

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en
Microbiología Celular y Molecular**

**Bioprospección de microalgas con potencial para la producción
de biodiésel**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Karolina Casian González

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por
Karolina Casian González
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dr. Daniel Saucedo Carvajal



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de tesis que presenta **Karolina Casian González** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular.

Bioprospección de microalgas con potencial para la producción de biodiésel

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Directora de tesis

El uso indiscriminado de las fuentes de energía no renovables, aunado a los problemas ambientales derivados de su uso, ha llevado a la búsqueda de alternativas en los suministros energéticos, siendo las energías renovables una opción que se ha perfilado y ha ganado fuerza en las últimas décadas. El biodiésel es un biocombustible líquido que asemeja las características de diésel convencional, sin embargo, es importante contar con un sistema de producción técnica y económicamente viable, donde la selección de la especie con que se produce el biodiésel juega uno de los papeles fundamentales. Es por lo anterior que se plantea como objetivo la bioprospección de especies de microalgas con alto contenido de lípidos y ácidos grasos saturados para la producción de biodiésel. Las especies a evaluar fueron aisladas de cuerpos de agua de la península de Baja California, las cuales actualmente forman parte de la colección del Laboratorio de Biotecnología de Algas del CICESE. Fueron seleccionadas diez especies de microalgas, cultivadas bajo las mismas condiciones en cultivos monoespecíficos, de los cuales se evaluó su biomasa para seleccionar aquella especie que será inducida a la sobreproducción de lípidos para producir biodiésel. Después del análisis preliminar de las diez especies de microalga, *Chlorella autotrophica* fue la especie con las mejores características para la sobreproducción de lípidos y ácidos grasos saturados, dado su mayor tasa de crecimiento (1.327 divisiones día⁻¹), mayor proporción de ácidos grasos monosaturados (44.66%), mayores índices de productividad de biomasa (0.21 g L⁻¹ día⁻¹) y lípidos (0.03 g L⁻¹ día⁻¹), así como mejores propiedades de biodiesel, alcanzando un número de cetanos de 56.9. Para el ensayo de sobreproducción de lípidos y ácidos grasos saturados, la especie *C. autotrophica* fue inducida a estrés por salinidad, resultó en un incremento en la productividad de biomasa en los tratamientos (15 y 30 g L⁻¹ de NaCl) pero sin incremento significativo en la productividad de lípidos y el número de cetanos. Los resultados indican que *C. autotrophica* es halotolerante y potencial especie para la producción de biodiésel.

Palabras clave: Biodiésel, microalgas, bioprospección, lípidos, ácidos grasos saturados, salinidad.

Abstract of the thesis presented by **Karolina Casian González** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life in Sciences with orientation in Cellular and Molecular Microbiology.

Bioprospecting of microalgae with potential for the production of biodiesel

Abstract approved by:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Thesis Director

The indiscriminate use of non-renewable energy sources, together with the environmental problems derived from their use, has led to the search for alternatives in energy supplies, with renewable energies being an option that has emerged and has gained strength in recent decades. Biodiesel is a liquid biofuel that resembles the characteristics of conventional diesel, however, it is important to have a technically and economically viable production system, where the selection of the species with which the biodiesel is produced plays a fundamental role. For this reason, the objective of bioprospecting microalgae species with a high content of lipids and saturated fatty acids for biodiesel production. The species to be evaluated were isolated from water bodies of the Baja California peninsula, which are currently part of the collection of the Algae Biotechnology Laboratory of CICESE. Ten species of microalgae were selected, cultivated under the same conditions in monospecific crops, of which their biomass was evaluated to select the species that will be induced to overproduce lipids for the production of biodiesel. After the preliminary analysis of the ten species of microalgae, *Chlorella autotrophica* was the species with the best characteristics for the overproduction of lipids and saturated fatty acids, given its higher growth rate (1.327 day^{-1} divisions), higher proportion of fatty acids monounsaturated (44.66%), higher indices of biomass productivity ($0.21 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and lipids ($0.03 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$), as well as better biodiesel properties, which reached a number of cetanes of 56.9. For the overproduction test of lipids and saturated fatty acids, the species *C. autotrophica* was induced to stress by salinity, resulting in an increase in biomass productivity in the treatments (15 and 30 g L^{-1} of NaCl) but without an increasingly significant in lipid productivity and cetane number. The results indicate that *C. autotrophica* is halotolerant and a potential strain for biodiesel production.

Keywords: Biodiesel, microalgae, bioprospecting, lipids, saturated fatty acids, salinity.

Dedicatoria

A MIS EXTRAORDINARIOS PADRES...

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por abrirme las puertas para realizar mis estudios de posgrado en el programa de Ciencias de la Vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al apoyo económico para la adquisición de materiales y reactivos para la realización de esta tesis, por medio de obtenidos a partir de las cuentas de los proyectos con recursos fiscales 623108 y 623115.

A mi directora de tesis Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por su dirección académica durante mi trabajo de tesis, por sus enseñanzas, apoyo y siempre alentarme a seguir adelante.

A los integrantes del comité de tesis Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez y Dr. Daniel Saucedo Carvajal, por sus valiosas observaciones y comentarios académicos para la elaboración de esta tesis.

Al Departamento de Microbiología del CICESE por aceptarme como alumna.

Al Departamento de Acuicultura del CICESE por permitirme usar las instalaciones.

A mis profesores por los conocimientos brindados.

A la Dra. Rufina Hernández y Dra. Patricia Juárez por su apoyo durante sus períodos en la Coordinación del Posgrado en Ciencias de la Vida.

Al personal técnico y administrativo de CICESE.

A la Dra. Ceres Molina por su apoyo como técnico de laboratorio.

A la M. C. Fátima Castro por ser mi guía en los experimentos de laboratorio y ayudarme en todo momento.

A mis compañeras de laboratorio Sandra y Génesis por su ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio y por brindarme su amistad.

A mis compañeros de generación por el tiempo compartido y las incontables risas.

A mis amigos Marylin y Moisés por su paciencia, apoyo moral y por brindarme su invaluable amistad. Las horas de estudio fueron más amenas al compartirlas con ustedes.

A Erik, Josué y Edgar por todos estos años de amistad y brindarme palabras de aliento cuando más lo he necesitado.

A Jonathan por estar a mi lado y ayudarme en momentos de crisis (como la ocasión del casillero).

A mis padres, Leonardo y Patricia, porque sin ellos nada de esto habría sido posible, su amor y apoyo son lo mejor del mundo.

A mi hermana Ana, por ser mi compañera de vida.

A Maxi por estar haciendo compañía y reconfortarme en las noches de desvelo.

Y a todas las personas que me apoyaron de forma directa o indirecta durante la maestría y en la tesis, muchas gracias.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	iii
Resumen en inglés.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Justificación.....	6
1.3 Hipótesis.....	7
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología.....	8
2.1 Selección de especies.....	8
2.2 Mantenimiento de cepas.....	8
2.3 Cultivo masivo de diez especies.....	9
2.4 Evaluación de la biomasa.....	9
2.4.1 Conteo y tamaño celular.....	9
2.4.2 Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico.....	10
2.4.3 Pigmentos.....	10
2.4.4 Fotosíntesis.....	11
2.4.5 Composición proximal.....	11
2.4.5.1 Carbohidratos.....	11
2.4.5.2 Proteínas.....	12
2.4.5.3 Lípidos.....	12
2.4.6 Perfil de ácidos grasos.....	12
2.5 Índices de calidad.....	14
2.5.1 Productividad.....	14
2.5.2 Propiedades del biodiésel.....	14

2.6 Sobreproducción de lípidos y ácidos grasos.....	15
2.6.1 Evaluación de la sobreproducción de lípidos y ácidos grasos	15
2.7 Análisis estadístico.....	16
Capítulo 3. Resultados.....	17
3.1 Evaluación de los cultivos de las diez especies	17
3.1.1 Crecimiento de las microalgas	17
3.1.2 Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico.....	21
3.1.3 Pigmentos.....	21
3.1.4 Fotosíntesis.....	22
3.1.5 Composición proximal.....	23
3.1.6 Perfil de ácidos grasos.....	24
3.2 Índices de calidad.....	27
3.2.1 Productividad.....	27
3.2.2 Propiedades del biodiésel.....	28
3.3 Efecto de la salinidad en <i>Chlorella autotrophica</i>	29
3.3.1 Crecimiento de la especie seleccionada.....	29
3.3.2 Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico.....	32
3.3.3 Pigmentos.....	33
3.3.4 Fotosíntesis.....	34
3.3.5 Composición proximal.....	35
3.3.6 Perfil de ácidos grasos.....	35
3.4 Índices de calidad del ensayo de salinidad.....	37
3.4.1 Productividad.....	37
3.4.2 Propiedades del biodiésel.....	37
Capítulo 4. Discusión.....	39
4.1 Evaluación de los cultivos de las diez especies	39
4.1.1 Crecimiento de las microalgas.....	39
4.1.2 Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico.....	41
4.1.3 Pigmentos.....	41
4.1.4 Fotosíntesis.....	42
4.1.5 Composición proximal.....	42
4.1.6 Perfil de ácidos grasos.....	44

4.1.7	Índices de calidad.....	46
4.2	Efecto de la salinidad en <i>Chlorella autotrophica</i>	47
4.2.1	Crecimiento.....	47
4.2.2	Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico.....	48
4.2.3	Pigmentos.....	48
4.2.4	Fotosíntesis.....	49
4.2.5	Composición proximal.....	50
4.2.6	Perfil de ácidos grasos.....	52
4.2.7	Índices de calidad.....	53
Capítulo 5. Conclusiones.....		54
Capítulo 6. Recomendaciones.....		56
Literatura citada.....		57

Lista de figuras

Figura		Página
1	Valores promedio y desviación estándar de pH del medio de los cultivos de las diez especies de microalgas mantenidas en sistemas por lote. Especies marinas: <i>Amphora</i> sp., <i>Cymbella</i> sp., <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella bardawil</i> , <i>Aphanocapsa marina</i> , <i>Komvophoron</i> sp., <i>Phormidium</i> sp. y <i>Heterococcus</i> sp. Especies dulceacuícolas: <i>Chlorella autotrophica</i> y <i>Geitlerinema lemmermannii</i>	17
2	Valores promedio y desviación estándar de las curvas de crecimiento de diez especies de microalgas mantenidas en cultivos por lotes.....	18
3	Valores promedio de pH del medio de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	29
4	Valores promedio y desviación estándar de las curvas de crecimiento de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	30

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Especies de microalgas seleccionadas para los ensayos de caracterización.....	8
2	Condiciones de extracción de proteínas para cada especie de microalga.....	12
3	Valores promedio y desviación estándar de los indicadores de crecimiento de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidos en sistemas por lotes.....	19
4	Valores promedio y desviación estándar de la medición celular inicial y final (μm) de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidos en sistemas por lotes.....	20
5	Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico, en mg L^{-1} , de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas por lotes.....	21
6	Valores promedio y desviación estándar de la concentración de pigmentos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas por lotes.....	22
7	Indicadores fotosintéticos del día final de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.....	23
8	Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.....	24
9	Valores promedio del porcentaje de ácidos grasos de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.....	25
10	Valores promedio y desviación estándar de la productividad ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) de biomasa y de lípidos de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.....	27
11	Valores promedio del índice de saponificación (SV), índice de yodo (IV) y número de cetanos (CN) de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.....	28
12	Valores promedio y desviación estándar de los indicadores de crecimiento de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	31
13	Valores promedio y desviación estándar de la medición celular inicial y final (μm) de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	32
14	Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico, en mg L^{-1} , de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	33

15	Valores promedio y desviación estándar de la concentración de pigmentos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	33
16	Indicadores fotosintéticos de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).	34
17	Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	35
18	Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	36
19	Valores promedio y desviación estándar de la productividad ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) de biomasa y de lípidos de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	37
20	Valores promedio y desviación estándar del índice de saponificación (SV), índice de yodo (IV) y número de cetanos (CN) de los cultivos de <i>Chlorella autotrophica</i> mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).....	38

Capítulo 1. Introducción

El biodiésel es un biocombustible líquido, resultado de una reacción de transesterificación en la que lípidos reaccionan con etanol en presencia de calor y un catalizador para obtener como producto principal ésteres etílicos de ácidos grasos (Taparia et al., 2016). La producción de biodiésel proviene de cualquier material que contenga ácidos grasos, ya sea unido a otras moléculas o presentes como moléculas libres, donde la elección de la materia prima se basa en variables tales como la disponibilidad local, el costo económico, el apoyo del gobierno y el rendimiento como combustible (Yuan et al., 2019).

El biodiésel se puede clasificar como biocombustible de primera, segunda o tercera generación en función de sus materias primas o tecnologías de producción. Los biocombustibles de primera generación, provienen principalmente de cultivos alimenticios como la caña de azúcar, el maíz, el almidón y aceites vegetales o grasas animales. El inconveniente con la producción de biodiésel a partir de cultivos alimentarios, es que tienen una capacidad limitada para alcanzar objetivos de sostenibilidad y compiten con la seguridad alimentaria. Los combustibles de segunda generación se obtienen generalmente de materias primas no comestibles, como paja de trigo, madera y desechos sólidos. Estos pueden evitar muchos de los problemas que enfrentan los de primera generación al producir biocombustibles a partir de residuos agrícolas y forestales en lugar de reservas de alimentos. Sin embargo, la falta de materiales disponibles para la producción de biodiésel en muchos países es una limitante. En contraste, el biodiésel obtenido a partir de fuentes no comestibles y no agrícolas se clasifican como tercera generación, siendo las microalgas una de las mejores opciones para su producción. Muchas especies de microalgas muestran potencial de altos rendimientos y la capacidad de crecer en tierras no cultivables (Islam et al., 2017). Además, los cultivos de microalgas pueden realizarse con aguas residuales, brindan la ventaja de usar nutrientes que pueden causar eutrofización y las microalgas actúan como elementos de biodepuración (Chisti, 2007).

La utilización de microalgas para la generación de biodiésel presenta ventajas tales como un alto contenido lipídico en su estructura, su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, su rápida generación de biomasa, capacidad de fijar CO₂, su utilidad en el tratamiento de aguas residuales y el hecho de que no compite por suelos cultivables ni con alimentos. Sin embargo, es necesario volver técnica y económicamente viable la producción, con la mejora de ciertos aspectos del proceso, como aumentar la productividad de biomasa microalgal con el mayor contenido de lípidos del perfil adecuado, diseñar biorreactores que ofrezcan costos de inversión y de operación competitivos, diseñar nuevos procesos para

la generación de co-productos de alto valor agregado, por mencionar algunos (Fernández-Linares et al., 2012; Hassan y Kalam, 2013; Mahmoud et al., 2015; Chen et al., 2018).

El término microalgas engloba un grupo muy diverso de microorganismos fotosintéticos unicelulares, procariotas (cianobacterias) y eucariotas, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en ambientes húmedos, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes. Algunos autores sostienen que existen unas 40,000 especies de microalgas, mientras que otros hablan de 100,000 tipologías, de las cuales se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Aproximadamente el 80% de la producción industrial actual de microalgas, está basada en el cultivo de únicamente 3 a 5 especies (Muriana, 2016).

Entre la vasta diversidad de microalgas, solo unos pocos miles de especies se mantienen en todo el mundo en colecciones de cultivos de microalgas y solo unos cientos han sido investigados (Olaizola, 2003). Por lo que el aislamiento y la caracterización de nuevas especies de microalgas debe ser un esfuerzo continuo para detectar especies con potencial para la producción de biodiésel (Hu et al., 2008).

En la península de Baja California, se han llevado a cabo estudios de microalgas endémicas, los cuales brindan el perfil de ácidos grasos (Correa-Reyes et al., 2009; Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra, 2016). Estos estudios son importantes como un primer paso para seleccionar aquellas especies de microalgas que cuenten con altos contenidos de lípidos y perfiles adecuados de ácidos grasos para la producción de biodiésel (Greenwell et al., 2010). Además, es posible aprovechar la capacidad de adaptabilidad de las microalgas, modificando la concentración y composición de lípidos mediante la optimización de variables ambientales que incrementarán los indicadores de crecimiento (Brennan y Owende, 2010). En condiciones óptimas de crecimiento, se producen grandes cantidades de biomasa microalgal, pero con contenidos lipídicos relativamente bajos. En contraste, bajo condiciones ambientales desfavorables o de estrés, muchas microalgas alteran sus rutas biosintéticas de lípidos hacia la formación y acumulación de lípidos neutros, principalmente en forma de triglicéridos, lo que permite que las microalgas puedan soportar estas condiciones adversas. Los principales estímulos químicos son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y sílice), la salinidad, el pH del medio de cultivo, y los estímulos físicos como la temperatura, composición espectral de la luz e irradiancia (Cobos-Ruiz et al., 2015).

La selección de estímulos por medio de variables ambientales influirá en la síntesis y acumulación de lípidos y productos de alto valor por parte de microalgas, por lo tanto, es importante el desarrollar diversas

estrategias de inducción por estrés para manipular y optimizar los procesos de cultivo para mejorar la eficiencia de la bioproducción (Chen et al., 2017).

Los lípidos producidos por las microalgas determinan las propiedades químicas del biodiésel, siendo los lípidos saturados aquellos con mejores resultados. El número de cetanos, medida de la calidad de encendido del combustible según el retraso de encendido en un motor, es una de las propiedades más importantes a determinar en la calidad de un combustible, cuanto mayor sea el valor, el biodiésel será de mejor calidad, además de que se disminuyen las emisiones de óxidos de nitrógeno (Conley, 2012).

1.1 Antecedentes

La bioprospección se define como una exploración de recursos bioquímicos económicamente valiosos de la naturaleza a través de una búsqueda sistemática y organizada de organismos ricos en dicho contenido (Santhakumaran et al., 2019).

Estudios referentes a la bioprospección de especies para la producción de biodiésel han sido realizados, los cuales se centran en el aislamiento y la identificación de especies de algas capaces de producir una cantidad sustancial de lípidos, con una tasa de crecimiento rápida y tolerancia a las condiciones ambientales (Ratha y Prasanna, 2012).

Alam et al. (2019) reportaron el aislamiento, identificación y caracterización de 32 especies de microalgas de diferentes hábitats con distintas características físico-químicas, en este estudio los cultivos fueron expuestos a tres diferentes temperaturas (12, 20 y 35 °C) con el fin de evaluar su efecto en el crecimiento, producción de biomasa y lípidos. Las respuestas a la temperatura variaron para cada especie, pero en general, la temperatura óptima fue la de 20 °C.

Las algas oleaginosas producen solo pequeñas cantidades de triacilglicérido (TAG) en condiciones óptimas de crecimiento o condiciones ambientales favorables. El interés en las microalgas para la producción de biodiésel se debe al alto contenido de lípidos de algunas especies, y al hecho de que la síntesis de lípidos, especialmente de los TAG no polares, que son el mejor sustrato para producir biodiesel, puede ser modulada por condiciones de crecimiento variables. Una opción para mejorar el flujo metabólico en la biosíntesis de lípidos, es aplicar estrés fisiológico y producir biodiésel a partir de microalgas que acumulan

grandes cantidades de lípidos (Ratha y Prasanna, 2012). Dichas inducciones se presentan al cultivar las microalgas en condiciones de estrés de irradiancia, espectros de luz, ciclos luz-obscuridad, nutrientes, temperatura, pH y salinidad.

Han sido realizados numerosos estudios que prueban que cultivos en condiciones de estrés modifican el crecimiento y composición de las microalgas, lo cual puede producir beneficios en la producción de biodiésel o algún otro producto de interés (Nagappan et al., 2019; Poh et al., 2020).

Se ha encontrado que la irradiancia tiene un efecto en la composición de diversas especies de microalgas, la producción de los lípidos y ácidos grasos útiles para la producción de biodiésel se mejora en irradiancias medias-altas, que van desde los 100 hasta los 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (He et al., 2015; Kim et al., 2019).

En cuanto al efecto de la luz en los cultivos de microalgas, no solo la irradiancia es importante, indicadores como las longitudes de onda y los fotoperiodos luz-obscuridad han sido estudiados (Sirisuk et al., 2018). Hultberg et al. (2014) realizaron un estudio con la clorofita *Chlorella vulgaris* la cual fue expuesta a luz monocromática a seis diferentes longitudes de onda con el objetivo de estudiar su efecto en la producción de biomasa y el contenido de ácidos grasos, siendo los tratamientos con luz amarilla y blanca aquellos que presentaron los mayores valores.

La composición del medio y la concentración de los nutrientes son importantes en los cultivos de microalgas, la adecuada elección de estas variables puede beneficiar el crecimiento y composición bioquímica, incremento en la productividad de biomasa y lípidos (Araujo et al., 2011). Por ejemplo, en estudios con nitrógeno, en algunas especies de microalgas se ha encontrado que una menor concentración de nitrógeno favorece la producción de lípidos y tiende a disminuir el grado de insaturación de estos (Zhu et al., 2014; Yodsuan et al., 2017). Qari y Oves (2020) reportaron un aumento en la cantidad de ácidos grasos saturados y monosaturados al cultivar el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* en medio limitado de fosfato.

