



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

Evaluación del Potencial de Cultivos Marinos Microalgales  
Mixtos para la Producción de Biodiesel

Tesis que presenta

**Biol. Karyl Guzmán Ancona**

En opción al título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE**

Mérida, Yucatán, México

Diciembre, 2015

## INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	4
ANTECEDENTES.....	4
II. HIPÓTESIS.....	13
III. JUSTIFICACIÓN.....	13
IV. OBJETIVOS.....	14
V. METODOLOGÍA.....	15
V.4.1 Extracción de ADN metagenómico y amplificación de regiones conservadas.....	16
V.4.3 Separación de fragmentos por Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE). .....	17
V.4.4 Análisis de las bandas obtenidas de los oligonucleótidos (Euk1A -Euk516r-GCb) y (CYA359F- CYA781Rb).....	18
V.5.1 Extracción de lípidos. ....	18
V.5.2 Transesterificación .....	20
V.5.3 Cromatografía en capa fina .....	20
V.5.4 Análisis del perfil lipídico.....	20
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
VI.3.1 Extracción de ADN metagenómico. ....	24
VI.3.2 Amplificación de regiones conservadas.....	25
VI.3.3 Separación de amplicones por DGGE.....	29
VI.5 Caracterización lipídica. ....	34
VI.5.1 Extracción lipídica y transesterificación. ....	34

VI.5.2 Análisis.....	35
REFERENCIA.....	40
Anexos.....	49
Anexo	
1.....	¡Error!
<b>Marcador no definido.</b>	
Anexo	
2.....	¡Error!
<b>Marcador no definido.</b>	
Anexo 3.....	50
Anexo	
3.....	¡Error!
<b>Marcador no definido.</b>	
Anexo	
3.....	¡Error!
<b>Marcador no definido.</b>	
Anexo	
3.....	¡Error!
<b>Marcador no definido.</b>	
Anexo	
3.....	¡Error!
<b>Marcador no definido.</b>	

## LISTADO DE TABLAS

Tabla I-1 Propiedades de los ácidos grasos que le confieren al biodiesel .....	5
Tabla II-2. Comparación de los rendimientos de aceite de cultivos oleaginosos .....	10
Tabla V.2 Parámetros de electroforesis para DGGE.....	17
Tabla VI.3. Cuantificación de ADN metagenómico de los cultivos A y C.....	25
Tabla VI.4. OTU del oligonucleótido Euk1A-Euk516r+GG y CYA359F-CYA781Rb+GC	30
Tabla VI.4. OTU del oligonucleótido CYA359F-CYA781Rb+GC. ....	31
Tabla VI.4. Identificación de FAME de acuerdo al tiempo de retención.....	35
Tabla VI.5. FAME obtenidos de los extractos lipídicos de los cultivos A y C.....	36

## LISTADO DE FIGURAS

Figura I-1. Reacción de transesterificación .....	4
Figura I-1 Esquema de la biosíntesis de lípidos en microalgas .....	8
Figura V.1. Purificación del extracto lipídico.....	19
Figura VI.2.Cultivos A, B, y C día 0 en medio BG-11. ....	22
Figura VI.3. Cultivos A, B y C, con 21 días de crecimiento en medio BG-11.....	23
Figura VI.4. Biorreactor con el cultivo A. ....	24
Figura VI.5.ADN metagenómico de los cultivos.....	25
Figura VI.6. Amplificación con oligonucleótidos CYA359F-CYA781Rb .....	26
Figura VI.7. Amplificación con oligonucleótidos Euk1A-Euk516r.....	27
Figura VI.8. Reamplificación con oligonucleótidos CYA359F-CYA781Rb .....	28
Figura VI.9.Reamplificación con oligonucleótidos Euk1A-Euk516r .....	28
Figura VI.10. Detección de bandas por QuantityOne. ....	30
Figura VI.11 Dendograma de disimilitud de procariotas. ....	32
Figura VI.11. Placas de cromatografía de capa fina.....	34
Figura VI.12. Porcentaje de ácidos grasos presentes cultivo A y cultivo C.....	38

## RESUMEN

El biodiesel es una alternativa al combustible convencional producido a partir de triacilglicéridos obtenidos de microalgas tanto de agua dulce o marinas, debido a que ofrecen mayores rendimientos que las plantas superiores. Los cultivos microalgales marinos mixtos poseen gran potencial en la disminución de costos en el mantenimiento axénico de los cultivos y en la gran resistencia a los cambios en los parámetros de cultivo. El presente trabajo implicó la constitución de tres cultivos A, B y C, a partir de la colecta y cultivo en medio "f/2", de agua marina de tres sitios del puerto de Progreso, Yucatán. Únicamente los cultivos A y C prosperaron, para posterior identificación de las especies de microalgas presentes mediante DGGE. El cultivo A, estuvo constituido por 5 especies y el C por 13 especies de cianobacterias y microalgas eucariotas. Sin embargo, las especies son específicas a los cultivos mixtos. El análisis de similitud entre los cultivos A y C, indicó que la composición microalgal de los cultivos es completamente diferente. El perfil lipídico de las especies cultivadas, resolvió que el cultivo A está conformado por 51.95% de C16:0, 16.54% de C18:0, 28.89% de C18:1. Mientras que el cultivo C posee 72.32% de C16:0, 6.07% de C17:0, 8.26% de C18:0 y 6.59% de C18:1. La constitución lipídica de ambos extractos transesterificados presentó porcentajes de ésteres de metilo de ácidos grasos deseables para la constitución de biodiesel. Los resultados obtenidos permitieron determinar que los cultivos mixtos, son una alternativa atractiva a los cultivos unialgales, debido a que además de poseer perfiles lipídicos adecuados para producción de biodiesel, tienen una mayor capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo *in vitro*, en comparación con cultivos unialgales, además de una mayor resistencia a la contaminación bacteriana.

