J Environ Manage.* 30 de enero de 2013;115:257-64.
30. Sun X, Wang C, Li Z, Wang W, Tong Y, Wei J. Microalgal cultivation in wastewater from the fermentation effluent in Riboflavin (B2) manufacturing for biodiesel production. *Bioresour Technol.* septiembre de 2013;143:499-504.
31. Zhu L, Wang Z, Shu Q, Takala J, Hiltunen E, Feng P, et al. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water Res.* 1 de septiembre de 2013;47(13):4294-302.
32. Andersen RA. The Microalgal Cell. En: Emeritus ARPD, Ph.D QH, editores. *Handbook of Microalgal Culture* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [citado 7 de febrero de 2017]. p. 1-20. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118567166.ch1/summary>
33. Minhas AK, Hodgson P, Barrow CJ, Adholeya A. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. *Front Microbiol* [Internet]. 3 de mayo de 2016 [citado 7 de febrero de 2017];7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4853371/>

34. Kurmen JEC, González G, Klotz B. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *NOVA Publ En Cienc Bioméd.* 2015;11(19):93–104.
35. Paliwal C, Ghosh T, George B, Pancha I, Maurya R, Chokshi K, et al. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal Res.* abril de 2016;15:24-31.
36. Zhou Q, Zhang P, Zhang G. Biomass and carotenoid production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of light intensity. *Bioresour Technol.* noviembre de 2014;171:330-5.
37. Suganya T, Varman M, Masjuki HH, Renganathan S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renew Sustain Energy Rev.* marzo de 2016;55:909-41.
38. Priyadarshani I, Rath B. Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *J Algal Biomass Utiln.* 2012;3(4):89–100.
39. Ahmad F, Khan AU, Yasar A, others. The potential of *Chlorella vulgaris* for wastewater treatment and biodiesel production. *Pak J Bot.* 2013;45(S1):461–465.
40. Mahapatra DM, Ramachandra TV, others. Algal biofuel: bountiful lipid from *Chlorococcum* sp. proliferating in municipal wastewater. *Curr Sci.* 2013;105(1):47–55.
41. Álvarez-Díaz PD, Ruiz J, Arbib Z, Barragán J, Garrido-Pérez C, Perales JA. Lipid Production of Microalga *Ankistrodesmus falcatus* Increased by Nutrient and Light Starvation in a Two-Stage Cultivation Process. *Appl Biochem Biotechnol.* 14 de agosto de 2014;174(4):1471-83.
42. Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I, Brabanter JD, Cooman LD. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J Appl Phycol.* 1 de diciembre de 2012;24(6):1477-86.
43. Goh S-H, Yusoff FM, Loh SP. A Comparison of the Antioxidant Properties and Total Phenolic Content in a Diatom, *Chaetoceros* sp. and a Green Microalga, *Nannochloropsis* sp. *J Agric Sci.* 19 de agosto de 2010;2(3):123.
44. Wu L, Ho JA, Shieh M-C, Lu I-W. Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. *J Agric Food Chem.* 18 de mayo de 2005;53(10):4207-12.
45. Li H-B, Cheng K-W, Wong C-C, Fan K-W, Chen F, Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.* 2007;102(3):771-6.

46. Safafar H, van Wagenen J, Møller P, Jacobsen C. Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Mar Drugs*. 11 de diciembre de 2015;13(12):7339-56.
47. INAMHI. Boletín climatológico decadal Cuenca del río Guayas Noviembre 2015 [Internet]. INAMHI; 2015 dic [citado 6 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.serviciometeorologico.gob.ec>
48. Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). NTE INEN 2176: Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo [Internet]. 1998 [citado 6 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://archive.org/details/ec.nte.2176.1998>
49. Confederación Hidrográfica del Ebro. Metodología para el establecimiento el Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua [Internet]. 2005 [citado 6 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/RaquelCruzBances/fitobentos-diatomaceas-manual>
50. Guillard RR, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. *Can J Microbiol*. abril de 1962;8:229-39.
51. Lai H-T, Hou J-H, Su C-I, Chen C-L. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotoxicol Environ Saf*. Febrero de 2009;72(2):329-34.
52. Wehr JD. 22 - Brown Algae. En: *Freshwater Algae of North America* [Internet]. Burlington: Academic Press; 2003 [citado 15 de agosto de 2016]. p. 757-73. (Aquatic Ecology). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780127415505500234>
53. Science4all - Microscopy and Photography [Internet]. [Citado 23 de febrero de 2017]. Disponible en: [http://www.science4all.nl/?Microscopy\\_and\\_Photography](http://www.science4all.nl/?Microscopy_and_Photography)
54. Levasseur M, Thompson PA, Harrison PJ. Physiological Acclimation of Marine Phytoplankton to Different Nitrogen Sources1. *J Phycol*. 1 de octubre de 1993;29(5):587-95.
55. Matos ÂP, Feller R, Moecke EHS, Oliveira JV de, Junior AF, Derner RB, et al. Chemical Characterization of Six Microalgae with Potential Utility for Food Application. *J Am Oil Chem Soc*. 27 de mayo de 2016;93(7):963-72.
56. Rodriguez-Garcia I, Guil-Guerrero JL. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chem*. junio de 2008;108(3):1023-6.