Los estudios de cultivos bajo condiciones de estrés se han realizado al considerar uno o varios factores. El efecto combinado de alta irradiancia y la limitación de nitrógeno en cultivos de diversas especies de microalgas ha sido evaluado, estos trabajos reportan que dichas variables causan un efecto que promueve un aumento en el crecimiento y la biosíntesis de lípidos en las células de microalgas. Sin embargo, es importante realizar estudios en cada especie de microalga, ya que se ha observado una respuesta especie específica a las diversas variables ambientales. En los estudios de Yuan et al. (2019) y Ho et al. (2012),

trabajaron con microalgas de la clase *Chlorophyceae* que en principio comparten una variedad de características, no obstante, al ser inducidas a distintas condiciones de cultivo mostraron diferencias, *Scenedesmus obliquus* presentó mejores resultados en cuanto a crecimiento y contenido de lípidos en $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; mientras que para *Dunaliella salina* una irradiancia de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentó mejores resultados en crecimiento y con $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtuvo alto contenido de lípidos.

El efecto de la salinidad ha sido reportado en microalgas marinas y algunas especies dulceacuícolas. Pandit et al. (2017) cultivaron *Chlorella vulgaris* y *Acutodesmus obliquus* en condiciones de estrés por salinidad, con este estudio demostraron que hay un incremento en el contenido de lípidos y mejora en la composición de ácidos grasos al incrementar los saturados, este incremento impacta de manera positiva las propiedades del biodiesel, tal como reportan los autores, donde a mayor salinidad obtuvieron un mayor número de cetanos; siendo todas ellas características buscadas en la producción de biodiesel. Por otra parte Huang et al. (2019), realizaron cultivos en medios definidos ricos en nitrógeno y experimentaron con variaciones de salinidad y fuentes de nitrógeno para promover el crecimiento celular. Se ha reportado que inducir cultivos de microalgas a estrés por salinidad conlleva a un incremento en la producción de lípidos, sin embargo esta misma salinidad puede afectar el crecimiento y disminuir la producción de biomasa, por lo que el proceso de dos fases ha sido un método implementado para incrementar tanto el contenido de lípidos como el de biomasa, siendo considerado un método potencial para mejorar la producción de biodiésel (Pancha et al., 2015; Wang et al., 2016; Nagappan et al., 2019).

El proceso de cultivo en dos fases o etapas es un método ya estudiado que permite el aumento del contenido de lípidos disminuyendo los efectos negativos en el crecimiento celular. La primera implica el cultivo de células de microalgas en condiciones de nutrientes suficientes para estimular un mayor crecimiento; luego las células se exponen a factores de estrés para la acumulación de lípidos (Mathimani et al., 2018). Gour et al. (2020) realizaron un estudio que tuvo como objetivo poner a prueba el proceso de cultivo en dos etapas y optimizar el estrés por salinidad en los medios de cultivo para un crecimiento máximo, acumulación de biomasa y productividad de lípidos de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., obteniendo el mayor contenido de lípidos a 0.16 M de NaCl. Por su parte, Sukačová et al. (2020) tuvieron como objetivo identificar las condiciones óptimas de cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* para maximizar el crecimiento y producción de lípidos, pero además reportaron al desarrollo de una estrategia de cultivo bifásico aplicable al proceso de cultivo sin la necesidad de la recolección de células entre la primera y la segunda fase de cultivo. Mientras que Anand et al. (2019) realizaron cultivos de dos etapas de *Scenedesmus vacuolatus* expuestos a distintas concentraciones de tres diferentes sales (cloruro de sodio, cloruro de magnesio y cloruro de calcio), donde evaluaron la tasa de crecimiento, contenido de pigmento,

acumulación de cuerpos lipídicos y perfil de ácidos grasos. Las condiciones óptimas de cultivo que promuevan el crecimiento y producción de lípidos dependen de cada especie, pero el uso del método de dos fases con estrés por salinidad se ha reportado con resultados favorables en el cultivo de microalgas con potencial para la producción de biodiesel.

1.2 Justificación

El uso intensivo de fuentes no renovables y debido a la demanda de energía a gran escala, ha aumentado la amenaza de crisis energéticas mundiales, incluso se estima que, para 2050, la mayor parte de las reservas de combustibles fósiles se agotarán. El uso de combustibles fósiles genera problemas ambientales causados por la emisión de gases de efecto invernadero (GEI). La producción de biodiésel a partir de microalgas se presenta como una alternativa para reducir las emisiones de GEI y satisfacer las crecientes demandas de energía (Mandotra et al., 2016). Las ventajas más evidentes del biodiésel es que se trata de una sustancia biodegradable, no explosiva, no inflamable, renovable, no tóxica, cuya combustión genera bajos niveles de emisiones en gases de efecto invernadero como CO₂, NO_x, SO_x y material particulado (MP), reduce las emisiones de partículas sólidas menores a 10 micrones (PM10), monóxido de carbono (CO) y óxidos de azufre (SO_x), peligrosos agentes contaminantes. Ya que, al ser un combustible oxigenado, el biodiésel tiene una combustión más completa que el diésel, mejorando por eso la composición de las emisiones (Llanes-Cedeño et al., 2017).

La bioprospección de especies de microalgas es importante para seleccionar aquellas con las cuales se logre optimizar la producción de biodiésel, esto por medio del estudio de especies que crezcan rápidamente y produzcan alta cantidad de biomasa y tengan niveles elevados de los compuestos de interés. Diversos estudios han reportado especies de microalgas potenciales para la producción de biodiésel, sin embargo, deben ser realizados más trabajos ya que se ha observado una respuesta especie específica (Araujo et al., 2011; Nascimento et al., 2013; Lee et al., 2014; Cobos et al., 2017). La realización de este trabajo, dará información del potencial de producción de biodiesel con microalgas de la península de Baja California.

1.3 Hipótesis

Las microalgas expuesta a una alta irradiancia y salinidad incrementarán la producción de lípidos y la síntesis de ácidos grasos saturados.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Bioprospección de especies de microalgas con alto contenido de lípidos y ácidos grasos saturados para la producción de biodiésel.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la producción de biomasa y composición proximal de diez especies de microalgas mantenidas en condiciones de cultivo.
- Medir el perfil de ácidos grasos de las especies de microalgas y seleccionar la que presente mejores características para la producción de biodiésel.
- Con la especie de microalga seleccionada evaluar la inducción de la sobreproducción de lípidos y ácidos grasos saturados mediante variaciones en la salinidad.
- Evaluar la calidad del biodiésel producido con la especie de microalga inducida a la sobreproducción mediante el efecto de la salinidad.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Selección de especies

Fueron seleccionadas 10 cepas de microalgas de la colección del Laboratorio de Biotecnología de algas del CICESE (Tabla 1). Para su selección se realizó una revisión de la literatura, teniendo como consideraciones el crecimiento, composición proximal con mayor proporción de lípidos y perfil de ácidos grasos, se buscaron aquellas especies con mayor cantidad de ácidos grasos saturados.

Tabla 1. Especies de microalgas seleccionadas para los ensayos de caracterización.

Clase	Especie
Bacillariophyceae	<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)
Bacillariophyceae	<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)
Chlorodendrophyceae	<i>Tetraselmis suecica</i>
Chlorophyceae	<i>Chlorella autotrophica</i>
Chlorophyceae	<i>Dunaliella bardawil</i>
Cyanophyceae	<i>Aphanocapsa marina</i>
Cyanophyceae	<i>Geitlerinema lemermanii</i>
Cyanophyceae	<i>Komvophoron</i> sp.
Cyanophyceae	<i>Phormidium</i> sp.
Xanthophyceae	<i>Heterococcus</i> sp.

2.2 Mantenimiento de cepas

Las cepas de las especies de microalgas con las que se trabajó en los ensayos se mantuvieron en el Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE. Para los cultivos se utilizaron sistemas por lotes, mono-específicos, no axénicos en matraz Erlenmeyer de 150 ml con 100 ml de medio "F" (Guillard y Ryther, 1962). Las condiciones ambientales de mantenimiento fueron una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, iluminación continua y temperatura de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. El agua utilizada para preparar el medio de cultivo fue agua de mar o bien agua dulce de la tubería de uso doméstico, esto en dependencia de las características de cada especie. Para el mantenimiento de las cepas, se realizó un recambio de medio, al usar un 10% a 20% del volumen del cultivo como inóculo, esto en dependencia de las características de crecimiento de cada especie.

2.3 Cultivo masivo de diez especies

Se realizaron cultivos monoespecíficos, no axénicos y en sistemas por lotes para cada una de las especies de microalgas seleccionadas. Los cultivos se realizaron por triplicado en matraz Fernbach de 1 L con 800 ml de medio "F" (Guillard y Ryther, 1962), los cuales fueron previamente esterilizados en una autoclave a 121 °C y 1.05 kg m⁻² de presión. Los cultivos se mantuvieron en el Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE, y las condiciones de mantenimiento fueron una irradiancia 200 μmol m⁻² s⁻¹ provista por luz blanca fluorescente (General Electric® F40D-EX), temperatura de 20 ± 1 °C y agitación manual diaria.

2.4 Evaluación de la biomasa

Se evaluó la producción de biomasa celular de cada cultivo en fase estacionaria con la finalidad de comparar las características de crecimiento de cada especie de microalga.

2.4.1 Conteo y tamaño celular

Para cada cultivo se tomó diariamente una alícuota de 3 ml para la medición de densidad óptica (DO) a 680 nm en un espectrofotómetro Hach modelo 6000, y para la medición de pH con un potenciómetro OHAUS® Starter 3000, las mediciones se realizaron hasta el día en que se cultivó cada especie.

Con los datos de DO, fueron realizadas las curvas de crecimiento, además, se calculó la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (Tg) de cada especie al utilizar las ecuaciones (1) y (2) propuestas por Fogg y Thake (1987):

$$\mu = \frac{\log_2(N_2) - \log_2(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$Tg = \frac{1}{\mu} \quad (2)$$

En donde N_1 y N_2 fueron el número de células en el día inicial (t_1) y en el día final (t_2), respectivamente.

Para el conteo de células fueron tomadas alícuotas de 1 ml de cada cultivo al inicio (día 0) y al día de la cosecha y que correspondió al día 6, 8 o 10, basado en el alcance de la fase estacionaria de la curva de crecimiento de cada especie. Las muestras colectadas para conteo y medición del tamaño de las células fueron preservadas con Lügol. El conteo de las células se realizó con un hematocitómetro de 0.1 mm y un microscopio compuesto Olympus CX31. La medición del tamaño celular se efectuó con la ayuda de una cámara Evolution MP Color y el software Imagine Pro Discovery versión 5.1, con objetivo de 40x de un microscopio compuesto Olympus CX31.

2.4.2 Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico

Se siguió la metodología propuesta por Sorokin (1973) y se calculó el peso seco total, cenizas y peso seco orgánico. Se tomaron 15 ml de cada cultivo y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio de 47 mm previamente pesados (Whatman GF/C y de 1 μm de abertura de poro). Para obtener el peso seco total, los filtros se mantuvieron en estufa a 60 °C hasta alcanzar un peso constante. El contenido de cenizas se cuantificó al evaluar después de incinerar el filtro con la muestra en una mufla a 470 °C por 4 h. El peso seco orgánico se obtuvo por la diferencia entre los valores de peso seco total y el peso de las cenizas. Los pesos fueron evaluados con una balanza analítica (Mettler Toledo XS105), por triplicado o hasta alcanzar un peso constante por filtro.

$$\text{Peso seco total} = \text{Peso seco del filtro} + \text{Muestra} \quad (3)$$

$$\text{Peso de cenizas} = \text{Peso después de incinerar muestra} - \text{Peso del filtro} \quad (4)$$

$$\text{Peso seco orgánico} = \text{Peso seco total} - \text{Cenizas} \quad (5)$$

2.4.3 Pigmentos

Los pigmentos se estimaron por medio del filtrado de 5 ml de muestra a través de filtros de fibra de vidrio de 25 mm (Whatman GF/C y de 1 μm de abertura de poro). Para el cálculo de pigmentos se utilizó 7 ml de acetona al 90%, siguiendo el procedimiento descrito por Parsons et al. (1984) basado en técnicas espectrofotométricas. Para la cuantificación de los pigmentos se utilizó el espectrofotómetro Hach modelo 6000.

2.4.4 Fotosíntesis

Se midió la fotosíntesis con un fluorímetro de pulso de amplitud modulada (Junior PAM Walz), con la finalidad de conocer la respuesta de cada especie a la irradiancia.

Para la realización de curvas de fotosíntesis se tomaron 15 ml de cada cultivo. La muestra se mantuvo en obscuridad por 15 min. Se colocó la fibra óptica para la medición en los tubos con la muestra y se ajustaron los parámetros de f_t (intensidad de la señal a través de la fibra), el tiempo entre mediciones y la ganancia en el software del Junior PAM para proceder con las mediciones. Con el equipo se obtuvieron las curvas de luz para cada especie y en base a éstas se realizó el cálculo de los indicadores fotosintéticos: máxima tasa de transporte de electrones ($ETR_{máx}$), eficiencia fotosintética (α), irradiancia de saturación lumínica (E_k) y máxima producción fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m) a partir del cálculo de absorbancia con el uso del programa Solver (López-Figueroa com. Personal, 2018) y al seguir el método de Eilers y Peeters (1988). Para los cálculos de los indicadores fotosintéticos fue necesario evaluar la absorbancia de las células de cada cultivo, para lo cual se realizó un espectro de absorción *in vivo* en un intervalo de 350 a 750 nm con un espectrofotómetro Hach modelo 6000.

2.4.5 Composición proximal

Por medio de métodos espectrofotométricos se evaluó el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos. Para lo cual fueron tomados 10 ml de cada cultivo en fase estacionaria, filtrados a través de filtros de fibra de vidrio de 25 mm (Whatman GF/C y de 1 μ m de abertura de poro), los cuales se lavaron con agua destilada. Los filtros se almacenaron en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su análisis.

2.4.5.1 Carbohidratos

Para la evaluación de carbohidratos se utilizó ácido sulfúrico para la extracción, siguiendo el método descrito por Whyte (1987). La cuantificación se realizó con fenol de acuerdo a lo descrito por Dubois et al. (1956) y Malara y Charra (1972a). Se construyó una curva de calibración con glucosa (99%).

2.4.5.2 Proteínas

Las proteínas fueron extraídas siguiendo el método de Malara y Charra (1972b), utilizando hidróxido de sodio (NaOH) en distintas concentraciones, con 100 °C de incubación y distintos tiempos, esto dependiendo de la microalga (Tabla 2). La cuantificación se realizó con el reactivo Folin-Ciocalteu según el método de Lowry et al. (1951). La construcción de la curva de calibración fue con albumina de bovino (98%).

Tabla 2. Condiciones de extracción de proteínas para cada especie de microalga.

Especie	NaOH	Tiempo (min)
Bacillariophyceae		
<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)	0.2	20
<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)	0.2	20
Chlorodendrophyceae		
<i>Tetraselmis suecica</i>	0.1	10
Chlorophyceae		
<i>Chlorella autotrophica</i>	1.0	60
<i>Dunaliella bardawil</i>	0.1	60
Cyanophyceae		
<i>Aphanocapsa marina</i>	0.2	20
<i>Geitlerinema lemermanii</i>	0.2	20
<i>Komvophoron</i> sp.	0.2	20
<i>Phormidium</i> sp.	0.2	20
Xanthophyceae		
<i>Heterococcus</i> sp.	0.1	10

2.4.5.3 Lípidos

Los lípidos se extrajeron con una mezcla de cloroformo-metanol-agua, siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959), y la cuantificación de lípidos se realizó por el método de Pande et al. (1963). La construcción de la curva de calibración fue con tripalmitina (99%).

2.4.6 Perfil de ácidos grasos

Durante la fase estacionaria del crecimiento, se tomó una alícuota de cada cultivo. Se concentró la biomasa de células por medio de una centrifuga Eppendorf 5810R a 4 °C y 4000 rpm por 10 min. El paquete de la

biomasa de células se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta realizar la liofilización a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.11 kg cm^2 de presión con un liofilizador Labconco modelo 6.0.

Se pesaron alícuotas de 50 mg de biomasa liofilizada en viales ámbar de 5 ml previamente lavados con detergente Alconox® y calcinados en una mufla a $470\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde se realizó la extracción de lípidos por el método de Folch et al. (1957), utilizando una solución de diclorometano-metanol (2:1) más BHT (Butilhidroxitolueno) al 0.01%.

La saponificación de los lípidos se realizó con una solución de 0.3 N de KOH metanólico al 90%, una vez agregada la solución se dejó en baño maría por 30 minutos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando las muestras se encontraron a temperatura ambiente, se adicionaron 600 μl de agua y 400 μl hexano, para la extracción de los lípidos insaponificables, los cuales se presentaban en la capa superior de la muestra. La muestra colectada se acidificó con HCl 6N y se agregó hexano para la separación de los lípidos saponificables.

La metilación de las muestras se realizó por el método de Metcalfe et al. (1966) y la composición de los ácidos grasos se analizó con un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A), con una columna capilar (Agilent J&W GC Columns, 123-3232 DB-FFAP de 30 m de longitud por $320\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro, y grosor de la película de $0.25\text{ }\mu\text{m}$), y un detector de flama ionizado, como gas de acarreo se utilizó hidrógeno. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 μl , con concentración de 10 mg ml^{-1} . La temperatura inicial del horno fue de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, se aumentó hasta llegar a $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($9\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$), posteriormente se incrementó la temperatura hasta $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) donde se mantuvo por 4 min. La identificación de los ácidos grasos se realizó por la comparación de los tiempos de retención con los del estándar, 37 “Component Supelco® FAME Mix SIGMA”. Las cantidades de ácidos grasos de las muestras se calcularon por medio del programa MATLAB®.

Además, fueron calculadas las proporciones de ácidos grasos saturados e insaturados (RSU), así como de la proporción de ácidos grasos insaturados (RU), esto de acuerdo a las ecuaciones (6) y (7) propuestas por Sánchez-Saavedra y Castro-Ochoa (2020).

$$\text{RSU} = \frac{\sum \text{SFA}}{\sum \text{MUFA} + \sum \text{PUFA}} \quad (6)$$

$$\text{RU} = \frac{\sum \text{MUFA}}{\sum \text{PUFA}} \quad (7)$$

Donde SFA corresponde a los ácidos grasos saturados, MUFA a los ácidos grasos monosaturados y PUFA a los ácidos grasos poliinsaturados.

2.5 Índices de calidad

Se evaluó la productividad en contenido de peso y de lípidos de cada especie de microalga. Así como las propiedades del biodiesel mediante el cálculo del índice de saponificación, índice de yodo y número de cetanos.

2.5.1 Productividad

La productividad se determinó con respecto a biomasa y lípidos en cada una de las especies de microalgas. Para la productividad de biomasa el cálculo se realizó relacionando la concentración celular y el peso seco total por día. Mientras que la productividad de lípidos se calculó con la relación de productividad de biomasa y el contenido lipídico. Siendo utilizadas las siguientes ecuaciones:

$$\text{Productividad de biomasa} = \text{Tasa de crecimiento (1 día}^{-1}\text{)} \times \text{Peso (g L}^{-1}\text{)} \quad (8)$$

$$\text{Productividad de lípidos} = \text{Tasa de crecimiento (1 día}^{-1}\text{)} \times \text{Lípidos (g L}^{-1}\text{)} \quad (9)$$

2.5.2 Propiedades del biodiésel

Para la evaluación de las propiedades del biodiesel fue utilizado el perfil de ácidos grasos de cada especie de microalga, con lo cual se calculó el índice de saponificación (SV), índice de yodo (IV) y número de cetanos (CN), con las ecuaciones descritas por Gopinath et al. (2009):

$$SV = \sum \frac{560 \times F}{MW} \quad (10)$$

$$IV = \sum \frac{254 \times F \times D}{MW} \quad (11)$$

$$CN = \left(46.3 + \frac{5458}{SV} \right) - (0.225 \times IV) \quad (12)$$

Donde F indica el porcentaje de cada ácido graso, MW corresponde a la masa molecular del ácido graso (gramos mol⁻¹) y D es el número de dobles enlaces.

2.6 Sobreproducción de lípidos y ácidos grasos

Fue seleccionada una especie de microalga del total evaluadas como se ha descrito en la sección 2.3. El criterio para seleccionar la especie para inducir a la sobreproducción de lípidos fue con base en la que obtuvo los mayores valores de tasa de crecimiento, mayor fotosíntesis, mayor proporción de lípidos y perfil de ácidos grasos con mayor proporción de ácidos grasos saturados, mayor productividad y mayor valor en el número de cetanos.