## ABSTRACT

Biodiesel is an alternative to conventional fuel that can be produced from triglycerides obtained from microalgae fresh or sea water, because they offer better yields than higher plants. Mixed marine microalgal cultures have great potential in reducing costs in axenic culture maintenance and high resistance to changes in the parameters of culture. This work involved the collection, filtration and culture on "f / 2" seawater two sites in the port of Progreso, Yucatan. Both cultures are mixed due to the presence of prokaryotic and eukaryotic microalgae. Identifying the species of cultivated microalgae by DGGE. The similarity analysis of the cultures proves the microalgal composition is completely different between the cultures. The lipid profile of the cultivated species consists of 51.95% of C16: 0, 16.54% of C18: 0 and 28.89% of C18: 1. Whereas culture C is 72.32% of C16: 0, 7.6% of C17: 0, 26.8% of C18: 0 and 6.59% C18: 1. Both lipid extracts percentages presented fatty acids methyl ester desirable for biodiesel. The results indicated that the mixed cultures, are an attractive alternative crops compared to unialgal because, besides having suitable lipid profiles for biodiesel, are better able to adapt on different culture conditions in vitro, additionally mixed marine cultures presents a greater resistance to bacterial contamination.

## INTRODUCCIÓN

La creciente demanda mundial de energía, en combinación con los problemas ocasionados por el uso de combustibles derivados del petróleo y el incremento en el costo de este último, han derivado en la búsqueda de fuentes alternas sustentables capaces de contribuir a los requerimientos energéticos actuales[1]. En este sentido, el biodiesel surge como una opción con gran potencial debido a que se produce utilizando materias primas renovables y posee características fisicoquímicas similares al diésel de petróleo[2]. Dentro de las materias primas a utilizar, destacan las formas de vida fotosintéticas por su capacidad para utilizar la energía solar y captar CO<sub>2</sub>, para sintetizar compuestos orgánicos energéticos, de manera simultánea a la mitigación de los gases de efecto invernadero. El cultivo de microalgas marinas, es una alternativa atractiva, debido a que no compiten por recursos para el consumo humano y representan una fuente potencial para la producción de biodiesel. La constitución de cultivos microalgales mixtos presenta grandes ventajas como resistencia a la contaminación en comparación con el cultivo unialgal, mejor adaptación a cambios en parámetros de cultivo, tales como intensidad lumínica, salinidad, etc. Además de la relación directamente proporcional entre la riqueza de especies en el cultivo, el incremento en la biomasa y el contenido lipídico específico que se ha observado en cultivos mixtos [3].

El presente trabajo implicó coleccionar, identificar y evaluar el potencial de cultivos microalgales mixtos para producir biodiesel.



# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### I.1 Biodiesel

El biodiesel es una fuente de energía renovable cuyo suministro puede ser sostenible. Químicamente, se define como una mezcla de ésteres alquílicos o metílicos de ácidos grasos[3]. El proceso químico más común para la obtención del biodiesel es la transesterificación, que consiste en reaccionar triacilglicéridos con alcohol monohídrico de cadena corta que en presencia de un catalizador, a temperaturas elevadas para formar ácidos grasos de metil-éster (FAME) y glicerol como subproducto (Figura I.1)[4].

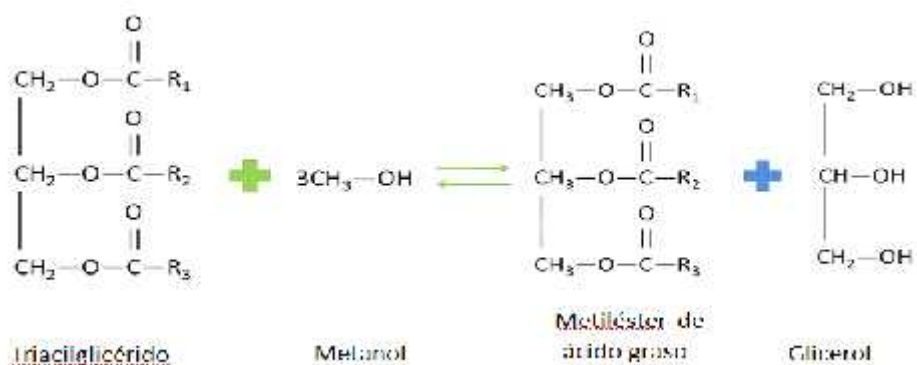


Figura I-1. Reacción de transesterificación

Fisicoquímicamente, el biodiesel presenta importantes propiedades similares al petrodiesel: 1) la capacidad calorífica, con valores de 34 -48 MJ/kg; mientras que petrodiesel posee 42.7 MJ/kg; y 2) el número de cetano, el cual puede ser mayor en biodiesel y se refiere a una medida del retraso entre la compresión e ignición[5]. Esta última propiedad refleja la calidad del combustible, debido a que un número mayor se asocia con un menor tiempo de ignición, dando como resultado una combustión más completa. La viscosidad es otra importante propiedad en cuanto al uso y desempeño del biodiesel. La ASTM establece valores de viscosidad de 1.9 -6.0  $\text{mm}^2/\text{s}$ .

Las propiedades que exhibe el biodiesel son reflejo de los ácidos grasos que lo constituyen (Tabla I.1), siendo las características más importantes: largo de la cadena carbonada, grado de insaturación y ramificación[6].

**Tabla I-1** Propiedades de los ácidos grasos que le confieren al biodiesel [7]

<b>FAME</b>	<b>Punto de fusión°C</b>	<b>Punto de ebullición°C</b>	<b>Viscosidad (mm<sup>2</sup>/s)</b>	<b>Número de cetano</b>	<b>Densidad g/cm<sup>3</sup></b>
<b>C12:0</b>	43.2	298.9	2.43	67	0.880
<b>C14:0</b>	54.4	250.5	3.30	66	0.862
<b>C16:0</b>	62.9	351.0	4.38	86	0.853
<b>C16:1</b>	-0.1	-	3.67	51	0.894
<b>C18:0</b>	69.6	383.0	5.85	101	0.847
<b>C18:1</b>	13.1	360.0	4.51	59	0.895

Las propiedades antes mencionadas, han promovido la producción acelerada del biodiesel a nivel mundial, incrementando dramáticamente los precios del mismo. Las alternativas para que el uso del biodiesel sea económicamente competitivo con relación al petrodiesel[8], ha conducido a la exploración de diversas materias primas: aceite de cocina residual, grasa animal, lípidos extraídos de plantas superiores como la soya, las semillas de girasol, colza, *Jatropha* sp. y palma aceitera[9]. Otra fuente que ha sido poco explotada y considerada de gran potencial son los lípidos obtenidos de microorganismos oleaginosos[1].