57. AOAC A of OAC. Official Methods of Analysis [Internet]. 15th ed. Washington, DC; 1990 [citado 30 de octubre de 2016]. Disponible en: [https://archive.org/stream/gov.law.aoc.methods.1.1990/aoc.methods.1.1990\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/gov.law.aoc.methods.1.1990/aoc.methods.1.1990_djvu.txt)
58. Christie WW. Gas chromatography and lipids: a practical guide. Repr. Ayr, Scotland: The Oily Press; 1994. 307 p. (The Oily Press lipid library).
59. Lourenço SO, Barbarino E, Lavín PL, Marquez UML, Aidar E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *Eur J Phycol.* 1 de febrero de 2004;39(1):17-32.
60. Manzano P, Miranda M, Paz R, Abreu P, Silva O, Hernández S. Aislamiento y caracterización de la fracción hexánica de las hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. con actividad antifúngica. *Rev Cuba Farm.* 2012;46(3):352-8.
61. Georé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *J Agric Food Chem.* 1 de marzo de 2005;53(5):1370-3.
62. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* mayo de 1999;26(9-10):1231-7.
63. Murray AP, Rodriguez S, Frontera MA, Tomas MA, Mulet MC. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z Naturforschung C J Biosci.* agosto de 2004;59(7-8):477-80.
64. Dawson JT, Harris DO. Studies of the growth requirements of the genus *Dysmorphococcus* (volvocales). *Arch Für Protistenkd.* 1 de enero de 1983;127(1):47-58.
65. Xu J, Hu H. Screening high oleaginous *Chlorella* strains from different climate zones. *Bioresour Technol.* septiembre de 2013;144:637-43.
66. de-Bashan LE, Trejo A, Huss VAR, Hernandez J-P, Bashan Y. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresour Technol.* julio de 2008;99(11):4980-9.
67. Xin L, Hong-ying H, Ke G, Ying-xue S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol.* julio de 2010;101(14):5494-500.

68. Feng Y, Li C, Zhang D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresour Technol.* enero de 2011;102(1):101-5.
69. Dean AP, Sigee DC, Estrada B, Pittman JK. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour Technol.* junio de 2010;101(12):4499-507.
70. Fujishima M. *Endosymbionts in Paramecium*. Springer Science & Business Media; 2009. 260 p.
71. Shubert LE. 7 - Nonmotile Coccoid and Colonial Green Algae A2 - Wehr, John D. En: Sheath RG, editor. *Freshwater Algae of North America* [Internet]. Burlington: Academic Press; 2003 [citado 15 de agosto de 2016]. p. 253-309. (Aquatic Ecology). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780127415505500088>
72. Kim J, Lei XG. Potential of a defatted green microalgal biomass as an iron source for hemoglobin repletion (828.8). *FASEB J.* 4 de enero de 2014;28(1 Supplement):828.8.
73. Das P, Thaher MI, Aljabri HMSJ, Youssef TAA. Study the Potential Use of Waste Water Grown Microalgae Biomass as Biofertilizer. *Qatar Found Annu Res Conf Proc.* 1 de marzo de 2016;2016(1):EEPP2577.
74. Wang L, Li Y, Sommerfeld M, Hu Q. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresour Technol.* febrero de 2013;129:289-95.
75. Tibbetts SM, Whitney CG, MacPherson MJ, Bhatti S, Banskota AH, Stefanova R, et al. Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. *Algal Res.* septiembre de 2015;11:435-47.
76. Ji M-K, Yun H-S, Park S, Lee H, Park Y-T, Bae S, et al. Effect of food wastewater on biomass production by a green microalga *Scenedesmus obliquus* for bioenergy generation. *Bioresour Technol.* marzo de 2015;179:624-8.
77. Wang Z, Yao X, Miao M, Chen Q, Kong Q, Shang D, et al. Effects of urban wastewater dilution on growth and biochemical properties of *Scenedesmus* sp. *Desalination Water Treat.* 25 de diciembre de 2016;57(60):29363-70.
78. Ahmed F, Fanning K, Netzel M, Turner W, Li Y, Schenk PM. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chem.* diciembre de 2014;165:300-6.