La especie de microalgas seleccionada se llevó a un proceso de cultivo de dos fases. En la primera fase, se promovió el crecimiento celular al tener los cultivos en las condiciones descritas en la sección 2.3, esta primera fase se mantuvo durante 3 días, tiempo en que la especie de microalga alcanza la fase estacionaria de cultivo. En la segunda fase, la especie de microalga se mantuvo en distintas concentraciones de salinidad para inducir la sobreproducción de lípidos y ácidos grasos saturados. A los cultivos se les suministro, por triplicado, cloruro de sodio (NaCl) en una concentración de 0, 15 y 30 g L⁻¹, que en molaridad corresponden a 0, 0.21 y 0.41 M.

2.6.1 Evaluación de la sobreproducción de lípidos y ácidos grasos

Para cada condición de cultivo experimental se realizó la cosecha de biomasa en días alternos a partir de la segunda fase de cultivo, de la cual se evaluó el conteo del número de células, tamaño celular, la tasa de crecimiento, peso seco total, cenizas y peso seco orgánico, pigmentos, fotosíntesis, composición proximal, perfil de ácidos grasos, productividad y propiedades del biodiésel, por medio de las metodologías descritas en las secciones 2.4 a 2.5.

2.7 Análisis estadístico

Para todos los análisis se probaron las hipótesis que fundamentan la estadística paramétrica y que son la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas (Zar, 2010).

Se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para identificar las diferencias para cada una de las variables de respuesta, tasa de crecimiento, peso seco total, cenizas, peso seco orgánico, clorofila a, clorofila b, clorofila c, carotenoides, fotosíntesis (α , ETR_{max} , E_k y F_v/F_m), carbohidratos, proteínas, lípidos, perfil de ácidos grasos, productividad de biomasa y lípidos de las diez especies de microalgas evaluadas.

Se utilizó un ANOVA de una vía para evaluar el efecto de la salinidad para cada una de las variables de respuesta, concentración de células, tasa de crecimiento, tiempo de generación, tamaño celular, peso seco total, cenizas, peso seco orgánico, clorofila a, clorofila b, clorofila c, carotenoides, fotosíntesis (α , ETR_{max} , E_k y F_v/F_m), carbohidratos, proteínas, lípidos, perfil de ácidos grasos, productividad de biomasa y lípidos, así como propiedades del biodiesel de la especie de microalga evaluada.

Se consideró un nivel de confianza de 95%, y en caso de haber diferencias significativas se utilizó una prueba *a posteriori* de Tukey. Para el análisis de datos se utilizó el paquete de programas STATISTICA® versión 10 (StatSoft, 2015).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Evaluación de los cultivos de las diez especies

3.1.1 Crecimiento de las microalgas

Los valores de pH del medio de cultivo de las especies cultivadas en agua de dulce fueron mayores y con tendencia similar en el transcurso del tiempo, en comparación con aquellas especies que fueron mantenidas en agua de mar (Fig. 1).

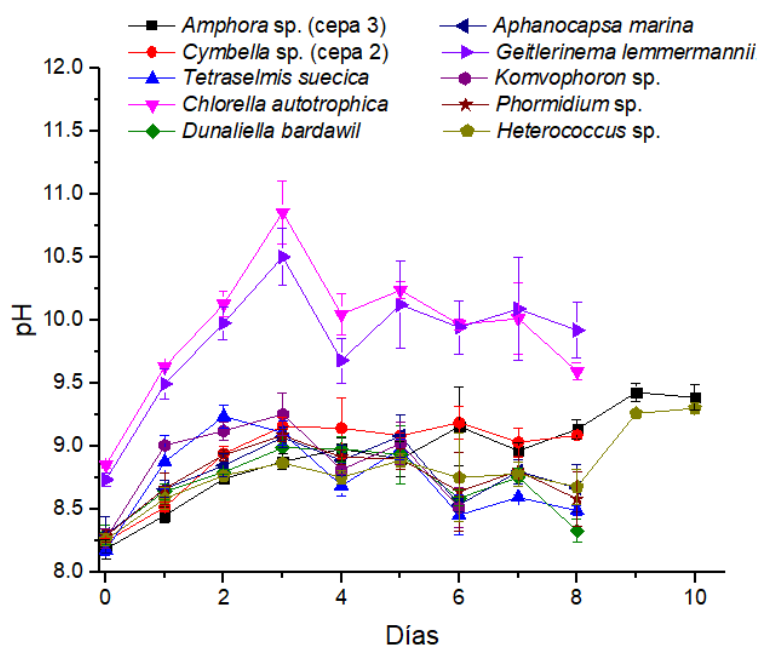


Figura 1. Valores promedio y desviación estándar de pH del medio de los cultivos de las diez especies de microalgas mantenidas en sistemas por lote. Especies marinas: *Amphora* sp., *Cymbella* sp., *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella bardawil*, *Aphanocapsa marina*, *Komvophoron* sp., *Phormidium* sp. y *Heterococcus* sp. Especies dulceacuícolas: *Chlorella autotrophica* y *Geitlerinema lemmermannii*.

Las curvas de crecimiento de las diez especies de microalgas y por clase taxonómica se muestran en la Fig. 2. La concentración inicial y final de células mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las especies (Tabla 3). Donde la especie *Aphanocapsa marina* fue la de mayor concentración de células.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la tasa de crecimiento evaluada para las diez especies. Las significativamente mayores tasas de crecimiento se presentaron con las especies de *Chlorella autotrophica* y *Geitlerinema lemmermannii* (Tabla 3).

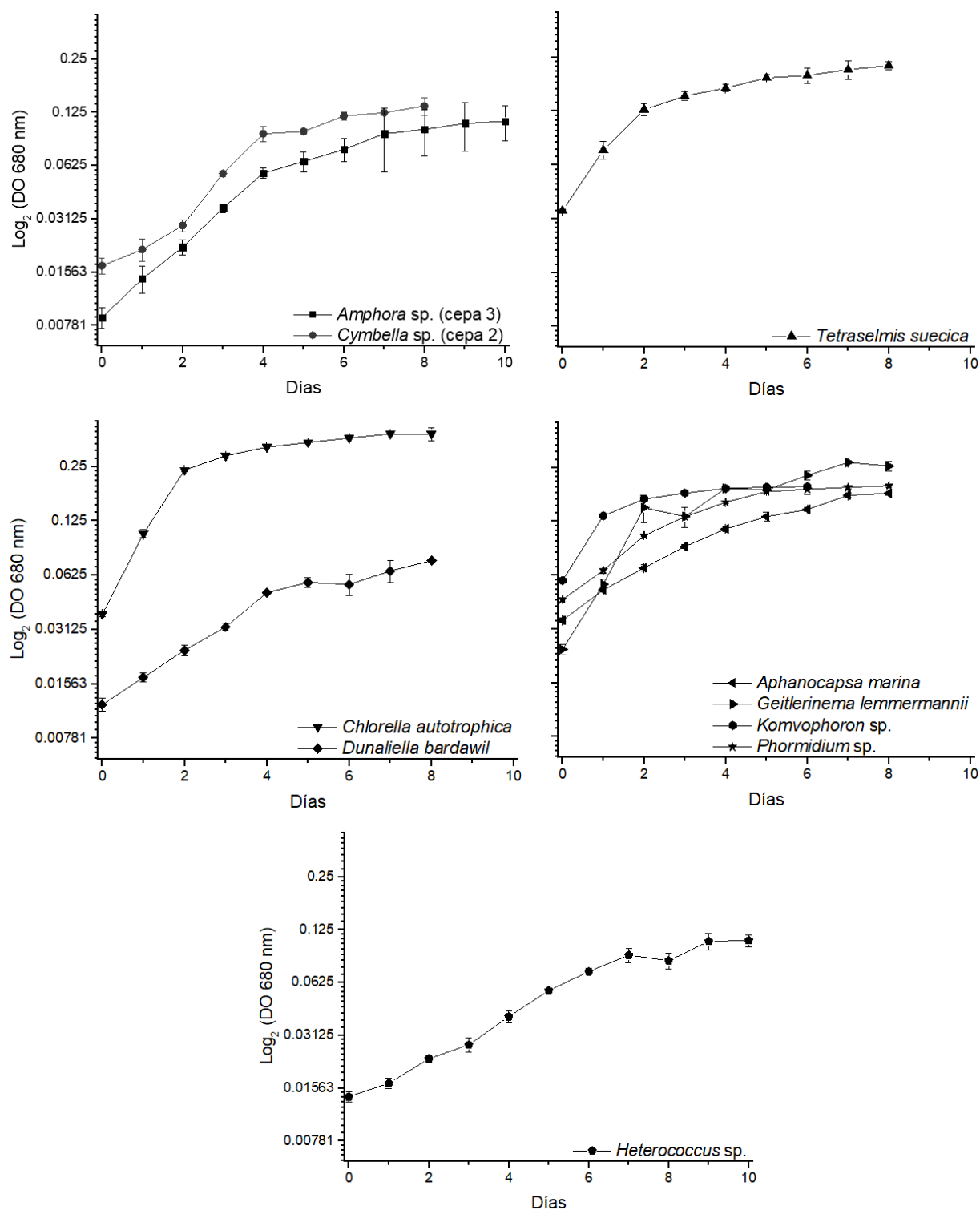


Figura 2. Valores promedio y desviación estándar de las curvas de crecimiento de diez especies de microalgas mantenidas en cultivos por lotes.

Los valores del tiempo de duplicación (T_g) mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las especies. Donde el valor mayor de T_g se presentó con *Aphanocapsa marina*, mientras que los significativamente menores se presentaron con *Chlorella autotrophica* y *Geitlerinema lemmermannii* (Tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar de los indicadores de crecimiento de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidos en sistemas por lotes. Concentración de células (CC: células ml⁻¹ x 10⁵), días en fase exponencial (DFE: días), tasa de crecimiento (μ : divisiones día⁻¹) y tiempo de generación (Tg: días).

Especie	CC Inicial	CC Final	DFE	μ	Tg
Bacillariophyceae					
<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)	0.51 ± 0.01 d	27.96 ± 4.39 b	7	0.48 ± 0.09 def	2.12 ± 0.39 c
<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)	1.41 ± 0.05 d	33.33 ± 2.61 b	4	0.62 ± 0.05 c	1.62 ± 0.12 de
Chlorodendrophyceae					
<i>Tetraselmis suecica</i>	0.74 ± 0.07 d	6.05 ± 1.18 b	2	0.94 ± 0.05 b	1.07 ± 0.05 fg
Chlorophyceae					
<i>Chlorella autotrophica</i>	8.09 ± 0.64 b	71.42 ± 8.63 b	2	1.33 ± 0.01 a	0.75 ± 0.00 g
<i>Dunaliella bardawil</i>	0.32 ± 0.03 d	2.12 ± 0.05 b	4	0.52 ± 0.03 de	1.95 ± 0.13 cd
Cyanophyceae					
<i>Aphanocapsa marina</i>	27.73 ± 1.75 a	577.20 ± 77.44 a	7	0.33 ± 0.01 f	3.02 ± 0.04 a
<i>Geitlerinema lemermanii</i>	1.03 ± 0.30 d	23.43 ± 0.24 b	2	1.31 ± 0.15 a	0.77 ± 0.08 g
<i>Komvophoron</i> sp.	3.38 ± 0.15 c	21.22 ± 0.72 b	2	0.76 ± 0.01 cd	1.32 ± 0.02 ef
<i>Phormidium</i> sp.	1.37 ± 0.19 d	9.62 ± 1.67 b	4	0.45 ± 0.01 def	2.21 ± 0.04 bc
Xanthophyceae					
<i>Heterococcus</i> sp.	0.19 ± 0.03 d	0.64 ± 0.05 b	7	0.38 ± 0.03 ef	2.63 ± 0.22 ab

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d>e>f>g.

En la Tabla 4 se presentan los valores promedio de la medición inicial y final de 30 células de cada cultivo mantenido en lotes. Siendo *Heterococcus* sp. la de mayor tamaño celular inicial y final, además fue esta misma especie la que presentó la mayor diferencia de tamaño entre el inicio y final del experimento. Mientras que la especie de menor tamaño fue *Aphanocapsa marina*, que presentó un tamaño no mayor a 1 μ m.

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar de la medición celular inicial y final (μm) de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidos en sistemas por lotes.

Especie	Tamaño Celular Inicial				Tamaño Celular Final			
	Diámetro	Largo	Ancho	Longitud (Filamento)	Diámetro	Largo	Ancho	Longitud (Filamento)
Bacillariophyceae								
<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)		7.56 \pm 0.25	3.38 \pm 0.13			6.12 \pm 0.27	2.92 \pm 0.12	
<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)		12.34 \pm 0.16	3.38 \pm 0.11			10.63 \pm 0.50	3.02 \pm 0.21	
Chlorodendrophyceae								
<i>Tetraselmis suecica</i>		11.42 \pm 0.17	7.82 \pm 0.74			12.96 \pm 0.74	8.30 \pm 0.62	
Chlorophyceae								
<i>Chlorella autotrophica</i>	3.51 \pm 0.06				4.63 \pm 0.44			
<i>Dunaliella bardawil</i>	9.83 \pm 0.66				11.26 \pm 0.98			
Cyanophyceae								
<i>Aphanocapsa marina</i>	0.99 \pm 0.06				0.89 \pm 0.04			
<i>Geitlerinema lemermanii</i>				109.01 \pm 7.67				93.24 \pm 10.35
<i>Komvophoron</i> sp.		1.38 \pm 0.08	1.55 \pm 0.08	58.74 \pm 3.54		1.33 \pm 0.07	1.34 \pm 0.24	85.24 \pm 8.29
<i>Phormidium</i> sp.		1.06 \pm 0.03	2.21 \pm 0.12	71.69 \pm 1.85		1.13 \pm 0.07	2.07 \pm 0.26	89.34 \pm 4.81
Xanthophyceae								
<i>Heterococcus</i> sp.		52.91 \pm 7.90	34.90 \pm 4.83			94.38 \pm 12.45	54.34 \pm 15.13	

3.1.2 Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico

El peso seco total ($p < 0.05$), peso de cenizas ($p < 0.05$) y peso seco orgánico ($p < 0.05$) mostraron diferencias significativas entre las distintas especies (Tabla 5). Para peso seco total *Heterococcus* sp. fue la especie que presentó el mayor valor ($320.22 \pm 10.79 \text{ mg L}^{-1}$). Con respecto al peso de cenizas, fueron *Amphora* sp. (cepa 3) ($177.33 \pm 8.44 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), *Aphanocapsa marina* ($179.70 \pm 2.60 \text{ mg L}^{-1}$) y *Heterococcus* sp. ($198.07 \pm 12.83 \text{ mg L}^{-1}$), las que presentaron los mayores valores. Mientras que *Chlorella autotrophica* fue aquella especie con el valor mayor de peso seco orgánico ($160.81 \pm 3.75 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabla 5. Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico, en mg L^{-1} , de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas por lotes.

Especie	Peso Seco Total	Peso de Cenizas	Peso Seco Orgánico
Bacillariophyceae			
<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)	256.22 \pm 5.78 cde	177.33 \pm 8.44 a	80.52 \pm 3.88 g
<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)	262.00 \pm 18.51 bcd	176.37 \pm 12.90 ab	85.63 \pm 5.85 fg
Chlorodendrophyceae			
<i>Tetraselmis suecica</i>	275.44 \pm 7.22 bc	152.44 \pm 6.00 bc	124.44 \pm 2.44 c
Chlorophyceae			
<i>Chlorella autotrophica</i>	260.52 \pm 3.75 bcd	99.70 \pm 3.75 ef	160.81 \pm 3.75 a
<i>Dunaliella bardawil</i>	175.00 \pm 1.44 f	116.00 \pm 3.78 de	61.26 \pm 4.56 h
Cyanophyceae			
<i>Aphanocapsa marina</i>	288.44 \pm 5.61 b	179.70 \pm 2.60 a	108.74 \pm 3.53 cde
<i>Geitlerinema lemermanii</i>	225.22 \pm 11.57 e	80.67 \pm 10.44 f	143.78 \pm 1.82 b
<i>Komvophoron</i> sp.	234.15 \pm 18.10 de	136.30 \pm 11.89 cd	97.85 \pm 10.54 ef
<i>Phormidium</i> sp.	247.56 \pm 10.00 cde	144.22 \pm 3.11 c	106.00 \pm 8.29 de
Xanthophyceae			
<i>Heterococcus</i> sp.	320.22 \pm 10.79 a	198.07 \pm 12.83 a	122.15 \pm 6.03 cd

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde $a > b > c > d > e > f > g > h$.

3.1.3 Pigmentos

La concentración de pigmentos de las diez especies de microalgas se muestra en la Tabla 6. Donde se obtuvieron diferencias significativas para clorofila a (Chl-a) ($p < 0.05$), clorofila b (Chl-b) ($p < 0.05$), clorofila c (Chl-c) ($p < 0.05$) y carotenoides ($p < 0.05$). Para Chl-a, *Chlorella autotrophica* presentó el valor significativamente mayor ($961.47 \pm 67.35 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Con respecto a Chl-b, *Tetraselmis suecica* fue la especie con el valor significativamente mayor ($410.04 \pm 7.80 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). En el contenido de Chl-c, fueron dos especies

de microalgas las que presentaron los mayores valores y que correspondieron a *Amphora* sp. (cepa 3) ($69.33 \pm 6.82 \mu\text{g L}^{-1}$) y *Cymbella* sp. (cepa 2) ($93.13 \pm 28.48 \mu\text{g L}^{-1}$). Mientras que en el contenido de carotenoides, *Dunaliella bardawil* fue aquella con la mayor cantidad ($2244.76 \pm 71.11 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 6. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de pigmentos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas por lotes. Clorofila a (Chl-a), clorofila b (Chl-b), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (Car).

Especie	Chl-a	Chl-b	Chl-c	Car
Bacillariophyceae				
<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)	582.72 \pm 11.04 c	NC	69.33 \pm 6.82 a	245.40 \pm 17.64 c
<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)	597.14 \pm 37.47 c	NC	93.13 \pm 28.48 a	135.24 \pm 13.64 de
Chlorodendrophyceae				
<i>Tetraselmis suecica</i>	635.82 \pm 5.15 c	410.04 \pm 7.80 a	NC	538.57 \pm 1.94 b
Chlorophyceae				
<i>Chlorella autotrophica</i>	961.47 \pm 67.35 a	312.53 \pm 3.06 c	33.14 \pm 7.98 b	530.97 \pm 9.54 b
<i>Dunaliella bardawil</i>	354.08 \pm 22.19 e	87.17 \pm 16.71 d	25.71 \pm 4.68 b	2244.76 \pm 71.11 a
Cyanophyceae				
<i>Aphanocapsa marina</i>	166.24 \pm 6.74 g	NC	10.49 \pm 9.30 b	247.73 \pm 36.52 c
<i>Geitlerinema lemmermanii</i>	783.86 \pm 27.20 b	NC	34.59 \pm 21.21 b	215.46 \pm 3.95 c
<i>Komvophoron</i> sp.	238.75 \pm 21.28 fg	NC	10.625 \pm 6.79 b	87.06 \pm 1.79 e
<i>Phormidium</i> sp.	268.91 \pm 5.52 f	NC	21.69 \pm 7.63 b	183.01 \pm 12.32 cd
Xanthophyceae				
<i>Heterococcus</i> sp.	497.32 \pm 28.05 d	367.28 \pm 5.14 b	7.15 \pm 2.48 b	228.53 \pm 11.48 c

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d>e>f>g.

NC: No contiene este tipo de pigmento debido a las características del grupo.

3.1.4 Fotosíntesis

Los valores de los indicadores fotosintéticos se presentan en la tabla 7. Habiendo diferencias significativas en la pendiente inicial (α) ($p<0.05$), tasa de transporte de electrones (ETR_{max}) ($p<0.05$), irradiancia de saturación (E_k) ($p<0.05$) y eficiencia cuántica (F_v/F_m) ($p<0.05$). Los valores de α fueron mayores para la especie *Aphanocapsa marina*, mientras que los valores mayores de ETR_{max} y E_k se presentaron en *Komvophoron* sp. Finalmente el valor mayor de F_v/F_m se presentó *Heterococcus* sp. Es importante recalcar, que solo 3 especies (*Tetraselmis suecica*, *Chlorella autotrophica* y *Heterococcus* sp.) presentaron un valor óptimo de eficiencia cuántica.

Tabla 7. Indicadores fotosintéticos del día final de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes. Pendiente inicial (α); tasa de transporte de electrones (ETR_{max}), irradiancia de saturación (E_k) y eficiencia cuántica (F_v/F_m).