## **I.2 Producción de biodiesel a partir de microorganismos.**

Los microorganismos con capacidad para producir aceite, denominados microorganismos oleaginosos, son aquellos que presentan contenido de ácidos grasos excedente en 20% al contenido celular total e incluye especies de hongos, levaduras, bacterias, diatomeas, microalgas y cianobacterias[9]. Las ventajas del uso de microorganismos para producir biodiesel son, el rendimiento de lípidos, el cual es cien veces mayor por hectárea que el derivado de plantas superiores, además de que el tiempo de duplicación es más corto (días), son de cosecha continua y poseen una estructura celular simple[1].

Diversos microorganismos tales como las levaduras *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Trichosporon pullulan*, y bacterias tales como *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus* sp. Y *Nocardia* sp., son capaces de sintetizar triglicéridos

intracelulares, hasta en un 80% de su peso seco utilizando diversas fuentes de carbono[10].

Por su parte, las microalgas son el grupo más importante de microorganismos acuáticos para la producción de biodiesel, debido a que además de producir rendimientos similares al diésel de petróleo, presentan ventajas ambientales puesto que contribuyen a la reducción por captura de  $\text{CO}_2$ [11].

### **I.3 Microalgas, diatomeas y cianobacterias.**

Las microalgas juegan un papel clave en la producción primaria en los cuerpos de agua como océanos y lagos, siendo la base de la cadena alimenticia. Se les puede encontrar en todos los ecosistemas incluyendo terrestres, distribuidas en un amplio rango de condiciones ambientales[12].

La clasificación taxonómica de las microalgas se basa en diversas características, siendo la principal el tipo de célula que conforma al microorganismo, dividiéndose de este modo en dos grandes grupos: las eucariotas y las procariotas. Técnicamente todas las clases taxonómicas de algas están representadas en el fitoplancton marino. Sin embargo para el tema que nos atañe en el presente trabajo utilizaremos el término microalga para referirnos a aquellos microorganismos fotosintéticos procariotas (Cyanobacteria), y eucariotas (Chlorophyta y Bacillariophyta también conocido como diatomeas)[12][13].

Las cianobacterias son organismos procariotas ancestrales, fotosintéticos y relativamente sencillos, cuyas formas pueden ser filamentosas en cadena, cadenas de células cocoides o células esféricas. Son considerados los organismos más abundantes en el planeta y contribuyen de manera importante a la productividad planctónica marina y a los ciclos de carbono y nitrógeno, mientras que otras especies están asociadas de manera simbiótica con organismos eucariotas[14].

A diferencia de las cianobacterias, las clorofitas poseen células eucariotas. Son un grupo compuesto de microalgas verdes ancestrales, fotosintéticas, unicelulares, con una gran variedad de formas (desde cocoides, ovoides), y tallas (pertenecientes al nano o picoplancton), con o sin flagelos [12].

Las Bacillariofitas o diatomeas son un grupo taxonómico de eucariotas unicelulares cuya característica más importante es la presencia de una pared silíceas que puede tener multitud de variaciones morfológicas y ser muy ornamentada [15]. Dentro de estos tres grupos encontramos a las especies más representativas en cuanto a la producción de biodiesel estudiadas hasta el momento.

Las microalgas están compuestas por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos. Los lípidos, se pueden agrupar en estructurales y de almacenamiento. Algunas especies alcanzan un contenido lipídico del 40% respecto a su peso total [11]. Este contenido lipídico varía dependiendo de las especies y las condiciones de cultivo.

#### **I.4 Lípidos en las microalgas**

Dentro de los metabolitos secundarios, los lípidos desempeñan funciones específicas en la membrana. La mayoría son glicosil-glicéridos, entre los que se encuentran los triglicéridos y ácidos grasos libres, con una longitud de entre 12 y 22 carbonos [16].

En microalgas verdes, la ruta metabólica para la síntesis de ácidos grasos está mediada por los productos de la fotosíntesis NADPH y ATP, los cuales son sustratos del ciclo de Calvin [17]. En el ciclo de Calvin la enzima Rubisco cataliza la conversión de  $\text{CO}_2$  y ribulosa-5-fosfato en dos triosas, las cuales son convertidas subsecuentemente en piruvato y acetil-CoA. Las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas dentro del cloroplasto por acetil-CoA carboxilasa (ACC) para la síntesis de malonil-CoA, esta molécula es transferida a la proteína acarreadora de grupos acilo (ACP) del complejo multi-enzimático sintasa de ácidos grasos (SAG), donde la subunidad cetoacil-ACP sintasa (CAS) cataliza la condensación de malonil-ACP mediante tres reacciones cíclicas: reducción, deshidratación y reducción, condensando el producto con otra molécula de malonil-CoA [18]. De esta manera, se repite este ciclo hasta formar cadenas saturadas de ácido palmítico (C16:0) o esteárico (C18:0) [18] [19], este proceso se puede apreciar en la figura I-1.



**Figura I-1** Esquema de la biosíntesis de lípidos en microalgas[18].

La síntesis y acumulación de lípidos en las microalgas responde a cambios ambientales abióticos, tales como pH, temperatura, salinidad e intensidad lumínica, entre otros [19].Las respuestasa estos cambios se han observado en especies como *Dunaliella*

salinacuyo contenido lipídico representa el 27.1% del peso seco total bajo condiciones de cultivo óptimas [20], contenido lipídico que se ve incrementado hasta un 44% bajo condiciones de estrés por salinidad [21]. La respuesta ante estrés de *Chlorella* sp. también se refleja en un incremento del contenido lipídico total en peso seco que va de 28% en condiciones óptimas, hasta un 46% en condiciones de estrés por limitación de nitrógeno [22]. Sin embargo la respuesta ante estímulos abióticos no solo puede verse reflejada en incremento del contenido lipídico, sino también en la composición de los mismos.

### I.5 Microalgas como materia prima para biodiesel

De acuerdo a las propiedades publicadas por la ASTM (American Society for Testing Materials) el biodiesel derivado de microalgas no solo es similar al petrodiesel, sino que es mejor en algunas propiedades como el punto de ignición (Tabla I.1) [4].