79. Safafar H. Antioxidative properties of some phototropic microalgae grown in waste water. En 2015.
80. Plaza M, Herrero M, Cifuentes A, Ibáñez E. Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *J Agric Food Chem.* 26 de agosto de 2009;57(16):7159-70.
81. Blanco AM, Moreno J, Campo JAD, Rivas J, Guerrero MG. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1 de enero de 2007;73(6):1259-66.
82. Campo JAD, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1 de abril de 2007;74(6):1163-74.
83. Yuan J-P, Peng J, Yin K, Wang J-H. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res.* enero de 2011;55(1):150-65.
84. Ishaq AG, Matias-Peralta HM, Basri H. Bioactive Compounds from Green Microalga – *Scenedesmus* and its Potential Applications: A Brief Review. *Pertanika J Trop Agric Sci.* 2016;39(1):1-16.
85. Nurachman Z, H H, Rahmaniyah WR, Kurnia D, Hidayat R, Prijamboedi B, et al. Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. *Algal Res.* julio de 2015;10:25-32.
86. Santhosh S, Dhandapani R, Hemalatha N. Bioactive compounds from Microalgae and its different applications-a review. [citado 13 de febrero de 2017]; Disponible en: <http://www.imedpub.com/articles/bioactive-compounds-from-microalgae-and-its-different-applications-a-review.pdf>
87. Phukan MM, Chutia RS, Konwar BK, Katakai R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Appl Energy.* 6 de enero de 2011;88:3307-12.



# **ANEXOS**

## ANEXO A

Parámetros evaluados en las cepas cultivadas en agua residual doméstica pretratada.

	<i>Chlorella sp. M2</i>		<i>Chlorella sp. M6</i>		<i>Scenedesmus sp. R3</i>	
	F. Cilindro	F. Panel	F. Cilindro	F. Panel	F. Cilindro	F. Panel
Tasa de crecimiento $\mu$	0,56 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,001	0,45 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,001
Humedad % BS	7,30 $\pm$ 0,39	7,02 $\pm$ 0,38	6,27 $\pm$ 0,25	6,61 $\pm$ 0,18	6,13 $\pm$ 0,40	6,85 $\pm$ 0,52
Cenizas % BS	6,51 $\pm$ 0,62	6,27 $\pm$ 0,59	8,19 $\pm$ 0,60	8,32 $\pm$ 0,44	10,87 $\pm$ 0,49	11,64 $\pm$ 0,83
Lípidos % BS	23,53 $\pm$ 4,58	22,50 $\pm$ 2,46	15,43 $\pm$ 2,37 A	21,57 $\pm$ 1,85 B	15,80 $\pm$ 3,90	9,57 $\pm$ 0,59
Proteínas % BS	32,79 $\pm$ 6,25	37,35 $\pm$ 9,80	55,47 $\pm$ 4,33 A	40,83 $\pm$ 3,90 B	45,33 $\pm$ 3,68 A	55,28 $\pm$ 2,97 B
Carbohidratos % BS	29,86 $\pm$ 2,78	26,86 $\pm$ 7,45	14,64 $\pm$ 2,58 A	22,67 $\pm$ 2,07 B	21,88 $\pm$ 4,53	16,66 $\pm$ 3,64
Polifenoles mg GAE/g BS	5,58 $\pm$ 0,74	5,98 $\pm$ 0,29	4,228 $\pm$ 0,60	3,69 $\pm$ 0,21	3,16 $\pm$ 0,30	2,92 $\pm$ 0,61
C.Antioxidante $\mu$ mol Trolox/g BS	8,93 $\pm$ 1,41	8,81 $\pm$ 1,03	18,21 $\pm$ 2,23 A	9,92 $\pm$ 0,85 B	7,52 $\pm$ 0,77	7,46 $\pm$ 1,67
C.Antioxidante % inhibición DPPH	31,42 $\pm$ 5,01	33,61 $\pm$ 4,80	18,92 $\pm$ 4,18	16,22 $\pm$ 4,05	16,89 $\pm$ 6,87	15,41 $\pm$ 7,16

Valores medios  $\pm$  SDs, n = 3. Medias etiquetadas en una fila con letras no común presentan diferencias significativas, P<0,05