Especie	α	ETR_{max}	E_k	F_v/F_m
Bacillariophyceae				
<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)	0.001 ± 0.00 f	2.97 ± 2.33 f	2841.15 ± 1553.35 d	0.39 ± 0.02 c
<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)	0.002 ± 0.00 e	3.35 ± 1.26 f	2071.14 ± 900.53 d	0.47 ± 0.01 a
Chlorodendrophyceae				
<i>Tetraselmis suecica</i>	0.02 ± 0.00 c	98.79 ± 23.55 b	5889.18 ± 1581.95 c	0.50 ± 0.03 a
Chlorophyceae				
<i>Chlorella autotrophica</i>	0.04 ± 0.01 b	54.20 ± 23.04 c	1830.40 ± 1553.71 d	0.52 ± 0.06 a
<i>Dunaliella bardawil</i>	0.01 ± 0.00 d	6.06 ± 1.27 e	850.57 ± 309.30 d	0.40 ± 0.05 b
Cyanophyceae				
<i>Aphanocapsa marina</i>	0.07 ± 0.00 a	91.76 ± 5.44 b	1304.18 ± 70.18 d	0.24 ± 0.00 d
<i>Geitlerinema lemermanii</i>	0.02 ± 0.00 c	25.45 ± 0.64 d	1385.48 ± 64.87 d	0.17 ± 0.00 d
<i>Komvophoron</i> sp.	0.04 ± 0.00 b	590.36 ± 152.37 a	15405.62 ± 3731.46 a	0.21 ± 0.02 d
<i>Phormidium</i> sp.	0.01 ± 0.00 d	13.07 ± 1.56 e	1350.50 ± 215.00 d	0.20 ± 0.02 d
Xanthophyceae				
<i>Heterococcus</i> sp.	0.01 ± 0.00 d	3.93 ± 0.88 f	531.67 ± 39.19 d	0.53 ± 0.01 a

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde $a > b > c > d > e > f$.

3.1.5 Composición proximal

En el contenido de lípidos se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre especies, siendo el mayor valor para *Dunaliella bardawil* ($38.92 \pm 2.9\%$). En el contenido de proteínas hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre especies, donde *Geitlerinema lemermanii* fue aquella con la significativamente mayor cantidad ($44.88 \pm 1.28\%$). Con respecto a carbohidratos, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre especies, siendo *Chlorella autotrophica* ($25.35 \pm 0.70\%$), la que presentó el mayor valor (Tabla 8).

Tabla 8. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.

Especie	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos
Bacillariophyceae			
<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)	14.44 ± 2.37 bc	17.40 ± 1.66 d	1.73 ± 0.51 f
<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)	11.36 ± 1.40 cde	14.53 ± 3.13 d	4.30 ± 1.26 e
Chlorodendrophyceae			
<i>Tetraselmis suecica</i>	17.22 ± 2.32 b	17.44 ± 1.80 d	20.90 ± 1.52 b
Chlorophyceae			
<i>Chlorella autotrophica</i>	14.18 ± 0.44 bc	12.31 ± 1.02 d	25.35 ± 0.70 a
<i>Dunaliella bardawil</i>	38.92 ± 2.90 a	2.50 ± 0.19 e	11.00 ± 0.61 d
Cyanophyceae			
<i>Aphanocapsa marina</i>	9.26 ± 0.26 de	27.37 ± 2.59 c	13.53 ± 0.20 c
<i>Geitlerinema lemermanii</i>	12.22 ± 0.32 cde	44.88 ± 1.28 a	10.09 ± 0.64 d
<i>Komvophoron</i> sp.	7.99 ± 1.24 e	32.00 ± 4.25 bc	6.41 ± 1.30 e
<i>Phormidium</i> sp.	14.27 ± 0.40 bc	36.39 ± 2.43 b	6.65 ± 1.05 e
Xanthophyceae			
<i>Heterococcus</i> sp.	12.89 ± 1.61 bcd	5.59 ± 1.54 e	11.89 ± 0.57 d

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d>e>f.

3.1.6 Perfil de ácidos grasos

De las diez especies evaluadas, se identificaron 34 tipos de ácidos grasos (Tabla 9). Siendo *Chlorella autotrophica* la especie que presentó el mayor porcentaje de ácidos grasos saturados (44.66%) y monosaturados (52.42%), así como el menor porcentaje de poliinsaturados (2.90%). Mientras que *Amphora* sp. (cepa 3) mostró el mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (54.71%), así como el menor porcentaje en ácidos grasos monosaturados (9.11%). En cuanto al menor porcentaje de ácidos grasos saturados, *Komvophoron* sp. fue la especie que lo presentó (33.85%).

En el grupo de las Bacillariophyceae, *Amphora* sp. (cepa 3) presentó el mayor porcentaje en el ácido graso poliinsaturado C18:3n3 (39.35%), seguido del ácido graso saturado C16:0 (14.88%). Mientras que la especie *Cymbella* sp. (cepa 2) presentó el mayor porcentaje en el ácido graso poliinsaturado C20:5n3 EPA (28.19%).

La especie *Tetraselmis suecica*, del grupo de las Chlorodendrophyceae, presentó el porcentaje mayor de 30.41% en el ácido graso saturado C16:0.

Tabla 9. Valores promedio del porcentaje de ácidos grasos de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.

Composición de ácidos grasos	Bacillariophyceae		Chlorodendrophyceae	Chlorophyceae	
	<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)	<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Chlorella autotrophica</i>	<i>Dunaliella bardawil</i>
SFA					
C6:0		0.30	0.98 ± 0.01		0.62
C8:0	0.33	0.18	0.22 ± 0.00	0.56 ± 0.00	0.24
C10:0		0.02	0.03 ± 0.00		0.55
C11:0	0.33	0.01		0.83 ± 0.01	
C12:0	0.32	0.01			0.06
C13:0	1.34	0.59	0.76 ± 0.00	1.97 ± 0.00	0.26
C14:0	10.90	12.66	1.03 ± 0.00	16.30 ± 0.06	11.91
C15:0	1.84	3.40	0.08 ± 0.00	0.32 ± 0.00	2.36
C16:0	14.88	8.97	30.41 ± 0.02	21.11 ± 0.00	8.19
C17:0	0.31	5.69	0.07 ± 0.00		7.55
C18:0	1.18	0.40	1.07 ± 0.00	1.93 ± 0.00	0.36
C20:0	1.42	0.07	0.05 ± 0.00	1.10 ± 0.00	
C21:0	1.87	5.58	3.40 ± 0.01	0.54 ± 0.00	6.50
C22:0		0.08			0.08
C23:0	0.89	0.39	0.11 ± 0.00		0.18
C24:0	0.58	2.70			2.11
MUFA					
C14:1	1.04	0.07	0.10 ± 0.00	9.41 ± 0.08	0.09
C15:1		0.89			0.53
C16:1	2.20	18.95	1.43 ± 0.00	34.49 ± 0.06	16.80
C17:1	1.23	0.37	0.28 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.05
C18:1n9	1.60	2.29	15.32 ± 0.01	7.63 ± 0.06	0.53
C20:1n9	3.04	0.42	2.84 ± 0.00	0.44 ± 0.00	0.14
C22:1n9					
PUFA					
C18:2n6 C	5.61	1.23	16.40 ± 0.00		2.25
C18:2n6 T		0.03			
C18:3n6	1.34	0.27	2.08 ± 0.00	0.65 ± 0.00	0.95
C18:3n3	39.35	0.16	8.13 ± 0.01	1.08 ± 0.01	0.14
C20:2	0.29	0.24	0.23 ± 0.00		
C20:3n6		0.26	0.33 ± 0.00		0.38
C20:3n3	0.34			0.74 ± 0.00	0.13
C20:4n6 ARA	1.50	4.50	2.74 ± 0.00	0.43 ± 0.00	5.24
C20:5n3 EPA	2.78	28.19	11.92 ± 0.02		30.78
C22:2					
C22:6n3 DHA	3.50	1.06			1.03
TOTAL					
ΣSFA	36.19	41.05	38.21	44.66	40.97
ΣMUFA	9.11	22.99	19.97	52.42	18.14
ΣPUFA	54.71	35.94	41.83	2.90	40.90
ΣSFA/ΣMUFA+ΣPUFA	0.57	0.70	0.62	0.81	0.69
ΣMUFA/ΣPUFA	0.17	0.64	0.48	18.08	0.44

Tabla 9. (continuación). Valores promedio del porcentaje de ácidos grasos de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.

Composición de ácidos grasos	Cyanophyceae				Xanthophyceae
	<i>Aphanocapsa marina</i>	<i>Geitlerinema lemermanii</i>	<i>Komvophoron</i> sp.	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Heterococcus</i> sp.
SFA					
C6:0	0.17		0.28	2.54	2.02
C8:0	0.13	0.77 ± 0.00	0.15	0.40	0.35
C10:0					
C11:0	0.03		0.03	0.18	0.24
C12:0			0.03		0.06
C13:0	0.52	1.57 ± 0.01	0.62	0.83	1.71
C14:0	1.00	0.40 ± 0.00	0.76	0.39	0.28
C15:0	0.06	0.32 ± 0.00	0.06	0.05	0.05
C16:0	28.27	35.30 ± 0.05	27.08	22.76	22.38
C17:0	0.06	0.42 ± 0.00	0.05	0.16	0.16
C18:0	1.16	1.97 ± 0.01	0.98	4.24	4.12
C20:0	0.04	0.55 ± 0.00		3.47	3.88
C21:0	3.82		3.81	0.05	0.07
C22:0				0.17	0.18
C23:0	0.12				
C24:0	0.18				
MUFA					
C14:1	0.08	0.53 ± 0.00	0.07		
C15:1					0.07
C16:1	1.57	6.76 ± 0.03	1.08	0.91	0.83
C17:1	0.24	3.73 ± 0.03	0.37	13.00	12.76
C18:1n9	14.69	2.67 ± 0.00	16.37	8.66	8.60
C20:1n9	2.92		3.14	0.19	
C22:1n9					
PUFA					
C18:2n6 C	16.76	9.01 ± 0.02	16.75	13.58	14.00
C18:2n6 T					
C18:3n6	2.23		2.12		
C18:3n3	8.75	35.61 ± 0.09	8.37	28.13	28.12
C20:2	0.25		0.29	0.08	
C20:3n6	0.32		0.35		
C20:3n3		0.38 ± 0.00			0.06
C20:4n6 ARA	3.08		3.07	0.04	0.06
C20:5n3 EPA	13.57		14.18	0.16	
C22:2					
C22:6n3 DHA					
TOTAL					
ΣSFA	35.56	41.30	33.85	35.24	35.50
ΣMUFA	19.50	13.69	21.03	22.76	22.26
ΣPUFA	44.96	45.00	45.13	41.99	42.24
ΣSFA/ΣMUFA+ΣPUFA	0.55	0.70	0.51	0.54	0.55
ΣMUFA/ΣPUFA	0.43	0.30	0.47	0.54	0.53

En el grupo de las Chlorophyceae, *Chlorella autotrophica* presentó los mayores valores en los ácidos grasos monosaturado C16:1 (34.49%) y saturado C16:0 (21.11%). Por otra parte, la especie *Dunaliella bardawil* presentó el mayor valor en el ácido graso poliinsaturado C20:5n3 EPA (30.78%).

Para el grupo de las Cyanophyceae y Xanthophyceae, los ácidos grasos saturados C16:0 y poliinsaturados C18:3n3 fueron los que presentaron mayores valores. En *Aphanocapsa marina*, el ácido graso C16:0 presentó un 28.27%. En *Geitlerinema lemermanii*, los ácidos grasos C16:0 y C18:3n3 representaron un 35.3 y 35.61%, respectivamente. *Komvophoron* sp. presentó un 27.08% en el ácido graso C16:0. Mientras que *Phormidium* sp. presentó un 22.76% en el ácido graso saturado C16:0 y un 28.13% en el poliinsaturado C18:3n3. Por otra parte, la xantofita *Heterococcus* sp., obtuvo un 22.38 y 28.12% en los ácidos grasos C16:0 y C18:3n3, respectivamente.

3.2 Índices de calidad

3.2.1 Productividad

En la productividad se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre especies, siendo *Chlorella autotrophica* aquella especie que presentó el significativamente mayor valor tanto en productividad de biomasa ($0.213 \pm 0.006 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) como en productividad de lípidos ($0.030 \pm 0.001 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (Tabla 10).

Tabla 10. Valores promedio y desviación estándar de la productividad ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) de biomasa y de lípidos de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.

Especie	Productividad de Biomasa			Productividad de Lípidos		
Bacillariophyceae						
<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)	0.039	±	0.009 e	0.006	±	0.000 d
<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)	0.053	±	0.002 de	0.006	±	0.001 d
Chlorodendrophyceae						
<i>Tetraselmis suecica</i>	0.117	±	0.004 c	0.020	±	0.003 b
Chlorophyceae						
<i>Chlorella autotrophica</i>	0.213	±	0.006 a	0.030	±	0.001 a
<i>Dunaliella bardawil</i>	0.032	±	0.002 e	0.013	±	0.000 c
Cyanophyceae						
<i>Aphanocapsa marina</i>	0.036	±	0.001 e	0.003	±	0.000 d
<i>Geitlerinema lemermanii</i>	0.189	±	0.020 b	0.023	±	0.003 b
<i>Komvophoron</i> sp.	0.074	±	0.008 d	0.006	±	0.001 d
<i>Phormidium</i> sp.	0.048	±	0.004 e	0.007	±	0.000 d
Xanthophyceae						
<i>Heterococcus</i> sp.	0.047	±	0.002 e	0.006	±	0.001 d

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde $a > b > c > d > e$.

3.2.2 Propiedades del biodiésel

En la Tabla 11, se presentan los valores obtenidos del índice de saponificación (SV), índice de yodo (IV) y número de cetanos (CN). En cuanto al índice de saponificación se obtuvieron valores en un intervalo de 202.54 a 225.04 g KOH g⁻¹. Para el índice de yodo, el rango se presentó entre 60.67 a 178.03 g I₂ (100 g)⁻¹. Mientras que el número de cetanos se presentó en un rango de 32.72 a 56.90, siendo el menor valor para *Dunaliella bardawil* y el valor mayor para *Chlorella autotrophica*.

Tabla 11. Valores promedio del índice de saponificación (SV), índice de yodo (IV) y número de cetanos (CN) de los cultivos de diez especies de microalgas mantenidas en sistemas de cultivo por lotes.

Especie	SV (mg KOH g ⁻¹)	IV (g I ₂ (100 g) ⁻¹)	CN
Bacillariophyceae			
<i>Amphora</i> sp. (cepa 3)	207.85	164.22	35.61
<i>Cymbella</i> sp. (cepa 2)	206.08	165.50	35.53
Chlorodendrophyceae			
<i>Tetraselmis suecica</i>	206.04	136.00	42.19
Chlorophyceae			
<i>Chlorella autotrophica</i>	225.04	60.67	56.90
<i>Dunaliella bardawil</i>	206.13	178.03	32.72
Cyanophyceae			
<i>Aphanocapsa marina</i>	202.54	146.42	40.30
<i>Geitlerinema lemermanii</i>	211.20	127.98	43.35
<i>Komvophoron</i> sp.	202.52	149.04	39.72
<i>Phormidium</i> sp.	215.38	123.69	44.06
Xanthophyceae			
<i>Heterococcus</i> sp.	212.32	123.36	44.25

3.3 Efecto de la salinidad en *Chlorella autotrophica*

3.3.1 Crecimiento de la especie seleccionada

La figura 3 muestra los valores de pH del medio de cultivo.

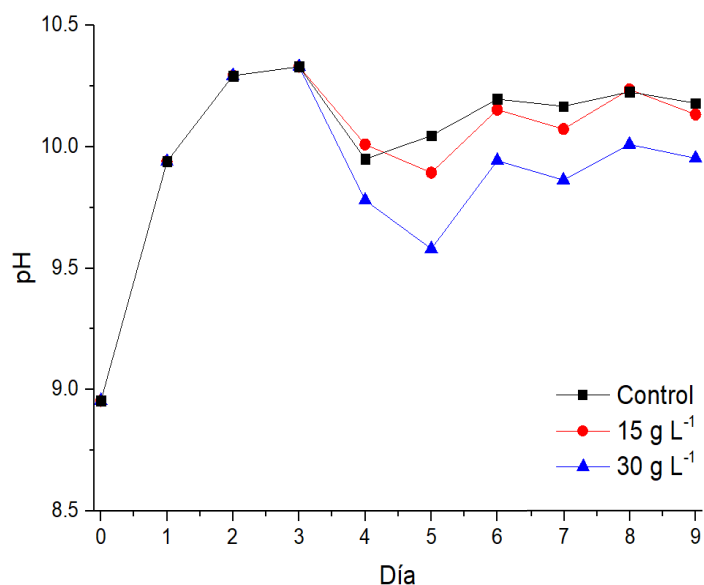


Figura 3. Valores promedio de pH del medio de los cultivos de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).

Las curvas de crecimiento celular por densidad óptica de *Chlorella autotrophica* se muestran en la figura 4, donde se observa una duración de 3 días de la fase exponencial (Tabla 12). Durante la fase estacionaria el tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl presentó una ligera disminución en el crecimiento celular con respecto al tratamiento de 15 g L⁻¹ de NaCl y el control.

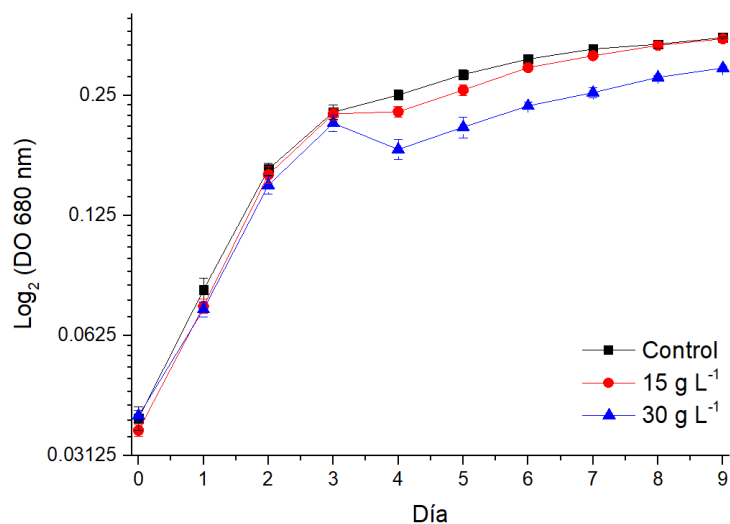


Figura 4. Valores promedio y desviación estándar de las curvas de crecimiento de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).

La concentración de células mostró diferentes significativas ($p < 0.05$) por efecto de la concentración de NaCl, donde los significativamente mayores valores se presentaron el día de cosecha (día 9) para los dos tratamientos (15 y 30 g L⁻¹ de NaCl). Con respecto a la tasa de crecimiento y tiempo de generación, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las distintas concentraciones de NaCl, para todos los tratamientos los valores de tasa de crecimiento se presentaron en un rango de 0.92 a 0.75 divisiones día⁻¹, mientras que para el tiempo de generación se presentaron en un rango de 1.33 a 1.09 días (Tabla 12).

Tabla 12. Valores promedio y desviación estándar de los indicadores de crecimiento de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl). Concentración de células (CC: células ml⁻¹ x 10⁵), días en fase exponencial (DFE: días), tasa de crecimiento (μ : divisiones día⁻¹) y tiempo de generación (Tg: días).

	CC	DFE	μ	Tg
Control				
Día 0	7.21 ± 0.03 d			
Día 3	62.50 ± 11.06 c	3	0.86 ± 0.05 abc	1.17 ± 0.07 abc
Día 5	69.13 ± 0.75 c	3	0.84 ± 0.04 abc	1.20 ± 0.06 abc
Día 7	69.50 ± 2.97 c	3	0.86 ± 0.01 abc	1.16 ± 0.01 abc
Día 9	113.75 ± 5.73 b	3	0.85 ± 0.02 abc	1.18 ± 0.03 abc
NaCl (15 g L⁻¹)				
Día 5	76.79 ± 6.70 c	3	0.85 ± 0.02 abc	1.17 ± 0.02 abc
Día 7	122.13 ± 6.88 b	3	0.90 ± 0.03 a	1.12 ± 0.03 c
Día 9	157.50 ± 16.39 a	3	0.89 ± 0.02 ab	1.13 ± 0.03 bc
NaCl (30 g L⁻¹)				
Día 5	70.95 ± 3.69 c	3	0.79 ± 0.03 c	1.27 ± 0.05 a
Día 7	109.63 ± 3.81 b	3	0.81 ± 0.02 bc	1.24 ± 0.03 ab
Día 9	169.17 ± 26.53 a	3	0.84 ± 0.01 abc	1.19 ± 0.02 abc

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d.