**Tabla II.1.** Comparación entre el biodiesel obtenido a partir de aceites de microalgas y petrodiesel [4].

Propiedades	Valores estándar para biodiesel ASTM	Petrodiesel	Biodiesel a partir de microalgas
Densidad (kgL <sup>-1</sup> )	0.84-0.90	0.838	0.864
Viscosidad (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> , cSt a 40°C)	3.5-6.0	1.9-4.1	5.2
Punto de ignición (°C)	Mínimo 100	75	115
Punto de solidificación (°C)	-	-50 a 10	-12
Punto de congelación en el filtro (°C)	Máximo en verano 0 Máximo en invierno <-15	-3.0 (máximo -6.7)	-11
Acidez (mgKOH/ g)	Máximo 0.5	Máximo 0.5	0.374
Capacidad calorífica	-	40-45	41

Además son especialmente atractivas, debido a que como ya se mencionó, fijan dióxido de carbono, adicionalmente pueden ser cultivadas en agua de desecho o de mar [23]. Se

reportan especies como *Scenedesmusobliquus* cultivada en agua residual derivada de la producción de cerveza, con contenido lipídico de 27% del peso seco [24]. Mientras que otros reportan que se puede alcanzar hasta un 53% bajo condiciones de estrés por nitrógeno en esta misma especie, de los cuales entre el 60-90% pueden ser ácidos grasos neutros transesterificables ideales para la producción de biodiesel [25]. Este porcentaje es mayor a lo reportado para cultivos de plantas superiores como la soya (20%) o la *Jatropha* sp. (30%), especies que se han propuesto como materia prima para la producción de biodiesel con el inconveniente de que su cultivo requeriría el uso de enormes extensiones de terreno fértil, situación que podría conllevar a crisis alimentarias ante la escasez de suelos cultivables [26].

Es por esto que las microalgas están siendo empleadas como materia prima para la producción de biodiesel por su alto contenido de ácidos grasos y rápida producción de biomasa. Se calcula que el aceite de microalgas cultivadas en 8-12 millones de hectáreas de tierra marginal podría reemplazar la demanda de E. U., dejando a disposición 182.11 millones de hectáreas de tierra cultivable para producción alimentaria [27]. Como podemos observar en la tabla II-2, inclusive el cultivo de especies microalgales con bajo contenido lipídico, ofrecería un mejor rendimiento por hectárea que cualquiera de los cultivos de plantas superiores [13].

Tabla II-2. Comparación de los rendimientos de aceite de cultivos oleaginosos [13]

Cultivo	Contenido (% aceite de biomasa seca)	Rendimiento (Litro de aceite/Hectárea por año)	Extensión cultivada (m <sup>2</sup> por año/kg de biodiesel)	Productividad de biodiesel (Kg de biodiesel/Hectárea por año)
Maíz	44	172	66	152
Cáñamo	33	363	31	321
Soya	18	636	18	562
<i>Jatropha</i>	28	741	15	656
Camelina	42	915	12	809
Canola	41	974	12	862
Girasol	40	1,070	11	946
Ricino	48	1,307	9	1,156
Palma aceitera	36	5,366	2	4,747
Microalgas (bajo)	30	58,700	0.2	51,927

contenido de aceite)				
Microalgas (contenido de aceite medio)	50	97,800	0.1	86,515
Microalgas (alto contenido en aceite)	70	136,900	0.1	121,104

El biodiesel derivado de ácidos grasos de microalgas presenta una composición general de 36% de ácido oleico (18:1), 15% de ácido palmítico (16:0), 11% de ácido esteárico (18:0), 7.4% de ácido linoléico (18:2)[28]. Esta composición es variable dependiendo de la especie. Si bien se mencionó antes que la respuesta de las mismas a condiciones de estrés puede resultar en un incremento en la acumulación de lípidos, es importante señalar que también la composición de estos lípidos es susceptible a modificaciones como respuesta a factores abióticos. Por ejemplo la especie *Phaeodactylum tricoratum* condiciones de estrés por falta de nitrógeno e incremento en el pH incrementan su contenido de C16:0 y C18:1, ácidos grasos que confieren propiedades ideales al biodiesel[19].

El interés por consiguiente se ha centrado en encontrar especies con alto contenido lipídico susceptibles de ser incrementado o modificado mediante parámetros en el cultivo, razón por la cual hasta el momento la mayoría de los cultivos de microalgas se han llevado a cabo de manera unialgal, enfrentando problemas de costos excesivos para su producción a gran escala. Por lo que la comercialización del biodiesel derivado de microalgas no es aún una realidad. Una propuesta alterna ante esta situación se puede encontrar en los cultivos mixtos microalgales.

### **1.5 Cultivos mixtos de microalgales**

El cultivo microalgal mixto es aquel en el que se encuentra creciendo más de una especie[2], ofrece atractivas ventajas en su empleo para la producción de biodiesel. Una de ellas es la resistencia a la contaminación en comparación con el cultivo unialgal[2]. Estudios recientes resaltan la importancia de la competencia en el cultivo como factor para incrementar el contenido de lípidos en microalgas marinas[29]. Otra ventaja radica en



la capacidad de los organismos en el cultivo mixto para resistir cambios en parámetros de cultivo, tales como intensidad lumínica, salinidad y temperatura, entre otros. Esto último favorecería la reducción en los costos de mantenimiento, debido a su capacidad diversa de proliferar en un mayor rango de parámetros de cultivo[30].

La más importante de estas ventajas radica principalmente en la relación directamente proporcional entre la riqueza de especies en el cultivo, el incremento en la biomasa y el contenido lipídico específico[30]. Esto es evidente en el estudio realizado por Stockenreiter et al., 2012[31], donde utilizando 23 cepas puras de microalgas, realizó ensambles de 48 comunidades, y comparó las composiciones de éstos contra los monocultivos de las mismas especies. Obteniendo como resultado un incremento en el contenido de lípidos, conforme se incrementaba la riqueza de especies en el cultivo[31].

## **I.8 Identificación de organismos**

Actualmente además de las morfológicas, existen diversas técnicas bioquímicas, microbiológicas y moleculares para la identificación de microorganismos en comunidades microbianas complejas[32]. Estas últimas técnicas se basan en el uso de marcadores taxonómicos específicos tales como la sub-unidad 16S y la subunidad 18S del ARNr[33].

Los oligos CYA359F (forward), con cualquiera de los reverse CYA781R(a) y CYA781R(b) para cianobacterias diseñados por Nübel et al. (1997) amplifican una región específica de 379 bp correspondiente a las regiones variables V3 y V4 del gen 16S rRNA, las cuales proporcionan información filogenética que permiten su uso para la identificación de cianobacterias en comunidades microalgales[34].