Fue medido el diámetro de las células para cada tratamiento (Tabla 13), obteniendo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). El mayor valor del tamaño de las células se encontró en el tratamiento control el día 9 ($4.70 \pm 0.38 \mu\text{m}$), mientras que el menor valor se presentó el día 7 para el tratamiento de 30 g L^{-1} de NaCl ($3.46 \pm 0.25 \mu\text{m}$).

Tabla 13. Valores promedio y desviación estándar de la medición celular (μm) de los cultivos de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).

		Tamaño Celular (Diámetro)	
Control			
Día 0		4.41	\pm 0.39 ab
Día 3		4.21	\pm 0.31 bc
Día 5		4.09	\pm 0.27 bc
Día 7		4.28	\pm 0.41 bc
Día 9		4.70	\pm 0.38 a
NaCl (15 g L⁻¹)			
Día 5		4.11	\pm 0.23 bc
Día 7		3.61	\pm 0.29 de
Día 9		3.90	\pm 0.30 cd
NaCl (30 g L⁻¹)			
Día 5		3.93	\pm 0.31 cd
Día 7		3.46	\pm 0.25 e
Día 9		3.57	\pm 0.27 de

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d>e.

3.3.2 Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico

El peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico se muestran en la tabla 14. Para peso seco total se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), siendo el mayor valor el día 7 para el tratamiento de 15 g L⁻¹ de NaCl y los valores menores los días 3 y 5 del tratamiento control. En peso de cenizas se presentaron diferencias significativas ($p<0.05$), donde el mayor valor fue el día 7 para el tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl y el valor menor para el control en el día 3. El peso seco orgánico mostró diferencias significativas ($p<0.05$), las diferencias mayores se mostraron en el día 9 para el tratamiento control y el tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl, mientras que los menores valores se presentaron el día 3 con el tratamiento control y el día 5 para el tratamiento con 30 g L⁻¹ de NaCl.

Tabla 14. Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico, en mg L⁻¹, de los cultivos de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).

	Peso Seco Total		Peso de Cenizas		Peso Seco Orgánico	
Control						
Día 3	156.00	± 15.81 e	68.67	± 4.22 f	92.11	± 8.11 e
Día 5	202.07	± 2.90 e	87.56	± 1.15 ef	114.52	± 1.92 de
Día 7	277.26	± 9.25 cd	121.78	± 8.52 de	155.48	± 1.48 abc
Día 9	282.74	± 7.03 cd	113.93	± 3.70 de	168.81	± 3.33 a
NaCl (15 g L⁻¹)						
Día 5	291.56	± 23.33 bcd	161.22	± 12.11 bc	130.33	± 11.22 cd
Día 7	362.00	± 25.46 a	191.48	± 13.96 ab	170.52	± 11.56 a
Día 9	306.52	± 16.70 bcd	148.30	± 9.43 cd	158.22	± 8.31 ab
NaCl (30 g L⁻¹)						
Día 5	264.44	± 19.99 d	174.78	± 6.78 abc	104.52	± 6.79 e
Día 7	339.04	± 23.42 ab	199.93	± 22.60 a	139.11	± 6.41 bcd
Día 9	316.22	± 4.22 abc	185.85	± 24.08 ab	167.56	± 17.11 a

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d>e>f.

3.3.3 Pigmentos

En la Tabla 15 se muestran los valores en la concentración de pigmentos de *C. autotrophica*, en los cuales no se presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) con respecto a los tratamientos.

Tabla 15. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de pigmentos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de los cultivos de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl). Clorofila a (Chl-a), clorofila b (Chl-b), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (Car).

	Chl-a		Chl-b		Chl-c		Car	
Control								
Día 3	500.86	± 50.28 bc	112.06	± 15.05 e	9.29	± 1.87 b	223.29	± 25.28 c
Día 5	816.11	± 44.24 a	215.64	± 17.68 ab	10.29	± 2.64 b	418.68	± 26.60 a
Día 7	423.37	± 0.12 cd	126.34	± 4.06 de	52.54	± 24.52 a	308.33	± 19.75 b
Día 9	607.91	± 62.02 b	176.87	± 9.53 bc	20.83	± 0.14 ab	332.25	± 23.77 b
NaCl (15 g L⁻¹)								
Día 5	407.25	± 28.01 cd	117.01	± 4.80 de	13.61	± 12.75 ab	218.92	± 5.81 c
Día 7	790.79	± 78.25 a	244.87	± 22.42 a	30.55	± 9.97 ab	428.30	± 36.21 a
Día 9	446.37	± 0.81 cd	128.22	± 9.18 de	8.62	± 8.46 b	272.19	± 5.74 bc
NaCl (30 g L⁻¹)								
Día 5	489.72	± 1.62 bcd	152.42	± 18.37 cd	44.24	± 16.92 ab	241.87	± 13.26 c
Día 7	367.34	± 38.36 d	115.87	± 16.90 de	18.88	± 17.06 ab	216.98	± 23.80 c
Día 9	456.60	± 34.82 cd	141.16	± 4.44 cde	27.54	± 17.41 ab	220.86	± 3.72 c

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d>e.

3.3.4 Fotosíntesis

Las mediciones fotosintéticas se presentan en la Tabla 16. La pendiente inicial mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo el valor significativamente mayor para el control el día 7, mientras que los menores valores se presentaron el día 7 para los tratamientos de 15 y 30 g L⁻¹ de NaCl. La tasa del transporte de electrones mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), donde los valores mayores se presentaron en el tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl los días 7 y 9; mientras que los menores valores se presentaron los días 7 y 9 del control, y el día 5 del tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl. En cuanto a la irradiancia de saturación se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo el mayor valor para el día 7 en el tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl y el menor valor para el día 3 del control. La eficiencia cuántica mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), los mayores valores se presentaron en el día 3 del control y el día 5 del tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl, por otra parte, el menor valor se obtuvo el día 9 del tratamiento de 15 g L⁻¹ de NaCl.

Tabla 16. Indicadores fotosintéticos del día final de los cultivos de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl). Pendiente inicial (α); tasa de transporte de electrones (ETR_{max}), irradiancia de saturación (E_k) y eficiencia cuántica (F_v/F_m).

	α	ETR_{max}	E_k	F_v/F_m
Control				
Día 3	0.022 ± 0.007 b	9.054 ± 0.735 cd	355.324 ± 9.435 e	0.584 ± 0.027 a
Día 5	0.014 ± 0.001 bc	5.249 ± 0.890 d	420.819 ± 14.707 de	0.508 ± 0.024 abc
Día 7	0.030 ± 0.004 a	11.704 ± 0.597 c	411.547 ± 52.675 de	0.536 ± 0.003 ab
Día 9	0.018 ± 0.004 bc	11.568 ± 1.237 c	662.690 ± 124.591 de	0.504 ± 0.071 abc
NaCl (15 g L⁻¹)				
Día 5	0.015 ± 0.001 bc	22.836 ± 2.836 ab	1533.904 ± 99.232 b	0.475 ± 0.027 bcd
Día 7	0.010 ± 0.001 c	4.903 ± 1.492 d	561.574 ± 36.453 de	0.445 ± 0.011 cd
Día 9	0.017 ± 0.001 bc	19.369 ± 2.254 b	1169.344 ± 89.799 bc	0.415 ± 0.042 d
NaCl (30 g L⁻¹)				
Día 5	0.013 ± 0.002 bc	12.168 ± 1.297 c	787.037 ± 48.735 cd	0.577 ± 0.004 a
Día 7	0.011 ± 0.000 c	25.564 ± 4.725 a	2265.716 ± 376.470 a	0.461 ± 0.012 bcd
Día 9	0.016 ± 0.002 bc	26.242 ± 1.468 a	1567.561 ± 133.271 b	0.437 ± 0.010 cd

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d>e.

3.3.5 Composición proximal

La composición proximal de la especie *C. autotrophica* mantenida en distintas concentraciones de salinidad se muestra en la Tabla 17. Para lípidos se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), presentándose el valor mayor y menor para el tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl en el día 5 y 9 respectivamente. Proteínas y carbohidratos no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las distintas concentraciones de NaCl.

Tabla 17. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos de los cultivos de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).

	Lípidos		Proteínas		Carbohidratos	
Control						
Día 3	8.58	± 1.27 def	23.15	± 1.35 ab	16.74	± 1.40 ab
Día 5	6.23	± 0.10 ef	24.12	± 0.56 a	14.81	± 0.35 bc
Día 7	13.31	± 1.35 cde	18.85	± 0.57 cd	13.87	± 0.20 bc
Día 9	13.24	± 0.80 cde	21.13	± 0.86 abc	16.72	± 1.66 ab
NaCl (15 g L⁻¹)						
Día 5	11.61	± 2.43 cdef	19.48	± 1.46 bcd	13.69	± 1.10 bc
Día 7	20.99	± 2.66 b	17.26	± 2.09 de	13.00	± 1.03 c
Día 9	18.69	± 5.78 bc	21.08	± 0.52 abc	18.81	± 1.41 a
NaCl (30 g L⁻¹)						
Día 5	43.88	± 3.69 a	18.36	± 1.38 cd	12.15	± 0.76 c
Día 7	13.83	± 0.94 bcd	16.16	± 1.97 de	13.19	± 0.93 c
Día 9	5.14	± 0.53 f	13.99	± 0.96 e	14.35	± 1.13 bc

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d>e>f.

3.3.6 Perfil de ácidos grasos

Los perfiles de ácidos grasos obtenidos del ensayo de inducción se muestran en la Tabla 18. En la mayoría de los ácidos grasos no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). El mayor porcentaje de ácidos grasos saturados se presentó el día 9 para el tratamiento de 15 g L⁻¹ de NaCl, siendo además el tratamiento con el menor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla 18. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de los cultivos de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).

Composición de ácidos grasos	Control				NaCl (15 g L ⁻¹)			NaCl (30 g L ⁻¹)		
	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 5	Día 7	Día 9	Día 5	Día 7	Día 9
SFA										
C8:0	9.37 ± 0.25 bcd	7.32 ± 2.35 cd	16.16 ± 2.88 bc	8.31 ± 1.28 bcd	16.71 ± 7.37 b	10.97 ± 1.40 bcd	39.31 ± 4.09 a	8.15 ± 2.41 bcd	4.50 ± 1.42 d	10.02 ± 2.55 bcd
C10:0	0.70 ± 0.60 b	0.87 ± 0.53 ab	0.64 ± 0.40 b	0.36 ± 0.15 b	1.18 ± 0.50 ab	0.65 ± 0.27 b	2.50 ± 1.32 a	0.82 ± 0.62 ab	0.61 ± 0.30 b	0.89 ± 0.41 ab
C11:0	0.46 ± 0.03 a								0.45 ± 0.14 a	0.38 ± 0.04 a
C13:0	0.82 ± 0.22 ab	0.77 ± 0.56 ab		0.70 ± 0.35 ab				0.30 ± 0.13 b	0.75 ± 0.29 ab	1.21 ± 0.17 a
C14:0	2.72 ± 1.18 a	1.16 ± 0.27 a		2.76 ± 2.61 a	1.62 ± 0.20 a	1.48 ± 0.13 a	2.71 ± 0.68 a	1.50 ± 0.87 a	2.14 ± 0.47 a	2.42 ± 0.18 a
C15:0	0.45 ± 0.14 a			0.83 ± 0.24 a					1.09 ± 0.47 a	
C16:0	22.58 ± 1.38 a	18.75 ± 1.54 ab	16.46 ± 1.33 bc	17.97 ± 0.63 abc	17.79 ± 1.68 abc	19.65 ± 1.71 ab	12.62 ± 2.73 bc	20.46 ± 3.47 ab	19.37 ± 1.79 ab	15.71 ± 2.54 bc
C17:0	0.94 ± 0.02 a			0.70 ± 0.28 a						3.63 ± 4.71 a
C18:0	11.90 ± 5.09 a	7.76 ± 1.72 a	6.89 ± 0.54 a	8.72 ± 4.64 a	7.21 ± 2.89 a	7.01 ± 2.86 a	4.42 ± 0.49 a	8.09 ± 2.79 a	9.39 ± 3.34 a	4.87 ± 2.18 a
C20:0	3.83 ± 2.73 a	3.47 ± 0.79 a	3.45 ± 0.09 a	1.80 ± 0.88 a	4.36 ± 0.50 a	6.75 ± 4.24 a	2.96 ± 1.15 a	2.99 ± 0.73 a	2.95 ± 0.75 a	2.71 ± 0.46 a
C21:0	1.04 ± 0.32 ab			2.34 ± 0.10 a					0.88 ± 0.46 b	1.39 ± 0.87 ab
C24:0										3.00 ± 0.15
MUFA										
C16:1	1.03 ± 0.46 a	2.28 ± 1.34 a	3.46 ± 1.98 a	1.43 ± 0.99 a	4.42 ± 1.65 a	2.23 ± 0.34 a	4.29 ± 0.69 a	3.67 ± 2.61 a	0.98 ± 0.40 a	2.94 ± 2.18 a
C17:1	5.27 ± 0.94 a	11.36 ± 1.28 a	9.51 ± 1.60 a	6.58 ± 4.21 a	8.45 ± 1.28 a	9.37 ± 1.93 a	6.56 ± 1.03 a	9.46 ± 4.15 a	9.32 ± 2.38 a	7.26 ± 0.58 a
C18:1n9	15.42 ± 4.52 a	9.38 ± 1.81 ab	10.28 ± 2.04 ab	12.19 ± 4.19 ab	8.40 ± 1.86 ab	11.89 ± 3.36 ab	5.08 ± 2.59 b	11.86 ± 4.40 ab	11.76 ± 2.67 ab	7.24 ± 4.92 ab
C20:1n9				3.67 ± 4.52 a				2.44 ± 0.12 a		
PUFA										
C18:2n6 C	6.97 ± 5.65 a	8.40 ± 2.46 a	9.17 ± 0.82 a	5.75 ± 3.35 a	9.36 ± 2.97 a	7.82 ± 0.88 a	4.47 ± 0.83 a	9.68 ± 3.34 a	8.63 ± 1.93 a	7.83 ± 3.19 a
C18:3n6				0.76 ± 0.55						
C18:3n3	16.05 ± 4.75 b	27.80 ± 2.33 a	24.03 ± 4.08 ab	23.35 ± 3.17 ab	20.50 ± 4.00 ab	22.17 ± 6.05 ab	15.10 ± 1.59 b	16.62 ± 1.38 b	25.39 ± 4.15 ab	20.28 ± 1.38 ab
C20:3n3		0.88 ± 0.50 b						4.22 ± 0.55 a	1.23 ± 0.58 b	
C20:4n6 ARA	0.83 ± 0.26 ab			1.89 ± 0.08 a					0.71 ± 0.37 b	1.12 ± 0.70 ab
C20:5n3 EPA										7.14 ± 4.13
TOTAL										
ΣSFA	54.81	40.11	43.61	44.48	48.88	46.52	64.53	42.31	42.12	46.22
ΣMUFA	21.71	23.01	23.25	23.87	21.27	23.49	15.93	27.42	22.06	17.43
ΣPUFA	23.85	37.09	33.19	31.76	29.86	29.99	19.57	30.51	35.95	36.37
RSU	1.20	0.67	0.77	0.80	0.96	0.87	1.82	0.73	0.73	0.86
RU	0.91	0.62	0.70	0.75	0.71	0.78	0.81	0.90	0.61	0.48

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d.

3.4 Índices de calidad del ensayo de salinidad

3.4.1 Productividad

La productividad de biomasa y lípidos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). Para biomasa el mayor valor se presentó el día 7 para el tratamiento de 15 g L⁻¹ de NaCl y los menores valores el día 9 para el tratamiento control y 15 g L⁻¹ de NaCl, así como para el día 5 del tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl. En productividad de lípidos, el significativamente valor mayor se presentó el día 5 para el tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl (0.039 ± 0.001 g L⁻¹ día⁻¹) y el significativamente menor valor se obtuvo en el tratamiento control el día 5 (Tabla 19).

Tabla 19. Valores promedio y desviación estándar de la productividad (g L⁻¹ día⁻¹) de biomasa y de lípidos de los cultivos de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).

	Productividad de Biomasa			Productividad de Lípidos		
Control						
Día 3	0.131	±	0.017 d	0.007	±	0.000 ef
Día 5	0.166	±	0.003 d	0.006	±	0.000 f
Día 7	0.249	±	0.014 bc	0.019	±	0.002 cd
Día 9	0.235	±	0.007 c	0.019	±	0.002 cd
NaCl (15 g L⁻¹)						
Día 5	0.252	±	0.022 bc	0.013	±	0.002 de
Día 7	0.324	±	0.031 a	0.032	±	0.004 b
Día 9	0.242	±	0.021 c	0.023	±	0.006 c
NaCl (30 g L⁻¹)						
Día 5	0.277	±	0.012 c	0.039	±	0.001 a
Día 7	0.294	±	0.020 ab	0.017	±	0.002 cd
Día 9	0.257	±	0.006 bc	0.007	±	0.000 ef

Letras diferentes indican diferencias significativas para cada variable entre los tratamientos en donde a>b>c>d>e.

3.4.2 Propiedades del biodiésel

El índice de saponificación, índice de yodo y número de cetanos, correspondientes a las propiedades del biodiesel se muestran en la Tabla 20. El índice de saponificación mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), donde el valor significativamente mayor se obtuvo el día 9 para el tratamiento de 15 g L⁻¹ de NaCl y el menor valor se presentó el día 7 para el tratamiento de 30 g L⁻¹ de NaCl. En el índice de yodo y número de cetanos no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos.

Tabla 20. Valores promedio y desviación estándar del índice de saponificación (SV), índice de yodo (IV) y número de cetanos (CN) de los cultivos de *Chlorella autotrophica* mantenida con distinta concentración de cloruro de sodio (NaCl).

	SV (mg KOH g ⁻¹)	IV (g I ₂ (100 g) ⁻¹)	CN
Control			
Día 3	224.77 ± 2.10 bc	63.17 ± 11.37 bc	56.37 ± 2.38 a
Día 5	220.67 ± 4.85 bc	88.85 ± 6.29 a	51.05 ± 0.88 b
Día 7	235.00 ± 5.43 b	82.13 ± 5.25 ab	51.05 ± 0.68 b
Día 9	220.14 ± 3.06 bc	79.20 ± 8.03 ab	53.28 ± 2.13 ab
NaCl (15 g L⁻¹)			
Día 5	237.48 ± 14.52 b	74.30 ± 10.86 abc	52.62 ± 1.10 ab
Día 7	225.39 ± 3.22 bc	76.40 ± 12.19 ab	53.33 ± 2.83 ab
Día 9	281.49 ± 6.29 a	50.70 ± 3.23 c	54.29 ± 0.68 ab
NaCl (30 g L⁻¹)			
Día 5	220.88 ± 4.31 bc	80.10 ± 9.76 ab	52.99 ± 2.06 ab
Día 7	214.86 ± 2.73 c	85.54 ± 9.90 ab	52.46 ± 2.08 ab
Día 9	220.89 ± 4.01 bc	81.36 ± 3.27 ab	52.49 ± 0.87 ab

Capítulo 4. Discusión

4.1 Evaluación de los cultivos de las diez especies

4.1.1 Crecimiento de las microalgas

Las especies cultivadas en agua de mar mantuvieron un intervalo de pH entre 8.0 a 9.4, mientras que para las especies de agua dulce el pH se mantuvo entre 8.6 a 11.0. La mayor variación de pH obtenida fue en los cultivos de agua dulce (*Chlorella autotrophica* y *Geitlerinema lemermanii*), se ha documentado que es común tener valores de pH tan alto como 11.0 en sistemas de producción de algas de alta densidad y donde no se ha suministrado CO₂ adicional. Las altas variaciones en pH podrían afectar el crecimiento y la fisiología de la célula, sin embargo, ha sido reportado que *Chlorella* sp. HQ (Colección No. GCMCC7601 del Centro de Colección de Cultivos Microbiológicos Generales de China) tiene capacidad para ajustar el pH a valores adecuados para el crecimiento celular en medio de cultivo ácido o alcalino (Moheimani, 2013; Pandey et al., 2019).

Las especies *Tetraselmis suecica* y *Chlorella autotrophica* tuvieron los menores tiempo de fase exponencial con los mayores valores de densidad óptica al alcanzar la fase estacionaria, lo cual indica un rápido crecimiento con alta acumulación de lípidos, ya que se ha observado que el contenido de lípidos es mayor en la fase estacionaria de crecimiento respecto a la fase exponencial (Arias-Peñaranda et al., 2013). Mientras que *Heterococcus* sp. tuvo la mayor fase exponencial con una duración de 7 días, tendencia similar a lo reportado por Sánchez-Saavedra y Castro-Ochoa (2020). Por otra parte *Dunaliella bardawil* presentó los menores valores de densidad óptica, lo cual se atribuye a la baja concentración celular y su alta concentración de carotenoides, ya que de acuerdo a lo reportado por Alam et al. (2019) el contenido de pigmentos durante el crecimiento afectan las mediciones de densidad óptica.