Los oligonucleótidos Euk1A- Euk516r amplifican un segmento de 560 bp, se han utilizado en diversos estudios para la identificación de microalgas mediante el empleo de otra técnica conocida como DGGE[35]. La técnica de DGGE por sus siglas en inglés (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) separa productos de PCR en función al número de pares de bases, y a la secuenciación nucleotídica. Los fragmentos son separados mediante gel de acrilamida, constituido con gradiente desnaturalizante de urea y formamida para la separación de las secuencias según sean las propiedades de desnaturalización de cada fragmento. El número, posición e intensidad de las bandas obtenidas mediante DGGE puede utilizarse para determinar la diversidad en un cultivo. La

precisión de esta técnica para este fin ha sido ampliamente estudiada, y la sensibilidad es adecuada para separar fragmentos que varían en una sola base[36].

## **II. HPÓTESIS**

**Los cultivos mixtos de microalgas marinas de la costa de Yucatán, y cultivadas in vitro, tienen el potencial para producir ácidos grasos transesterificables.**

## **III. JUSTIFICACIÓN**

Existen varios obstáculos tecnológicos y económicos para la producción a escala industrial de biodiesel a partir de aceite de microalgas y una de las más importantes radica en la elección de la microalga a cultivar. Para la selección de microalgas con el fin de obtener ácidos grasos de calidad para producir biodiesel se debe tener en cuenta la influencia de condiciones ambientales en el crecimiento, ya que de ello depende el rendimiento y la productividad del cultivo de microalgas. El mantenimiento de cultivos en axenidad es una opción muy costosa y resulta poco viable para este fin. Los cultivos mixtos de microalgas poseen grandes ventajas en su uso para la producción de biodiesel por varias razones, la primera es la relación directamente proporcional entre diversidad y riqueza de especies. La segunda es el aprovechamiento más eficiente de factores de cultivo como luz, temperatura y nutrientes. La tercera es que la interacción en un cultivo mixto funge como competencia, de tal modo que se ve potenciado el crecimiento de las microalgas en el cultivo. Es por eso que el presente trabajo pretende evaluar el potencial de cultivos mixtos marinos de la región.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 Objetivo general.

Conocer el potencial de cultivos mixtos de microalgas marinas procariotas y eucariotas para la producción de biodiesel.

### IV.2 Objetivos particulares.

- Establecer *in vitro* cultivos microalgales mixtos del puerto Progreso Yucatán.
- Conocer la diversidad de la población microalgal de los cultivos utilizando oligoespecíficos.
- Determinar el perfil de ácidos grasos de los cultivos mixtos.

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **V.1 Colecta**

La colecta de las muestras se realizó en las aguas costeras superficiales del puerto de Progreso. Las muestras se obtuvieron de 3 sitios o estaciones de muestreo: A, B y C, para constituir los cultivos A, B y C, respectivamente. El agua se colectó con una botella Van Dorn de 2L misma que permitió obtener agua a tres profundidades (superficie, 0.5m y 1 m), esto con el objetivo de abarcar la columna de agua donde se encuentran ubicados los organismos fitoplanctónicos[37]. De cada una de las profundidades se obtuvieron 3 litros con un total de 9 litros por sitio. Las muestras se transportaron en botellas mantenidas en hielo hasta el laboratorio para su procesamiento. Las coordenadas geográficas se registraron con un sistema Garmin GPSmap 76CSX. La profundidad se cuantificó utilizando un profundímetro. El pH y temperatura del agua se midieron utilizando un Sistema Multiparamétrico YSI 556.

#### **V.2 Recuperación de microorganismos**

La recuperación de los microorganismos de interés, se realizó utilizando unidades de filtración (0.22 $\mu$ m) (MILLIPORE), para la recuperación de picoplancton. Posteriormente, los microorganismos retenidos se cultivaron en medio BG-11 (Anexo 2) y medio Guillard (f/2) (Anexo 3).

#### **V.3 Cultivos mixtos microalgales.**

El medio de cultivo BG-11, se empleó para cultivo del fitoplancton marino. Las condiciones de crecimiento fueron fotoperíodo 16:8 (luz: oscuridad), 25°C y agitación durante las horas de luz ya que la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> por parte de las microalgas está directamente relacionada con la utilización eficiente de la luz y mediante la agitación favorecemos el intercambio de gases. Cuando el crecimiento en los matraces fue visualmente apreciable se procedió a su resiembra por duplicado. Las réplicas además de seleccionar al fitoplancton adaptado al medio de cultivo, se emplearon para la recuperación

de la biomasa y su procesamiento para la extracción de ADN metagenómico (ADNm) y ácidos grasos totales.

#### V.4 Caracterización genética.

##### V.4.1 Extracción de ADN metagenómico y amplificación de regiones conservadas.

La metodología de extracción de ADN metagenómico a partir de 100 mg de biomasa, es una modificación al protocolo de Dellaporta (1983). La amplificación se realizó con oligonucleótidos específicos (Tabla V.1), a regiones conservadas de microalgas y cianobacterias. Las reacciones de PCR con cada juego de oligonucleótidos se llevaron a cabo con volumen total de 25  $\mu$ L: Buffer 1X,  $MgCl_2$  (2mM), dNTP's (0.2 mM), oligonucleótidos (1 $\mu$ M), 1U de *PlatinumTaq* ADN polimerasa y ADN genómico. La reacción de PCR con el perfil cíclico para cada par de oligonucleótidos se llevó a cabo en un termociclador (Biorad-T100™ ThermalCycler). La integridad de los amplicones obtenidos se evaluó en un gel de agarosa-TAE (40mM Tris-HCL, 20 mM ácido acético, 1mM EDTA, pH 8.0) al 1%, el cual se tiñó con bromuro de etidio (10mg/ml) para la visualización de las bandas. Las bandas se observaron con un fotodocumentador (ENDURO™ Gel Documentation System).

El ADN metagenómico obtenido de los cultivos A y C, fue resuspendido en 50  $\mu$ l de agua, y posteriormente se realizaron diluciones (2:8) para su cuantificación. Cada cuantificación se realizó por triplicado por lo que los valores de la tabla corresponden a un promedio de tres mediciones.

**Tabla V.1** Secuencias de oligonucleótidos utilizadas en la amplificación de eucariotas (set A) (referencia) y cianobacterias (set B) (referencia).

Nombre	Secuencia	Producto de PCR (bp)	Perfil cíclico de PCR
<b>Set A</b>			
Euk1A	5'-CTGGTTGATCCTGCCAG-3'	560	94°C/2 min 94°C/30 seg 55°C/30seg 72°C/40 seg } 35 ciclos
Euk516r	5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3'		

<b>Set B</b>			
CYA359F	5'-GGGGAATYTTCCGCAATGGG-3'	700	94°C/2 min 94°C/30 seg 55°C/30 seg 72°C/30 seg 35 ciclos
CYA781Rb	5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3'		

#### **V.4.3 Separación de fragmentos por Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)[38][34].**

La separación de fragmentos por DGGE se realizó empleando productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos Euk1A y CYA359F, pero con sus respectivos Euk516r y CYA781Rb, a los cuales se les adicionó una secuencia de 40pbde CG en el sentido 5'. Posteriormente se estandarizaron las condiciones de electroforesis para lograr la separación de las bandas. Los geles de acrilamida fueron preparados al 6% (acrilamida/bis37.5/1) (p/v). Las condiciones de desnaturalización se realizaron partiendo de solución desnaturalizante (Urea 7 M y Formamida al 40% (v/v)) para la formación de gradientes diferentes para cada par de oligonucleótidos (Tabla V.2). Las muestras se prepararon con 4µl de buffer de carga (0.09% azul de bromofenol, 0.09% xilencianol, 60% de glicerol, 60 mM EDTA) por cada 20µL de producto de PCR. El gel fue teñido con 6µl de Gel Red (Biotium). La electroforesis se realizó con Buffer TAE 1X (Anexo 1, Tabla A3) y bajo las condiciones señaladas (Tabla V.2).

Tabla V.2 Parámetros de electroforesis para DGGE según el tamaño del amplicón obtenido [38] [33].

<b>Primers</b>	<b>Condiciones para DGGE</b>
<b>Euk1A</b> <b>Euk516r</b>	Gradiente desnaturalizante de 40% a 65%. La electroforesis a 60°C durante 960 minutos a un voltaje constante de 200v.
<b>CYA359F</b> <b>CYA781Rb</b>	Gradiente desnaturalizante de 45% a 55%. La electroforesis se correrá a 60°C durante 999 minutos a un voltaje constante de 45v.

#### **V.4.4 Análisis de las bandas obtenidas de los oligonucleótidos (Euk1A -Euk516r-GCb) y (CYA359F- CYA781Rb)**

Mediante el uso del software QuantityOne(BioRad) se analizó la imagen obtenida del DGGE, esto permitió la determinación de las bandas encada carril. Para los fines de este trabajo cada banda discreta en el gel se consideró como una unidad taxónomica operativa. Con los datos obtenidos se construyó una matriz binaria de presencia y ausencia de bandas en cada sitio. La matriz se obtenida se analizó mediante el programa NTSYSpc (versión 2.2) empleando el índice de Jaccard. Los resultados fueron empleados para construir un dendograma mediante UPGMA.

De igual manera, empleando el software QuantityOne (BioRad), se calculó la intensidad de cada banda la cual es el área bajo la curva de cada banda. Tomando este dato, se calculó el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H), de acuerdo a la eucación :

$$H = \sum \left( \frac{n_i}{N} \right) L \left( \frac{n_i}{N} \right) \quad (V-1)$$

Donde  $n_i$  corresponde a la intensidad de cada banda (valor del área bajo la curva), y  $N$  corresponde a la suma de las intensidades de todas las bandas[39].

### **V.5 Caracterización lipídica**

#### **V.5.1 Extracción de lípidos.**

Primeramente se realizó la recuperación de la biomasa microalgal mediante centrifugación a 5057 X g durante 7min/25 °C. Posteriormente, la biomasa se congeló a -80 °C por 24 h y se secó mediante liofilización. La biomasa seca se sometió a extracción química, para lo cual se tomaron 50mg de biomasa y se mezclaron con 15 mL de la mezcla de solventes (cloroformo-metanol 2:1, v/v), para la lixiviación de los lípidos totales. Posteriormente se evaporaron los solventes del lixiviado en una campana de extracción de vapores durante 24 hrs. Seguidamente, se secó el extracto lipídico a 60°C por una hora y se pesó. La productividad de lípidos (mg/Lt/día) se calculó en base al extracto de lípidos obtenido por unidad de tiempo en días.

Con la finalidad de retirar la mayor cantidad de impurezas que pudieran interferir con la cromatografía de gases tales como residuos de biomasa; se realizó una limpieza al extracto lipídico. La limpieza consistió en utilizar una columna elaborada con zeolita, a través de la cual se pasó la muestra diluida con cloroformo (Figura V.1)

### V.5.1 Purificación del extracto lipídico

El pretratamiento de las materias primas para la producción de biodiesel se realizó mediante el empleo de una resina de intercambio iónico la cual permitió purificar la materia prima Purolite PD 206<sup>®</sup>, esto es necesario principalmente cuando se emplean fuentes no convencionales como aceites de cocina o en este caso microalgas [40, 41]. Por lo cual se hizo pasar el extracto a través de una columna (Punta de pipeta de 5 ml) empacada con zeolita (2/3 de la punta), con este tratamiento se logró remover proteínas, fosfolípidos e incluso pigmentos [41, 42]. La eliminación de los contaminantes permite obtener un aceite adecuado para realizar la transesterificación.



**Figura V.1.** Purificación del extracto lipídico mediante zeolita.



### **V.5.2 Transesterificación**

La transesterificación se realizó adicionando al extracto lipídico obtenido, metóxido sódico al 2%. Posteriormente, la fracción del extracto que contiene los lípidos se disolvió en 2 mL de heptano, y 300 µL de acetato de etilo. La reacción procedió a 50°C, con agitación moderada, durante aproximadamente 90 minutos. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos FAME (Fatty Acid Methyl Esters) se identificaron por cromatografía de gases.

### **V.5.3 Cromatografía en capa fina**

La cromatografía en capa fina o (TLC) se realizó para el seguimiento de la reacción de transesterificación. En una lámina de aluminio se trazó con lápiz una línea a 7-10 mm del borde inferior y se señalaron sobre ella puntos equidistantes que correspondieron a las muestras que se deseaba analizar. Con ayuda de una micropipeta de vidrio se tomó una muestra de un vial introduciendo la micropipeta, lo cual permitió que el líquido suba por capilaridad. Al tocar brevemente la placa con la micropipeta el líquido se absorbió en la placa también por capilaridad. Se picó tres veces en el punto para conseguir una mancha definida para mejor la resolución. Se utilizó una pipeta diferente para cada muestra.