Para diatomeas se han reportado tasas de crecimiento entre 0.4 a 5.9 divisiones día⁻¹, lo cual se presentó en las especies *Amphora* sp. (cepa 3) y *Cymbella* sp. (cepa 2) (Furnas, 1990). La tasa de crecimiento de *Amphora* sp. (0.48 ± 0.09 divisiones día⁻¹) fue similar a lo reportado por Romero-Romero y Sánchez-Saavedra (2017) con 0.49 divisiones día⁻¹, pero en dicho trabajo se obtuvo una menor concentración de células ($1.18 \text{ células mL}^{-1} \times 10^5$), lo cual se atribuye a una menor cantidad inicial de inóculo. Para la especie *Cymbella* sp. (cepa 2), de igual manera se obtuvo una tasa de crecimiento similar a lo reportado en trabajos previos (Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra, 2016; Sánchez-Saavedra y Castro-Ochoa, 2020).

En este trabajo *Tetraselmis suecica* obtuvo una tasa de crecimiento de 0.94 ± 0.05 divisiones día⁻¹ y una concentración final de células $6.05 \pm 1.18 \text{ mL}^{-1} \times 10^5$, siendo estos valores mayores a lo reportado por Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra (2016). Dicha diferencia pudo ser resultado de utilizar el doble de irradiancia en este trabajo, ya que contar con un óptimo PAR (del inglés *Photosynthetically Active Radiation*) permite convertir la energía lumínica en energía química utilizable que daría como resultado un funcionamiento microalgal más eficiente (Mishra et al., 2019).

La mayor tasa de crecimiento se obtuvo en *Chlorella autotrophica* (1.33 ± 0.01 divisiones día⁻¹), la cual corresponde a un valor mayor que lo reportado en la literatura. Zhan et al. (2016) trabajaron con cuatro especies de *Chlorella*, las cuales en promedio tuvieron una tasa de crecimiento de 0.25 divisiones día⁻¹. Skrupski et al. (2013), reportaron una tasa de crecimiento de 0.4 divisiones día⁻¹, a pesar de que la especie de *Chlorella* se encontraba inducida a estrés por efecto del pH. Mientras que *Chlorella vulgaris* cultivada en medio BG11 bajo diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), no superó las 0.13 divisiones día⁻¹, aun cuando el tratamiento control no contenía NaCl (Pandit et al., 2017). Y tal como indica Vidyashankar et al. (2015), las especies con mayor tasa de crecimiento (menor tiempo de duplicación) y mayor productividad de biomasa son esenciales para una producción exitosa de biomasa. Estas propiedades imparten una ventaja selectiva, como un menor riesgo de contaminación por especies competidoras y un alto rendimiento de biomasa por volumen de cosecha, reduciendo los costos de producción de manera apreciable durante el cultivo en masa.

Aphanocapsa marina presentó la menor tasa de crecimiento, sin embargo, la concentración de células fue la mayor con respecto a las otras especies estudiadas, y a pesar de ser una especie de tamaño pequeño (0.84-1.04 µm), esta menor tasa de crecimiento pudo deberse a que las células se encontraban distribuidas en todo el volumen del matraz, y como Ruíz-Marín et al. (2010) indicaron, una alta densidad celular reduce la cantidad de luz que penetra en el cultivo e incrementa los efectos de auto-sombreado que luego limitan el crecimiento y las actividades metabólicas de las células de algas.

El tamaño inicial y final de *Heterococcus* sp. mostró la mayor diferencia, esto pudo deberse a la irradiancia con que fue cultivada, ya que ha sido reportado que incrementos en la intensidad lumínica puede aumentar el tamaño de las células para sobrevivir en ambientes estresantes (Mishra et al., 2019).

4.1.2 Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico

La xantofila *Heterococcus* sp. presentó el mayor peso seco total, sin embargo, la parte orgánica fue menor a las cenizas, tendencia similar a lo obtenido por Sánchez-Saavedra y Castro-Ochoa (2020). Mientras que las especies *Chlorella autotrophica* y *Geitlerinema lemermanii* presentaron valores de peso seco orgánico mayores a lo obtenido en peso de cenizas, sin embargo debe tenerse en cuenta que estas son especies dulceacuícolas, donde la cantidad de sales disponibles en el medio son menores a lo disponible en medios marinos.

4.1.3 Pigmentos

El mayor contenido de Chl-a obtenido en este trabajo fue para *Chlorella autotrophica* ($961.47 \pm 67.35 \mu\text{g L}^{-1}$), sin embargo, este fue menor a lo reportado por Lee et al. (2018), quienes evaluaron cuatro especies de *Chlorella* originarias de diferentes latitudes, cultivadas por 10 días en medio basal Bold, a una irradiancia de $42 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con fotoperiodo 12:12 horas luz-obscuridad, a diferentes temperaturas. El contenido de pigmentos depende de las especies de microalgas y las condiciones de cultivo. La temperatura, la salinidad, la irradiancia, la longitud de onda, los fotoperiodos, el pH, la limitación de nutrientes, los suplementos de nitrógeno, los pesticidas y los metales pesados afectan la producción de pigmentos de microalgas (Begum et al., 2016).

La especie *Dunaliella bardawil* presentó la mayor cantidad de carotenoides ($2244.76 \pm 71.11 \mu\text{g L}^{-1}$). Las microalgas se han posicionado en la producción comercial de pigmentos, creando una competencia con los pigmentos fabricados de forma sintética. En 1986, el b-caroteno producido a partir de *Dunaliella salina* por *Western Biotechnology* (Hutt Lagoon, Australia) se comercializó en todo el mundo. Del mismo modo, el β -caroteno de otras microalgas, especialmente las cianobacterias, se está produciendo a gran escala en la India (Begum et al., 2016).

A pesar de que las cianobacterias se reportan con abundante Chl-a como pigmentos fotosintético principal (Begum et al., 2016), *Aphanocapsa marina* fue la que presentó la menor cantidad en dicho pigmento concordando con lo reportado por Jiménez-Valera (2016).

4.1.4 Fotosíntesis

La eficiencia fotosintética es utilizada como un indicador de la salud fisiológica de las microalgas, cuando una especie muestra variación en F_v/F_m con valores entre 0.5 a 0.7, se dice que esta se encuentra en un estado fotosintético "saludable" (Lee et al., 2018). Las especies *Amphora* sp. (cepa 3), *Cymbella* sp. (cepa 2), *Dunaliella bardawil*, *Aphanocapsa marina*, *Komvophoron* sp. y *Phormidium* sp. reportaron valores de eficiencia cuántica menor a 0.5, lo cual indican un estado de estrés. En otros estudios, se ha reportado un F_v/F_m de 0.65 en *Amphora* sp. y 0.78 en *Phormidium* sp., siendo la aplicación de un fotoperiodo la principal diferencia de estos trabajos con el presente estudio (Patel et al., 2018; Ishika et al., 2019).

Las cianobacterias evaluadas en este trabajo presentaron valores bajos en la eficiencia cuántica, lo cual se atribuye a la irradiancia con que fueron cultivadas. Estos valores bajos en F_v/F_m sugieren un desorden funcional en el aparato fotosintético y daño al fotosistema II, encargado de captar la energía luminosa y proporcionar los electrones para el proceso de fotosíntesis; además las células aumentan su NPQ (del inglés *Non-Photochemical Quenching*) que corresponde a una medida de fotoprotección mediante el cual la luz excesiva se disipa como calor para evitar impactos negativos en la cadena fotosintética de transporte de electrones (Wang et al., 2016; Barati et al., 2018, Lee et al., 2018). Begum et al. (2016) indican que las cianobacterias prefieren una baja intensidad de luz debido a su baja tasa de energía específica de mantenimiento y composición de pigmento.

Las especies de *Tetraselmis suecica*, *Chlorella autotrophica* y *Heterococcus* sp. fueron las que presentaron el valor mayor de F_v/F_m , dentro del rango de eficiencia cuántica de 0.5 a 0.7, lo que indica una función óptima bajo las condiciones de cultivo a las que fueron inducidas

Se ha demostrado en células de *Chlorella*, que valores óptimos en la eficiencia cuántica permiten a las células regular la utilización de la luz para la fotosíntesis, así como controlar la cantidad de luz absorbida (Lee et al., 2018).

4.1.5 Composición proximal

En las Chlorophyceae, se presentó un alto porcentaje en lípidos y carbohidratos, lo que ayuda a la coproducción de biodiesel y bioetanol simultáneamente, lo que finalmente reduce los costos generales de

producción de biodiesel (Pandit et al., 2017). El almidón (un carbohidrato complejo) y los lípidos tienen sus respectivos papeles en el metabolismo en la fisiología de las células microalgales. Por una parte, el almidón, un compuesto de almacenamiento primario de bajo costo energético y predicho como esencial para proporcionar fuentes de carbono para la producción de lípidos. Mientras que los lípidos, compuestos de almacenamiento secundario y un sumidero de electrones que podría evitar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno inducidas por el exceso de electrones derivados de la fotosíntesis. La acumulación de lípidos se produce solo cuando la disponibilidad de carbono supera la demanda de síntesis de almidón (Zhu et al., 2018).

El mayor porcentaje de lípidos se obtuvo en *Dunaliella bardawil* ($38.92 \pm 2.9\%$) cultivada a una irradiancia de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en medio f. Dicho valor es similar a lo reportado por Seyhaneýıldız et al. (2016) quienes evaluaron la misma especie en diferentes condiciones para incrementar el contenido de lípidos, como resultado obtuvieron un $42 \pm 2\%$, sin embargo, los cultivos fueron inducidos a una irradiancia de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cuatro veces mayor a lo utilizado en este trabajo) en medio 2X Erdschreiber. A pesar de alcanzar porcentaje similar en el contenido de lípidos, es de importancia evaluar los beneficios y desventajas de las condiciones de cultivo que se utilizarán, ya que una u otra opción puede conllevar a incrementos en los costos de producción. Ejemplo de ello es el uso de luz artificial, que si bien se ha reportado incrementa la productividad también representa un aumento en los costos económicos asociados al cultivo de microalgas (Blanken et al., 2013). Se estima que en algas fotosintéticas el valor máximo teórico para la conversión de luz solar en biomasa es del 13%, no obstante, en condiciones de cultivo generalmente se alcanza menos de la mitad de dicho valor. Por lo que es un factor crucial maximizar el aporte de luz en los cultivos de microalgas (Ramanna et al., 2017).

Entre las cianobacterias se ha reportado que las cepas unicelulares tienen más biomasa enriquecida en lípidos que las especies filamentosas (Patel et al., 2018). Sin embargo, para este trabajo *Aphanocapsa marina*, que corresponde a una cianobacteria unicelular, presentó la menor proporción en lípidos con un valor de $9.26 \pm 0.26\%$, esto comparado con la cianobacteria filamentosa *Phormidium* sp. que obtuvo el $14.27 \pm 0.40\%$.

La especie de cianobacteria *Geitlerinema lemermanii*, obtuvo un valor de $12.22 \pm 0.32\%$ de lípidos, $44.88 \pm 1.28\%$ de proteínas y $10.09 \pm 0.64\%$ de carbohidratos; lo cual se asemeja a los resultados obtenidos por Sánchez-Alejandro y Sánchez-Saavedra (2015) quienes reportaron para la misma especie una composición proximal de 15.24% de lípidos, 58.56% de proteínas y 13.99% de carbohidratos. A pesar de encontrarse

una misma tendencia con respecto a las proporciones de cada componente, en este trabajo se observó un incremento de proteínas mayor al 10%.

En la cianobacteria *Phormidium* sp., se obtuvo un $14.27 \pm 0.40\%$ en lípidos y $6.65 \pm 1.05\%$ en carbohidratos, lo cual fue diferente a lo reportado en otros trabajos para esta misma especie, Jiménez-Valera (2016) reportó valores de $12.0 \pm 5.5\%$ y $21.0 \pm 3.1\%$ en lípidos y carbohidratos respectivamente, donde la irradiancia fue la diferencia entre los cultivos, ya que este autor utilizó un 50% menos de irradiancia. Mientras que, esta misma especie cultivada en medio líquido BG11+, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e irradiancia de $92.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fotoperiodo 14:10 horas luz-obscuridad alcanzó un 8.5% en lípidos y 27.8% en carbohidratos (Patel et al., 2018).

4.1.6 Perfil de ácidos grasos

En este trabajo *Amphora* sp. (cepa 3) mostró el mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (54.71%), siendo el ácido linolénico (C18:3n3) el de mayor proporción (39.35%). Lo antes descrito es opuesto a lo obtenido por Chtourou et al. (2015), quienes reportaron un 43.14% de ácidos grasos saturados, donde el ácido palmítico (C16:0) fue el de mayor proporción (24.64%), en dicho estudio la especie fue cultivada 15 días en medio f/2 Provasoli, a 30°C , agitación constante de 21 rad s^{-1} e iluminación continua de $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las especies de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina* y *Komvophoron* sp. presentaron los mayores porcentajes en el ácido palmítico (C16:0), con un 30.41, 28.27 y 27.08%, respectivamente. Cuanto mayor es el porcentaje de ácidos grasos con cadena de entre 16 y 18 carbonos, mejor es el contenido de lípidos para la producción de biodiesel, debido a que proporciona un mayor número de cetano y en consecuencia más calor de combustión (Francisco et al., 2010; Conley, 2012).

En el trabajo de Xu et al. (2020) evaluaron 11 cepas de microalgas en medio L1 a base de agua de mar, irradiancia de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con fotoperiodo 12:12 horas luz-obscuridad, para la especie *Tetraselmis suecica* los mayores porcentajes en ácidos grasos fueron de 25.2% en el C16:0, 13.6% en el C18:1n9 y 11.8% en el C18:2n9. Resultados similares a lo obtenido en este trabajo, donde los mayores porcentajes se obtuvieron en el ácido graso C16:0 (30.41%), C18:1n9 (15.32%) y C18:2n9 (16.40%), no obstante, el

ácido graso C20:5n3 EPA del cual en este trabajo se obtuvo un 11.92%, no fue identificado en el trabajo de Xu et al. (2020).

En la especie *Chlorella autotrophica* se obtuvieron los mayores porcentajes en ácidos grasos saturados (44.66%) y monosaturados (52.42%). En estudios realizados con *Chlorella vulgaris*, Pandit et al., (2017) obtuvieron 44% en ácidos grasos saturados, 19.3% para los monosaturados y 34.8% para poliinsaturados. Mientras que Sánchez-Saavedra y Castro-Ochoa (2020) obtuvieron un 33.89% en ácidos grasos saturados, 32.77% para los monosaturados y 33.34% para poliinsaturados. Con lo cual se demuestra la producción específica de ácidos grasos, aún entre especies del mismo género.

En cuanto a ácidos grasos poliinsaturados, *Cymbella* sp. (cepa 2) y *Dunaliella bardawil* obtuvieron los mayores porcentajes en el ácido eicosapentaenoico (C20:5n3 EPA), con valores de 28.19% y 30.78%, respectivamente. Resultado que coincide con lo descrito en el estudio realizado por Bhosale et al. (2010), donde *Dunaliella salina* es evaluada como una importante fuente de ácido eicosapentaenoico el cual tiene aplicaciones en la industria farmacéutica y nutracéutica.

Las cianobacterias filamentosas *Geitlerinema lemermanii*, *Komvophoron* sp. y *Phormidium* sp. presentaron un valor mayor a 40% en cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son buscados en la industria acuícola. Chen et al. (2019) mencionan que comparado con las microalgas unicelulares, las microalgas filamentosas podrían ser de gran importancia en la reducción del costo de producción, ya que han demostrado ser superiores en términos de robustez en el crecimiento, resistencia a la contaminación microbiana y facilidad de cosecha. Siendo los ácidos grasos EPA y DHA los de principal interés (Chauton et al., 2015). Sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados de mayor proporción en el presente trabajo fueron el ácido linolénico (C18:3n3) para las especies *Geitlerinema lemermanii* y *Phormidium* sp., mientras que para *Komvophoron* sp. fue el ácido linoléico (C18:2n6 C).

La xantofila *Heterococcus* sp. presentó un 35.50% en ácidos grasos saturados, 22.26% en monosaturados y 42.24% en poliinsaturados, siendo los ácidos grasos C16:0 y C18:3n3 aquellos de mayor proporción, con valores de 22.38% y 28.12% respectivamente. Para la misma especie, Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra (2016) reportaron un 34.1% en ácidos grasos saturados, 7.4% en monosaturados y 58.5% en poliinsaturados, donde de igual forma los ácidos grasos C16:0 y C18:3n3 fueron los mayores, pero con valores de 23.3% y 42.4%, respectivamente. Entre ambos trabajos, las diferencias fueron la irradiancia y el día de colecta de las células, factores que muestran haber influido en los ácidos grasos.

4.1.7 Índices de calidad

En el trabajo de Chtourou et al. (2015) reportaron en *Amphora* sp. la mayor productividad de biomasa de $0.050 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ alcanzada al día 6, mientras que en este trabajo se obtuvieron $0.039 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en el día 7. Otro trabajo donde evaluaron *Amphora* sp., reportaron una productividad de biomasa y lípidos de 0.029 y $0.005 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, respectivamente, esto al inducir los cultivos a una salinidad del 56% (Ishika et al., 2019).

En *Tetraselmis suecica* se obtuvo una productividad de biomasa de $0.117 \pm 0.004 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y de lípidos $0.020 \pm 0.003 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, siendo estos valores mayores a lo reportado por Sarpal et al. (2019) y Pugkaew et al. (2019) quienes obtuvieron una productividad de 0.036 y $0.08 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de biomasa, así como 0.011 y $0.009 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de lípidos, respectivamente. No obstante, esta diferencia pudo deberse a que en este trabajo se utilizó medio "f", mientras que Sarpal et al. (2019) utilizaron medio Guillard f/2, lo cual significa una reducción en el aporte de nutrientes los cuales son necesarios para el crecimiento eficiente de las microalgas. La limitación o privación de nutrientes afecta la actividad fotosintética y provoca cambios en el contenido de compuestos intracelulares (Danesh et al., 2017; Savvidou et al., 2020)

La mayor productividad de biomasa y lípidos fue obtenida con *Chlorella autotrophica*, con valores promedio de 0.21 y $0.03 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Para *Chlorella vulgaris* se reportó una productividad de biomasa promedio de $0.028 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y de lípidos de $0.01 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Pandit et al., 2017). Sin embargo, estos son valores menores en comparación con lo reportado por Skrupski et al. (2013), donde obtuvieron $1.6 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en la microalga del género *Chlorella* que fue inducida a estrés por pH.

Es importante mencionar que el contenido de lípidos por sí solo no es un indicador potencial de la productividad de los lípidos; depende tanto de la productividad de la biomasa como del perfil de ácidos grasos. Esto significa que la productividad de los lípidos es directamente proporcional a la biomasa de microalgas y al contenido de lípidos. Sin embargo, el contenido de lípidos es independiente del contenido de biomasa, ya que un aumento del contenido de biomasa, no produce un aumento significativamente el contenido de lípidos (Pandit et al., 2017).

El índice de yodo (IV) se define como la cantidad de yodo (en gramos) necesaria para saturar una muestra de 100 g de aceite, el cual se considera como una medida directa de la instauración (Gopinath et al., 20019). En la norma EN 14214, el valor máximo establecido de IV es de 120 , lo cual, para este trabajo solo fue cumplido por la especie *Chlorella autotrophica*. A pesar de que el IV está relacionado con la cantidad de dobles enlaces, un menor valor de estos no garantiza la calidad del biodiesel ni un mayor número de cetanos, lo cual se observó al comparar las propiedades del biodiesel de *Heterococcus* sp. obtenidas en

este trabajo con lo reportado por Sánchez-Saavedra y Castro-Ochoa (2020) quienes con un índice de yodo de 203.12 ($\text{g I}_2 (100 \text{ g})^{-1}$) e índice de saponificación de 212.04 (mg KOH g^{-1}) obtuvieron un número de cetanos de 45.25, similar a lo aquí reportado.

La clorofícea *Chlorella autotrophica* fue la especie que presentó el mayor número de cetanos (56.9), valor similar a lo previamente reportado para *Chlorella sorokiniana* MKP01 (57.8) y *Chlorella* sp. (50.39-64.90), este género se identifica como potencial fuente de producción de materia prima para la producción de biodiesel (Knothe, 2012; Vidyashankar et al., 2015; Pandey et al., 2019). El número de cetanos de *Chlorella autotrophica* obtenido en este trabajo, cumple con el mínimo valor especificado en las normas ASTM D6751 y EN 14214, de 47 y 51, respectivamente (Pandey et al., 2019). Mientras que las otras nueve especies estudiadas en este trabajo, no alcanzaron los valores óptimos en los indicadores de calidad de biodiesel, principalmente por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados. Por lo que, la saturación, la insaturación y la poliinsaturación de los ácidos grasos deben tener un equilibrio óptimo para obtener una alta calidad de biodiésel (Pandit et al., 2017).

En el trabajo realizado por Sánchez-Saavedra y Castro-Ochoa (2020) evaluaron especies con potencial para la producción de biodiesel, como resultado obtuvieron un número de cetanos de 45.19 en *Amphora* sp. (cepa 3) y 42.46 en *Cymbella* sp. (cepa 2), los cuales son mayores a lo obtenido en este trabajo. En dicho trabajo, también fueron evaluadas las especies *Aphanocapsa marina*, *Phormidium* sp. y *Heterococcus* sp., siendo los valores del número de cetanos muy similares a lo aquí reportado.

4.2 Efecto de la salinidad en *Chlorella autotrophica*

4.2.1 Crecimiento

Se ha reportado que valores de pH mayores a 8 provoca la auto-floculación de células y la precipitación de sales contenidas en el medio de cultivo (Nordin et al., 2019). Sin embargo, para la especie *Chlorella autotrophica* valores de pH mayores a 8 parecen ser los idóneos para su crecimiento, ya que en el ensayo de selección de especie y de salinidad el pH se mantuvo en un rango de 8.6 a 11.0.

La tasa de crecimiento no tuvo cambios significativos con los tratamientos de salinidad utilizados en esta investigación, evaluando un valor promedio global de 0.85 ± 0.04 divisiones día^{-1} , valor que representa una disminución en las divisiones por día con respecto a lo obtenido en el ensayo anterior, en donde se alcanzaron 1.327 ± 0.007 divisiones día^{-1} , siendo la inducción por salinidad la diferencia entre los ensayos.

Ahmad y Hellebust (1984), evaluaron la especie *C. autotrophica* para dos aportes de nitrógeno, de lo cual obtuvieron una tasa de crecimiento de entre 1.2 a 1.5 divisiones día⁻¹ con una salinidad de entre 1 a 50%.

El tamaño celular presentó una disminución conforme al aumento en la salinidad, lo cual puede deberse a cambios metabólicos debido a la osmosensibilidad y osmorregulación, siendo esta respuesta específica para cada especies (Kakarla et al., 2018). En contraste, Kim et al. (2016) reportaron un incremento en tamaño celular mayor al 200%, esto al inducir a la especie *C. sorokiniana* HS1 a una condición de salinidad de 30 g L⁻¹ de NaCl.

4.2.2 Peso seco total, cenizas y peso seco orgánico

Si bien hubo una disminución en la tasa de crecimiento al inducir a estrés por salinidad, también se presentó un incremento en la producción de biomasa, con valores de pesos que duplicaron lo obtenido en el ensayo de selección de especie. En el trabajo de Vega et al. (2017) explican que es frecuente que un determinado tratamiento proporciona concentraciones celulares significativamente mayores, pero sin diferencias importantes en producción de biomasa. Asimismo, se pueden registrar incrementos de biomasa microalgal, aun cuando la concentración celular permanece constante y ambas situaciones antes descritas se deben a cambios en el peso celular unitario.

Para el ensayo de salinidad, se observó un incremento en el contenido de cenizas, lo cual representa un aumento en la materia inorgánica celular. Dicho incremento se relaciona con el contenido de NaCl en el medio, donde las células microalgales realizan un ajuste debido al estrés hídrico causado por el alto contenido de sal (Renaud y Parry, 1994; Rocha et al., 2020).

4.2.3 Pigmentos

En el ensayo de salinidad, la concentración de clorofila a y b presentó una disminución con respecto al ensayo de selección de especie. La degradación o reducción en la cantidad de pigmentos fotosintéticos es una respuesta al estrés en plantas y microalgas (Pancha et al., 2015).

Aun cuando hubo una disminución de clorofila, los cultivos no mostraron cambios en coloración; esto a pesar de que al inducir a salinidad se habla de un cambio en la composición de pigmentos que conlleva a cambios de tonalidad en los cultivos (Pancha et al., 2015; Kim et al., 2016).

Los valores obtenidos en este trabajo para Chl-a fueron menores a los reportados por Kim et al. (2016), quienes de igual forma no obtuvieron cambios significativos entre los tratamientos de salinidad.

En cuanto a carotenoides, se observó una disminución en la concentración para el ensayo de salinidad con respecto al ensayo de bioprospección. Campenni' et al. (2013) indican que al utilizar una mayor exposición a la luz se espera una mayor producción de carotenoides, sin embargo, la irradiancia de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ utilizada en este trabajo no indica ser suficiente para mantener una alta concentración de carotenoides, siendo la salinidad un factor que parece afectar de manera negativa.

4.2.4 Fotosíntesis

Los valores de la tasa de transporte de electrones (ETR_{max}) fueron menores en el ensayo de salinidad en comparación con lo obtenido en el ensayo de selección de especie, lo cual de acuerdo a Barati et al. (2018) muestra la falta de adaptación de la maquinaria de transporte de electrones en el sistema fotosintético a la salinidad seleccionada.

La eficiencia fotosintética obtenida en el control para el ensayo de salinidad se mantuvo cercana al valor obtenido en el ensayo de selección de especie. Mientras que los resultados de F_v/F_m en los tratamientos de salinidad mostraron un estado de estrés para *C. autotrophica* al ser valores menores a 0.5, no obstante, en el día 5 del tratamiento con 30 g L^{-1} , se obtuvo una eficiencia de 0.577 ± 0.004 , indicando mayor eficiencia en el procesamiento de la luz absorbida para la fotosíntesis o bien conteniendo más centros de reacción abiertos (Barati et al., 2018).

El estrés por exceso de salinidad en el medio de cultivo inhibe la fotosíntesis, lo que reduce la biomasa y la productividad de lípidos, incluso llegando a ocasionar daños celulares irreversibles o la muerte celular (Minhas et al., 2016). Sin embargo, para este trabajo no se observó una reducción en biomasa y lípidos, por lo que las cantidades de NaCl utilizadas no fueron excesivas.

4.2.5 Composición proximal

En el ensayo de bioprospección, *C. autotrophica* obtuvo un $14.18 \pm 0.44\%$ en lípidos, al inducir a estrés por salinidad se observó un incremento en lípidos para la mayoría de los tratamientos. El aumento en la cantidad de lípidos puede deberse a un aumento de la presión osmótica bajo estrés por salinidad que desencadena la síntesis de glicerol, que es un precursor importante para la formación de gotitas de lípidos en las células de las algas, esto como respuesta al estrés oxidativo en condiciones de alta salinidad. Aunque también se habla que el aumento en el contenido de lípidos es probablemente el resultado de la reasignación del flujo de carbono de los carbohidratos para sintetizar lípidos (Kakarla et al., 2018).

En cuanto a los efectos de otras sales, la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) podría incrementar el contenido de lípidos en algunas especies de microalgas, al mejorar la eficiencia fotosintética y la utilización de nitratos (Xia et al., 2013). Tal como lo reportan Xia et al. (2013), quienes indujeron la producción de lípidos con 4 diferentes tipos de sales en cultivos de *Desmodesmus abundans* en un proceso de dos etapas, siendo el bicarbonato de sodio aquel tratamiento que presentó los mejores resultados. También se ha descubierto que otras sales, como las sales férrica, crómica, cúprica y de zinc, aumentan el contenido de lípidos en algunas especies de microalgas, pero el uso de estos compuestos implica un grave peligro ambiental ya que son altamente tóxicos. Por el contrario, el utilizar NaCl ha demostrado ser efectivo y seguro, especialmente considerando su costo, disponibilidad y reciclaje (Xia et al., 2013; Minhas et al., 2016).

Kakarla et al. (2018) realizaron un estudio que tuvo como objetivo mejorar la producción de lípidos en un proceso de dos fases, los cultivos fueron inducidos a estrés por alta salinidad, *C. sorokiniana* fue cultivada por 7 días en medio BG11, a 25°C e irradiancia de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, posteriormente fue cosechada e inducida a estrés por salinidad hasta el día 9 suplementando 60 g L^{-1} de NaCl, como resultado los autores reportaron un contenido de lípidos de 38%, mientras que en este trabajo, al día 9 y con la mitad de salinidad, se obtuvo un $5.14 \pm 0.53\%$ en lípidos.

El proceso de dos fases con salinidad como factor de estrés se ha reportado que no presenta retrasos en la producción de biomasa, siendo un método eficiente para producir lípidos sin comprometer la producción de biomasa (Pancha et al., 2015).

El mayor porcentaje de lípidos fue de 43.88 ± 3.69 para una salinidad de 30 g L^{-1} , similar a lo reportado por Campenni' et al. (2013), quienes obtuvieron un valor de lípidos de 41.5% para la misma salinidad pero con

la especie *Chlorella protothecoides*. Por otra parte, Huang et al. (2019) realizaron cultivos de *Chlorella* sp. CPP82 en agua de mar artificial, donde obtuvieron 21.73% en lípidos; no obstante, al cultivar en agua de mar artificial limitada en nitrógeno y aguas residuales artificiales el porcentaje de lípidos incremento hasta 44.2%. El contar con la flexibilidad de cultivar especies de microalgas en distintos tipos de medios es ventajoso debido a los beneficios económicos y ambientales. La calidad y disponibilidad del agua son elementos clave al momento de realizar análisis económicos de los biocombustibles a base de algas. Las aguas de bajo costo, con alto contenido de sal o alcalinas y las aguas residuales agrícolas, son los principales candidatos para la producción de biocombustibles. El agua de mar es un medio complejo que contiene la mayoría de los elementos mayores y menores necesarios para el cultivo masivo de algas, lo que ayuda a reducir la necesidad de suplementos minerales y, lo que es más importante, ayuda a ahorrar agua dulce, un recurso importante (Huang et al., 2019; Ummalyima et al., 2020).

Haciendo una comparación con lo obtenido en el ensayo de selección de especie en éste trabajo, respecto a lo obtenido en el ensayo de salinidad con *C. autotrophica* se observó un incremento en el porcentaje de proteínas y un decremento en carbohidratos. Este mismo comportamiento se presentó en el trabajo realizado por Wang et al. (2016) donde evaluaron cuatro tratamientos con estrés salino y osmótico, en el día 5 y con una salinidad de 30 g L⁻¹ de NaCl el porcentaje de proteínas fue de 33.5% y de 22.8% para carbohidratos, siendo estos valores mayores a lo obtenido en este trabajo. De acuerdo a lo descrito por Wang et al. (2016), la acumulación de proteínas, donde se incluyen las enzimas antioxidantes, el transportador de iones, la proteína protectora macromolecular, entre otras, son claves en el ajuste osmótico y la protección celular; mientras que los carbohidratos tienen un rápido decremento conforme se acumulan los lípidos, esto bajo condiciones de estrés.

Se ha aceptado generalmente que el almidón y los lípidos en las células de algas sirven como mecanismos protectores en respuesta a estímulos ambientales (Zhu et al., 2018). En este trabajo, el porcentaje de proteínas y carbohidratos no presentó cambios significativos con respecto a los tratamientos, lo cual indicaría igual actividad en las vías de señalización de estos metabolitos. Dicha situación sería contraria a lo reportado por Kakarla et al. (2018), quienes indicaron que la vía de asimilación de lípidos era más activa bajo estrés por alta salinidad, teniendo a la par una disminución en el contenido de carbohidratos.

4.2.6 Perfil de ácidos grasos

Para todos los tratamientos, los ácidos grasos de mayor proporción fueron el C16:0, C18:1n9 y C18:3n3. Lo antes mencionado tiene similitud con lo reportado por Campenni' et al. (2013), quienes obtuvieron los mayores porcentajes en los ácidos grasos C16:0, C18:1n9, C18:2 y C18:3n3 en cultivos de *Chlorella protothecoides* inducida por concentraciones de 10, 20 y 30 g L⁻¹ de NaCl. Generalmente, el ácido palmítico (C16: 0), ácido palmitoleico (C16: 1), ácido oleico (C18: 1) y ácido linolénico (C18: 3) son los principales ácidos grasos que tienen un importante efecto en las propiedades del biocombustible (Mathimani et al., 2018).

En el tratamiento de 15 g L⁻¹ de NaCl, se observó un incremento significativo en el porcentaje del ácido graso monosaturado C8:0 (hasta 39.31 ± 4.09%). En general, el porcentaje de ese ácido graso fue mayor en este trabajo en comparación con lo reportado en otras investigaciones en donde evalúan especies de *Chlorella*. En el trabajo de Barati et al. (2018), que tuvo como objetivo examinar el efecto de la temperatura elevada respecto a la producción de ácidos grasos en taxas similares de *Chlorella* provenientes de diferentes latitudes, reportaron valores no mayores a 3.1% en el ácido graso C8:0. Por su parte Mathimani et al. (2018) evaluaron diferentes formulaciones de medios de cultivo con el fin de producir la máxima cantidad de biomasa y contenido de lípidos en *Chlorella vulgaris*, donde el ácido graso C8:0 obtuvo los menores porcentajes con respecto a los otros ácidos grasos identificados, siendo el máximo valor de 0.15%. Los ácidos grasos de cadena corta, de entre 6 y 14 carbonos, tiene amplias aplicaciones en la industria cosmética, nutricional y química, esto debido a sus características tales como baja viscosidad, bajo punto de congelación, baja tensión superficial, alta transparencia y estabilidad a la oxidación, siendo de mayor calidad aquellos producidos por microalgas dada su baja toxicidad y alta seguridad (Gong y Miao, 2019).

En el trabajo de Nordin et al. (2019) presentan una revisión de la composición de ácidos grasos de varias especies de *Chlorella* con potencial para la producción de biodiesel, donde se observó que a pesar de pertenecer a un mismo género, hubo una variación en la composición de ácidos grasos con respecto a cada especie y la condición de cultivo; el ácido palmítico (C16:0), que es de lo más buscado para la producción de biodiesel, se mencionan valores de 13.02 hasta 56.34%. En este trabajo se encontró que *C. autotrophica* mostró los mayores valores de C:16 el día 3 en el tratamiento control y la tendencia general fue de disminuir el contenido respecto al tiempo de cultivo en todos los tratamientos.

4.2.7 Índices de calidad

En el tratamiento de mayor salinidad de este trabajo, se obtuvo para el día 5 una productividad de biomasa y de lípidos de 0.277 ± 0.012 y 0.039 ± 0.001 , respectivamente. Estos resultados son menores a lo reportado para la especie *Chlorella sorokiniana* que obtuvo una productividad de $0.279 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en biomasa y $0.106 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en lípidos, esto al día 9 y con una salinidad de 60 g L^{-1} de NaCl (Kakarla et al., 2018). Sin embargo, al comparar uno y otro trabajo se observó una diferencia entre los tiempos de mantenimiento de los cultivos y la cantidad de NaCl utilizada, siendo ambas condiciones mayores en el trabajo de Kakarla et al. (2018), que si bien proporcionaron mayores valores de productividad, también representan una mayor utilización de recursos lo cual incrementa los costos de producción, un factor importante que impide la comercialización del biodiésel de microalgas (Pugkaew et al., 2019).

Con respecto al número de cetanos, para todos los tratamientos se alcanzó el valor mínimo establecido en las normas internacionales. Los cuales fueron similares a lo reportado en *Chlorella luteoviridis* de la cual se determinó un valor de 56.43 (Osundeko et al., 2013). No obstante, Pandit et al. (2017) reportaron valores en el número de cetanos de entre 62 a 65.9 en cultivos de *Acutodesmus obliquus* con concentraciones de NaCl de 0.1 a 0.4 M; valores aproximados a lo reportado por Nordin et al. (2019) obtuvieron un valor de 66.85 ± 1.17 en el número de cetanos, esto con la especie *Chlorella vulgaris*.

Capítulo 5. Conclusiones

La mayor tasa de crecimiento se obtuvo en *Chlorella autotrophica* (1.327 divisiones día⁻¹) con respecto a las otras especies evaluadas en este trabajo. Esta especie presentó una menor cantidad de días en fase exponencial y presentó el valor significativamente mayor de Chl-a (961.47 ± 67.35 mg L⁻¹).

La especie *Dunaliella bardawil* produjo la mayor cantidad de carotenoides (2244.76 ± 71.11 µg L⁻¹). Lo cual la perfila como potencial para la producción de este pigmento, mismo que ha sido previamente reportado en el género.

Las condiciones de cultivo de las diez especies de microalga resultaron ser estresantes para la mayoría de las especies, ya que los valores de máxima producción fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm) se presentaron por debajo del valor óptimo indicado de 0.50. Solo las especies *Tetraselmis suecica*, *Chlorella autotrophica* y *Heterococcus* sp. lograron alcanzar este valor con eficiencias cuánticas de entre 0.50 y 0.53.

El mayor contenido de lípidos se presentó en *Dunaliella bardawil* ($38.92 \pm 2.9\%$), sin embargo, los valores en los otros parámetros de crecimiento no fueron los adecuados para considerar a esta especie potencial productora de biodiésel.

La mayor proporción del ácido graso saturado C16:0, el cual se ha reportado como el mejor ácido graso para la producción de biodiesel, se obtuvo en *Tetraselmis suecica* (30.41%), sin embargo, también obtuvo un mayor porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados (41.83%), lo cual no es deseable en especies productoras de biodiésel.

Las cianobacterias estudiadas en este trabajo, obtuvieron porcentajes de entre 22.76% a 35.30% en el ácido graso C16:0, no obstante, en la mayoría de los casos, ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linolénico y linoleico presentaron un valor aún mayor, lo que no las hace adecuadas para la producción de biodiésel.

Chlorella autotrophica fue seleccionada como la especie para ser inducida a sobreproducción de lípidos, esto debido a su mayor tasa de crecimiento, alto contenido de ácidos grasos saturados (40.97%) y bajo contenido de poliinsaturados (2.90%), mayor valor en productividad de biomasa (0.213 ± 0.006 g L⁻¹ día⁻¹) y lípidos (0.030 ± 0.001 g L⁻¹ día⁻¹), así como el mayor número de cetanos; características que la perfilan como especie con muy alto potencial en la producción de biodiésel.

Los resultados indican que la especie *Chlorella autotrophica* es halotolerante y que la concentración de células, peso seco total y de cenizas tuvo un incremento en el ensayo de salinidad, con valores de más del doble de lo obtenido en el ensayo de selección de especie, sin embargo, se presentó una disminución en la tasa de crecimiento.

El mayor porcentaje de lípidos en *Chlorella autotrophica* se obtuvo el día 5 para el tratamiento de estrés por salinidad con 30 g L⁻¹ de NaCl (43.88 ± 3.69%). Para todos los tratamientos de estrés por salinidad en *Chlorella autotrophica* se observó un incremento de proteínas y un decremento en carbohidratos, esto con respecto a lo obtenido en el ensayo de bioprospección para esta especie.

Para los tratamientos de estrés por salinidad en *Chlorella autotrophica*, se obtuvo la mayor proporción de ácidos grasos saturados, con respecto a los monosaturados y poliinsaturados. Siendo esta proporción de ácidos grasos saturados evaluados la que resultó en un número de cetanos que superó el valor mínimo establecido en las normas ASTM D6751 y EN 14214.

Al ser inducida a estrés por salinidad *Chlorella autotrophica* presentó un incremento en la productividad de biomasa, pero sin incremento significativo en la productividad de lípidos y el número de cetanos.

Capítulo 6. Recomendaciones

- Realizar cultivos de *C. autotrophica* en diferentes irradiancias para evaluar el crecimiento y composición con el fin de determinar el valor óptimo para cultivos de producción de biodiésel.
- Realizar cultivos de *C. autotrophica* en agua de mar y evaluar las características de la biomasa y su potencial uso en la producción de biodiesel.
- Determinar otros parámetros de calidad de biodiesel mediante instrumentos y métodos descritos en normas internacionales.
- Producir biodiésel para analizar su composición y determinar su calidad en estado puro (B100) y en mezclas (Ej. B20) por medio de espectroscopia infrarrojo.
- Utilizar el biodiesel producido en un motor diésel para evaluar su rendimiento y las emisiones generadas.