La placa de TLC se depositó dentro de una cámara de cromatografía, a la que previamente se había añadido una pequeña cantidad del eluyente (9 mL Hexano, 1 mL Acetato de etilo, 0.1 mL de Ácido acético). A medida que la mezcla de disolventes ascendió por capilaridad a través del adsorbente, se produjo un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra [43].

### **V.5.4 Análisis del perfil lipídico.**

Las muestras se disolvieron en 1 mL de etanol-cloroformo (1:1), y se homogenizaron con ayuda de vortex. Posteriormente, se tomó 1 µL y se inyectó al cromatógrafo, utilizando hidrógeno como gas acarreador. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron por triplicado utilizando un cromatógrafo (Clarus 500 Perkin-Elmer) con un detector FID (Detector de ionización de llama) y una columna capilar Agilent DB5-HT. El tiempo total de corrida del programa fue de 21.00 minutos con temperatura máxima de: 260°C y tiempo de equilibrio de 2.0 min. La rampa de calentamiento 5.00 min a 250°.

Tomando el área del pico, se calculó la cantidad de mg/mL de FAME presente en los extractos. De esta manera, las áreas obtenidas se convirtieron de  $\mu\text{V}\cdot\text{s}$  (microvolts/segundo) a mg/ml (miligramos/mililitro) utilizando la ecuación:

$$Y = (4^{E+06})(x) \quad (\text{V-II})$$

Donde los valores de Y se sustituyen por los valores obtenidos en área para cada FAME:

$$X = Y/4^{E+06} \quad (\text{V-III})$$

Una vez realizados los cálculos, se evaluaron las medias entre las muestras, para lo cual se utilizó el programa SAS9.1, para realizar una Prueba de Tukey al 5%.

### CAPITULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI.1 Colecta y cultivo de microorganismos fitoplactónicos.

Los microorganismos recuperados de las muestras de puerto Progreso, en los sitios A, B y C, se cultivaron en medio BG-11, a 25°C y con fotoperíodo. Los cultivos A, B y C, se monitorearon desde su etapa inicial (día 0) para observar los cambios del mismo durante los días de incubación(Fig.VI.2).Por cada cultivo se realizaron dos réplicas, en las cuales se observó el mismo comportamiento. Después de tres semanas, los cultivos del sitio A, presentaron crecimentomicroalgalvisible(Fig.VI.3); mismo caso se observó para los cultivos del sitio C; mientras que los cultivos del sitio B, presentaron precipitación de sales y nulo crecimiento microalgal.Este fenómeno de precipitación se ha reportado como autofloculación o biofloculación, y es el resultado de un descenso en el pH del medio ocasionada por alguna de las especies en el cultivo, dando como resultado en algunos casos la pérdida del cultivo[44].En este caso, se desconoce la identidad de la especie que ocasionó este fenómeno.



**Figura VI.2.**Cultivos A, B, y C día 0 en medio BG-11.



**Figura VI.3.** Cultivos A,ByC, con 21 días de crecimiento en medio BG-11.

Las microalgas colectadas prosperaron *in vitro* utilizando el medio BG-11 y Guillard (f/2). El medio BG-11, ha sido utilizado exitosamente para el cultivo de todo tipo de microalgas marinas tanto eucariotas como *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. [45, 46], como procariotas *Lyngbya* sp. y *Synechococcus* sp. [28]. Sin embargo no se logró la densidad celular descrita en la literatura, que permitiera la recuperación de biomasa en cantidad necesaria para su procesamiento. El medio Guillard (f/2), también ha sido extensamente utilizado para el crecimiento de microalgas marinas [47]. Los cultivos A y C, se cultivaron en los dos medios referidos. Este no fue el caso para el cultivo B, debido a que se perdió como se mencionó anteriormente.

Los cultivos antes mencionados, prosperaron en medio Guillard (f/2), esto puede deberse a que el medio se formuló con agua de mar proveniente del sitio de colecta para cada cultivo, con variaciones mínimas en los parámetros del campo al laboratorio, lo cual favoreció su adaptación [48].

Debido a la adaptación de los cultivos a los constituyentes del medio Guillard (f/2), se empleó medio Guillard (f/2) de formulación comercial empleando un biorreactor para la obtención de mayor densidad celular. El biorreactor permitió la incorporación continua de aire, así como la agitación constante de los cultivos (Figura V.4), lo cual aseguró la distribución homogénea de las células y nutrientes, así como su disponibilidad a la luz [49].

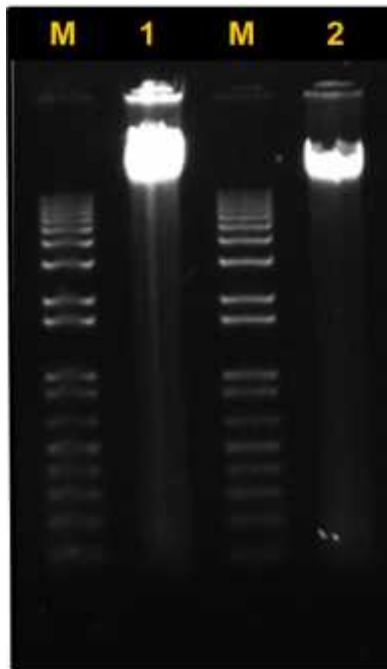


**Figura VI.4.**Biorreactor con el cultivo A.

### **VI.3 Caracterización genética.**

#### **VI.3.1 Extracción de ADN metagenómico.**

El protocolo desarrollado permitió la obtención de ADN metagenómico con un rendimiento aproximado de 10,000 ng/ $\mu$ l. En la tabla VI.3 se muestran las relaciones de las absorbancias de 260nm/230nm, las cuales resultaron muy bajas. Estos valores indicaron posible contaminación con fenoles, carbohidratos o sales como el EDTA[50]. Sin embargo, resultó no ser un impedimento en la amplificación.