Literatura citada

- Ahmad, I., Hellebust, J. A. 1984. Osmoregulation in the extremely euryhaline marine micro-alga *Chlorella autotrophica*. *Plant Physiology*, 74(4), 1010–1015. doi:10.1104/pp.74.4.1010
- Alam, M. M., Mumtaz, A. S., Russell, M., Grogger, M., Veverka, D., Hallenbeck, P. C. 2019. Isolation and characterization of microalgae from diverse Pakistani habitats: Exploring third-generation biofuel potential. *Energies*, 12(14), 2660. doi:10.3390/en12142660
- Anand, V., Kashyap, M., Samadhiya, K., Ghosh, A., Kiran, B. 2019. Salinity driven stress to enhance lipid production in *Scenedesmus vacuolatus*: A biodiesel trigger? *Biomass and Bioenergy*, 127, 105252. doi:10.1016/j.biombioe.2019.05.021
- Araujo, G. S., Matos, L. J. B. L., Gonçalves, L. R. B., Fernandes, F. A. N., Farias, W. R. L. 2011. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*, 102(8), 5248–5250. doi:10.1016/j.biortech.2011.01.089
- Arias-Peñaranda, M. T., Cañizares-Villanueva, R. O., Martínez-Roldán, A. D. J. 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1) 43-68.
- Barati, B., Lim, P. E., Gan, S.-Y., Poong, S. W., Phang, S. M., Beardall, J. 2018. Effect of elevated temperature on the physiological responses of marine *Chlorella* strains from different latitudes. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 1–13. doi:10.1007/s10811-017-1198-z
- Begum, H., Yusoff, F. M., Banerjee, S., Khatoon, H., Shariff, M. 2016. Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209–2222. doi:10.1080/10408398.2013.764841
- Bhosale, R. A., Rajabhoj, M. P., Chaugule, B. B. 2010. *Dunaliella salina* Teod. as a prominent source of eicosapentaenoic acid. *International Journal on Algae*, 12(2), 185–189. doi:10.1615/InterJAlgae.v12.i2.70
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R. H., Janssen, M. 2013. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research*, 2(4), 333-340. doi:10.1016/j.algal.2013.09.004
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. doi:10.1139/o59-099
- Brennan, L., 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), 557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Campenni', L., Nobre, B. P., Santos, C. A., Oliveira, A. C., Aires-Barros, M. R., Palavra, A. M. F., Gouveia, L. 2013. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1383–1393. doi:10.1007/s00253-012-4570-6

- Chauton, M. S., Reitan, K. I., Norsker, N. H., Tveterås, R., Kleivdal, H. T. 2015. A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. *Aquaculture*, 436, 95–103. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.10.038
- Chen, B., Wan, C., Mehmood, M. A., Chang, J.-S., Bai, F., Zhao, X. 2017. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. *Bioresource Technology*, 244, 1198–1206. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.170
- Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R. D., Drogui, P., Surampalli, R. Y. 2018. The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 336–346. doi:10.1016/j.rser.2018.03.073
- Chen, W., Wang, Y., Han, D., Zhu, X., Xie, S., Han, D., Hu, Q. 2019. Two filamentous microalgae as feed ingredients improved flesh quality and enhanced antioxidant capacity and immunity of the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture Nutrition*, 25(5), 1145–1155. doi:10.1111/anu.12930
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Chtourou, H., Dahmen, I., Jebali, A., Karray, F., Hassairi, I., Abdelkafi, S., Ayadi, H., Sayadi, S., Dhouib, A. 2015. Characterization of *Amphora* sp., a newly isolated diatom wild strain, potentially usable for biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(7), 1381–1392. doi:10.1007/s00449-015-1379-6
- Cobos-Ruiz, M., Paredes-Rodríguez, J. D., Castro-Gómez, J. C. 2015. Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1). doi:10.15446/abc.v21n1.47439
- Cobos, M., Paredes, J., Maddox, J., Vargas-Arana, G., Flores, L., Aguilar, C., Marapara, J., Castro, J. 2017. Isolation and characterization of native microalgae from the Peruvian Amazon with potential for biodiesel production. *Energies*, 10(2), 224. doi:10.3390/en10020224
- Conley, S. P. 2012. Biodiesel Quality: is All Biodiesel Created equal? *BioEnergy*, ID-338, 1–4.
- Correa-Reyes, J. G., Sánchez-Saavedra, M.P., Viana, M. T., Flores-Acevedo, N., Vásquez-Peláez, C. 2009. Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Journal of Applied Phycology*, 21(4), 387–393. doi:10.1007/s10811-008-9381-x
- Eilers, P. H. C., Peeters, J. C. H. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*, 42(3–4), 199–215. doi:10.1016/0304-3800(88)90057-9
- Danesh, A. F., Ebrahimi, S., Salehi, A., Parsa, A. 2017. Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae. *Biochemical Engineering Journal*, 125, 56–64. doi:10.1016/j.bej.2017.05.017
- Fernández-Linares, L. C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., Badillo-Corona, J. A. 2012. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8(3), 101–115.

- Fogg, C. E., Thake, B. 1987. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. The University of Wisconsin Press: Wisconsin. pp. 269.
- Folch, J., Lee, M., Sloane-Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, 22, 477–509.
- Francisco, É. C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E., Franco, T. T. 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(3), 395–403. doi:10.1002/jctb.2338
- Furnas, M. J. 1990. In situ growth rates of marine phytoplankton: approaches to measurement, community and species growth rates. *Journal of Plankton Research*, 12(6), 1117–1151. doi:10.1093/plankt/12.6.1117
- Gong, Y., Miao, X. 2019. Short chain fatty acid biosynthesis in microalgae *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Marine Drugs*, 17(5), 255. doi:10.3390/md17050255
- Gopinath, A., Puhan, S., Nagarajan, G. 2009. Relating the cetane number of biodiesel fuels to their fatty acid composition: A critical study. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: Journal of Automobile Engineering*, 223(4), 565–583. doi:10.1243/09544070JAUTO950
- Gour, R. S., Garlapati, V. K., Kant, A. 2020. Effect of salinity stress on lipid accumulation in *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.: Feasibility of stepwise culturing. *Current Microbiology*, 77(5), 779–785. doi:10.1007/s00284-019-01860-z
- Greenwell, H. C., Laurens, L. M. L., Shields, R. J., Lovitt, R. W., Flynn, K. J. 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(46), 703–726. doi:10.1098/rsif.2009.0322
- Guillard, R. R. L., Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula Confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229–239. doi:10.1139/m62-029
- Hassan, M. H., Kalam, M. A. 2013. An overview of biofuel as a renewable energy source: Development and Challenges. *Procedia Engineering*, 56, 39–53. doi:10.1016/j.proeng.2013.03.087
- He, Q., Yang, H., Wu, L., Hu, C. 2015. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, 191, 219–228. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.021
- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244–252. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.133
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54(4), 621–639. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x

- Huang, S. T., Goh, J. L., Ahmadzadeh, H., Murry, M. A. 2019. A rapid sampling technique for isolating highly productive lipid-rich algae strains from environmental samples. *Biofuel Research Journal*, 6(1), 920–926. doi:10.18331/BRJ2019.6.1.3
- Hultberg, M., Jönsson, H. L., Bergstrand, K. J., Carlsson, A. S. 2014. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 159, 465–467. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.092
- Ishika, T., Laird, D. W., Bahri, P. A., Moheimani, N. R. 2019. Co-cultivation and stepwise cultivation of *Chaetoceros muelleri* and *Amphora* sp. for fucoxanthin production under gradual salinity increase. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1535–1544. doi:10.1007/s10811-018-1718-5
- Islam, M. A., Heimann, K., Brown, R. J. 2017. Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1160–1170. doi:10.1016/j.rser.2017.05.041
- Jiménez-Valera, S. 2016. Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. 57 pp.
- Jiménez-Valera, S., Sánchez-Saavedra, M. 2016. Growth and fatty acid profiles of microalgae species isolated from the Baja California Península, Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(4), 689–702. doi:10.3856/vol44-issue4-fulltext-4
- Kakarla, R., Choi, J. W., Yun, J. H., Kim, B. H., Heo, J., Lee, S., Cho, D. H., Ramanan, R., Kim, H. S. 2018. Application of high-salinity stress for enhancing the lipid productivity of *Chlorella sorokiniana* HS1 in a two-phase process. *Journal of Microbiology*, 56(1), 56–64. doi:10.1007/s12275-018-7488-6
- Kim, B. H., Ramanan, R., Kang, Z., Cho, D. H., Oh, H. M., Kim, H. S. 2016. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity. *Biomass and Bioenergy*, 85, 300–305. doi:10.1016/j.biombioe.2015.12.026
- Kim, D. W., Shin, W.-S., Sung, M. G., Lee, B., Chang, Y. K. 2019. Light intensity control as a strategy to improve lipid productivity in *Chlorella* sp. HS2 for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 126, 211–219. doi:10.1016/j.biombioe.2019.05.014
- Knothe, G. 2012. Fuel properties of highly polyunsaturated fatty acid methyl esters. Prediction of fuel properties of algal biodiesel. *Energy & Fuels*, 26(8), 5265–5273. doi:10.1021/ef300700v
- Lee, K., Eisterhold, M., Rindi, F., Palanisami, S., Nam, P. 2014. Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 5(2), 333. doi:10.4103/0976-9668.136178
- Lee, K. K., Lim, P. E., Poong, S. W., Wong, C. Y., Phang, S. M., Beardall, J. 2018. Growth and photosynthesis of *Chlorella* strains from polar, temperate and tropical freshwater environments under temperature stress. *Journal of Oceanology and Limnology*, 36(4), 1266–1279. doi:10.1007/s00343-018-7093-x
- Llanes-Cedeño, E. A., Rocha-Hoyos, J., Salazar-Alvear, P., Medrano-Barboza, J. 2017. Producción e Impacto del Biodiesel: Una Revisión. *INNOVA Research Journal*, 2(7), 59–76. doi:10.33890/innova.v2.n7.2017.229

- López-Figueroa, F. 2018. Curso de fotobiología y biotecnología de algas y cianobacterias: aplicaciones cosmeceúticas. Universidad de Málaga, España y CICESE. 29 de octubre al 2 de noviembre. Ensenada, Baja California, México.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Mahmoud, E. A., Farahat, L. A., Abdel Aziz, Z. K., Fatthallah, N. A., Salah El Din, R. A. 2015. Evaluation of the potential for some isolated microalgae to produce biodiesel. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(1), 97–101. doi:10.1016/j.ejpe.2015.02.010
- Malara, G., R. Charra. 1972a. Dosages des glucides particuliers de phytoplankton selon la méthode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail, 6, pp.12.
- Malara, G., R. Charra. 1972b. Dosages des proteines particuliers selon la méthode de Lowry. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail, 6, pp.11.
- Mandotra, S. K., Kumar, P., Suseela, M. R., Nayaka, S., Ramteke, P. W. 2016. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology*, 201, 222–229. doi:10.1016/j.biortech.2015.11.042
- Mathimani, T., Uma, L., Prabakaran, D. 2018. Formulation of low-cost seawater medium for high cell density and high lipid content of *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 using central composite design in biodiesel perspective. *Journal of Cleaner Production*, 198, 575–586. doi:10.1016/j.jclepro.2018.06.303
- Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A., Pelka, J. R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 38(3), 514–515. doi:10.1021/ac60235a044
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Adholeya, A. 2016. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00546
- Mishra, N., Prasad, S. M., Mishra, N. 2019. Influence of high light intensity and nitrate deprivation on growth and biochemical composition of the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62. doi:10.1590/1678-4324-2019180398
- Moheimani, N. R. 2013. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 387–398. doi:10.1007/s10811-012-9873-6
- Muriana, V.M. 2016. Planta de producción de biodiésel a partir de microalgas: Sevilla, España. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad de Sevilla. pp. 28.
- Nagappan, S., Devendran, S., Tsai, P.-C., Dahms, H.-U., Ponnusamy, V. K. 2019. Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. *Fuel*, 252, 339–349. doi:10.1016/j.fuel.2019.04.138
- Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., Vich, D. V., de Carvalho, G. C., Nascimento, M. A. 2013. Screening microalgae strains for biodiesel production:

- lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *BioEnergy Research*, 6(1), 1–13. doi:10.1007/s12155-012-9222-2
- Nordin, N., Yusof, N., Md Nadzir, S., Mohd Yusoff, M. Z., Hassan, M. A. 2019. Effect of photo-autotrophic cultural conditions on the biomass productivity and composition of *Chlorella vulgaris*. *Biofuels*, 1–11. doi:10.1080/17597269.2019.1652787
- Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20(4–6), 459–466. doi:10.1016/S1389-0344(03)00076-5
- Osundeko, O., Davies, H., Pittman, J. K. 2013. Oxidative stress-tolerant microalgae strains are highly efficient for biofuel feedstock production on wastewater. *Biomass and Bioenergy*, 56, 284–294. doi:10.1016/j.biombioe.2013.05.027
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A., Mishra, S. 2015. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 189, 341–348. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.017
- Pande, S. V., Khan, R. P., Venkitasubramanian, T. A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*, 6(5), 415–423. doi:10.1016/0003-2697(63)90094-0
- Pandey, M. K., Dasgupta, C. N., Mishra, S., Srivastava, M., Gupta, V. K., Suseela, M. R., Ramteke, P. W. 2019. Bioprospecting microalgae from natural algal bloom for sustainable biomass and biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(13), 5447–5458. doi:10.1007/s00253-019-09856-2
- Pandit, P. R., Fulekar, M. H., Karuna, M. S. L. 2017. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13437–13451. doi:10.1007/s11356-017-8875-y
- Parsons, T. R., Maita, Y., Lalli, C. M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford. pp. 173. doi:10.1016/C2009-0-07774-5
- Patel, V. K., Sundaram, S., Patel, A. K., Kalra, A. 2018. Characterization of seven species of cyanobacteria for high-quality biomass production. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(1), 109–121. doi:10.1007/s13369-017-2666-0
- Poh, Z. L., Kadir, W. N. A., Lam, M. K., Uemura, Y., Suparmaniam, U., Lim, J. W., Show, P. L., Lee, K. T. 2020. The effect of stress environment towards lipid accumulation in microalgae after harvesting. *Renewable Energy*, 154, 1083–1091. doi:10.1016/j.renene.2020.03.081
- Pugkaew, W., Meetam, M., Yokthongwattana, K., Leeratsuwan, N., Pokethitiyook, P. 2019. Effects of salinity changes on growth, photosynthetic activity, biochemical composition, and lipid productivity of marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 969–979. doi:10.1007/s10811-018-1619-7
- Qari, H. A., Oves, M. 2020. Fatty acid synthesis by *Chlamydomonas reinhardtii* in phosphorus limitation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 52(1), 27–38. doi:10.1007/s10863-019-09813-8

- Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F. 2017. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 765–773. doi:10.1016/j.rser.2017.05.202
- Ratha, S. K., Prasanna, R. 2012. Bioprospecting microalgae as potential sources of “Green Energy”—challenges and perspectives (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(2), 109–125. doi:10.1134/S000368381202010X
- Renaud, S. M., Parry, D. L. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 6, 347–356. doi:10.1007/BF02181949
- Rocha, S., Candia, O., Valdebenito, F., Espinoza-Monje, J. F., Azócar, L. 2020. Biomass quality index: Searching for suitable biomass as an energy source in Chile. *Fuel*, 264, 116820. doi:10.1016/j.fuel.2019.116820
- Romero-Romero, C. C., Sánchez-Saavedra, M. del P. 2017. Effect of light quality on the growth and proximal composition of *Amphora* sp. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1203–1211. doi:10.1007/s10811-016-1029-7
- Ruíz-Marín, A., Mendoza-Espinosa, L. G., Stephenson, T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1), 58–64. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.076
- Sánchez-Alejandro, F., Sánchez-Saavedra, M. P. 2015. Characterization of the growth, biochemical composition, and nutrient utilization of the cyanobacterium *Geitlerinema lemmermannii*. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1177–1184. doi:10.1007/s10811-014-0416-1
- Sánchez-Saavedra, M.P., Castro-Ochoa, F.Y. 2020. Bioprospecting for lipid production of eleven microalgae strains for sustainable biofuel production. *BioEnergy Research* (en revisión).
- Seyhaneyildiz Can, Ş., Cirik, S., Koru, E., Turan, G., Tekoğul, H., Subakan, T. 2016. Effects of salinity, light and nitrogen concentration on growth and lipid accumulation of the green algae *Dunaliella Bardawil*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(5), 1437-1447.
- Santhakumaran, P., Kookal, S. K., Mathew, L., Ray, J. G. 2019. Bioprospecting of three rapid-growing freshwater green algae, promising biomass for biodiesel production. *BioEnergy Research*, 12(3), 680–693. doi:10.1007/s12155-019-09990-9
- Sarpal A.S., Teixeira C.M.L.L., Costa C.R.I., Ferreira L.C., Silva R.M.P., Cunha S.V., Daroda R.J. 2019. Evaluation of low cost medium for the production of lipids for biodiesel and carotenoids from microalgae *Tetraselmis aff Chuii*. *World Journal Aquaculture Research Development*, 1(1): 27-35.
- Sirisuk, P., Ra, C.-H., Jeong, G.-T., Kim, S.-K. 2018. Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. *Bioresource Technology*, 253, 175–181. doi:10.1016/j.biortech.2018.01.020
- Skrupski, B., Wilson, K. E., Goff, K. L., Zou, J. 2013. Effect of pH on neutral lipid and biomass accumulation in microalgal strains native to the Canadian prairies and the Athabasca oil sands. *Journal of Applied Phycology*, 25(4), 937–949. doi:10.1007/s10811-012-9930-1

- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-344. En: Stein, J. (Ed.). Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge University Press, London. pp. 448.
- Statsoft, 2015. StatSoft Announces Version 10 of Statistica (World Wide Web log), Stat soft: Tulsa.
- Sukačová, K., Búzová, D. Červený, J. 2020. Biphasic optimization approach for maximization of lipid production by the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Folia Microbiol 65, 901–908. doi:10.1007/s12223-020-00800-w
- Taparia, T., Mvss, M., Mehrotra, R., Shukla, P., Mehrotra, S. 2016. Developments and challenges in biodiesel production from microalgae: A review. Biotechnology and Applied Biochemistry, 63(5), 715–726. doi:10.1002/bab.1412
- Ummalyma, S. B., Sukumaran, R. K., Pandey, A. 2020. Evaluation of freshwater microalgal isolates for growth and oil production in seawater medium. Waste and Biomass Valorization, 11(1), 223–230. doi:10.1007/s12649-018-0393-8
- Vega, B. A., Esquivel, B. C., Voltolina, D. 2017. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. En: Arredondo Vega B. O., Voltolina D., Zenteno Savín T., Arce Montoya M., Gómez Anduro G. A. (Eds.) Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, CONACYT, México. pp. 51-54
- Vidyashankar, S., VenuGopal, K. S., Swarnalatha, G. V., Kavitha, M. D., Chauhan, V. S., Ravi, R., Bansal, A. K., Singh, R., Pande, A., Ravishankar, G. A., Sarada, R. 2015. Characterization of fatty acids and hydrocarbons of chlorophycean microalgae towards their use as biofuel source. Biomass and Bioenergy, 77, 75–91. doi:10.1016/j.biombioe.2015.03.001
- Wang, T., Ge, H., Liu, T., Tian, X., Wang, Z., Guo, M., Chu, J., Zhuang, Y. 2016. Salt stress induced lipid accumulation in heterotrophic culture cells of *Chlorella protothecoides*: Mechanisms based on the multi-level analysis of oxidative response, key enzyme activity and biochemical alteration. Journal of Biotechnology, 228, 18–27. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.04.025
- Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture, 60(3–4), 231–241. doi:10.1016/0044-8486(87)90290-0
- Xia, L., Ge, H., Zhou, X., Zhang, D., Hu, C. 2013. Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. Bioresource Technology, 144, 261–267. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.112
- Xu, S. J., Wu, K., Chan, S. C., Yau, Y., Chan, K., Lee, F. W. 2020. Investigation of growth, lipid productivity, and fatty acid profiles in marine bloom-forming dinoflagellates as potential feedstock for biodiesel. Journal of Marine Science and Engineering, 8(381), 6–9. doi:10.3390/jmse8060381
- Yodsuwan, N., Sawayama, S., Sirisansaneeyakul, S. 2017. Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Agriculture and Natural Resources, 51(3), 190–197. doi:10.1016/j.anres.2017.02.004
- Yuan, W., Yang, F. 2017. Chemical conversion process for biodiesel production. En: Cheng, J. (Ed.), Biomass to renewable energy processes, Second Edition. Taylor & Francis. Boca Raton. pp. 299-374.

- Yuan, Y., Li, X., Zhao, Q. 2019. Enhancing growth and lipid productivity in *Dunaliella salina* under high light intensity and nitrogen limited conditions. *Bioresource Technology Reports*, 100211. doi:10.1016/j.biteb.2019.100211
- Zar, J. H. 2010. *Bioestatistical analysis* (5ta ed.). Prentice Hall: New Jersey. pp. 947
- Zhan, J., Zhang, Q., Qin, M., Hong, Y. 2016. Selection and characterization of eight freshwater green algae strains for synchronous water purification and lipid production. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 10(3), 548–558. doi:10.1007/s11783-016-0831-4
- Zhu, S., Feng, P., Feng, J., Xu, Jin, Wang, Z., Xu, Jingliang, Yuan, Z. 2018. The roles of starch and lipid in *Chlorella* sp. during cell recovery from nitrogen starvation. *Bioresource Technology*, 247, 58–65. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.120
- Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., Yuan, Z. 2014. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 152, 292–298. doi:10.1016/j.biortech.2013.10