**Figura VI.5.**ADNmetagenómico de los cultivos A(1)y C(2). M: Marcador 1Kb.

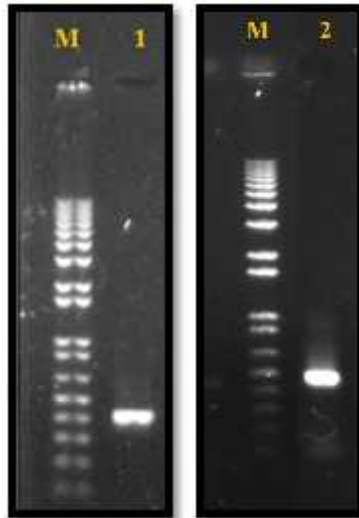
Tabla VI.3.Cuantificación de ADN metagenómico de los cultivos A y C del Puerto de Progreso utilizando protocolo Dellaporta et al. (1983) modificado.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/μl</b>	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
Cultivo C	24.6	0.49	0.20	1.85	0.52
Cultivo A	25.1	0.50	0.34	1.47	0.41

### **VI.3.2 Amplificación de regiones conservadas**

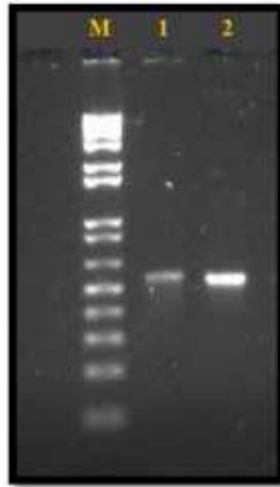
Las amplificaciones con los diferentes oligonucleótidos se realizaron utilizando como templado el ADN metagenómico obtenido de los cultivos A y C.El par de oligonucleótidos para la detección de cianobacterias (CYA359F-CYA781Rb)amplificó exitosamente. Este par de oligos se utiliza específicamente para detectar cianobacterias cocales. La detección de cianobacterias filamentosas requiere del mismo oligo(CYA359F) pero con el oligoreversoCYA781Ra. Sin embargo al no detectarse la presencia de cianobacterias filamentosas en ninguna muestra, solo se utilizó el par de oligos para cianobacterias cocales.Los resultados confirmaron la presencia de estas microalgas procariotas en los

cultivos de ambos sitios(Fig. VI.6). Este par de oligos ha sido ampliamente utilizado para estudios de diversidad microbiana tanto en suelo como en agua[51]



**Figura VI.6.** Amplificación con oligonucleótidos CYA359F-CYA781Rb usando como templado ADN metagenómico obtenido de los cultivos A (1) y C (2). M: corresponde al marcador molecular 1Kb (Invitrogen).

Los amplicones obtenidos mediante el par de oligonucleótidos Euk1A-Euk516r, reportado para la identificación de microalgas eucarióticas[38], se observan en la figura VI.7. Este resultado positivo confirma la presencia de microalgas eucariotas en ambos cultivos.

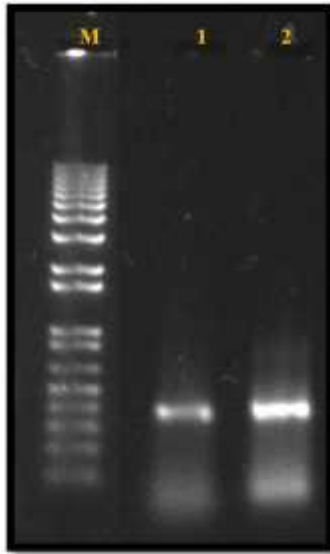


**Figura VI.7.** Amplificación con oligonucleótidos Euk1A-Euk516r usando como templado ADN metagenómico obtenido de los cultivos A (1) y C (2).La letra M: corresponde al marcador molecular 1Kb (Invitrogen).

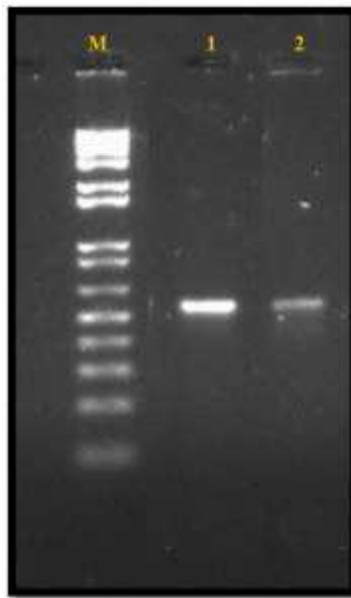
El producto de PCR de las primeras amplificaciones se utilizó como templado para la segunda amplificación (Fig.VI.8 y VI.9) con oligonucleótidos que tiene en el extremo 5', una pinza de 30-50 bases de guanina-citosina en el oligonucleótido reverse, para evitar que las cadenas de ADN se separen por completo[52]. De esta manera, el empleo de un gel con gradiente desnaturante, permite la resolución óptima debido a que los fragmentos no se desnaturalizan por completo[38].

En la amplificación se obtuvo el fragmento de interés y se observó la formación de dímeros en todas las reacciones. Para minimizar esta dimerización (nube de PCR) se redujo la concentración de oligonucleótidos y se incrementó la temperatura de desnaturación. La reducción de nube de PCR fue mínima, sin embargo esto no afectó su posterior reamplificación razón, por la cual en base a la definición de las bandas se utilizó una concentración de 0.4 $\mu$ M en ambos pares de oligonucleótidos.





**Figura VI.8.** Reamplificación con oligonucleótidos (CYA359F-CYA781Rb con pinza de guaninas y citosinas), usando como templado amplicón obtenido en la primera amplificación de los cultivos A (1) y C (2). La letra M: corresponde al marcador molecular 1Kb (Invitrogen).



**Figura VI.9.** Reamplificación con oligonucleótidos (Euk1A-Euk516r con pinza de guaninas y citosinas), usando como templado amplicón obtenido en la primera amplificación de los cultivos A (1) y C (2). La letra M: corresponde al marcador molecular 1Kb (Invitrogen).

### VI.3.3 Separación de amplicones por DGGE.

Las condiciones para DGGE referidas en la sección de materiales y métodos se realizaron conforme a lo reportado para los oligonucleótidos empleados en este estudio [38][34]. Sin embargo, la cantidad de amplicón utilizada para su separación fue incrementada de 600-800 ng utilizados por Boutte *et. al*, al 2006 [34] a 2,400 ng de ADN. Esto debido a que no era posible la observación de las bandas con 800 ng de ADN.

En la figura VI.10, se observan las bandas que corresponden a la especies de microalgas eucariotas y procariotas. Basados en este resultado, se puede confirmar que ambos cultivos son mixtos. De esta manera el cultivo A, está compuesto por 10 especies de microalgas eucariotas y 4 de procariotas. Mientras que el cultivo C, está compuesto por 5 especies de microalgas eucariotas y 13 procariotas.

Tomando en cuenta los dos sitios de muestreo como unidades experimentales se realizaron dos matrices de presencia y ausencia, en función a cada par de oligonucleótidos (Tablas VI.4). Para el caso del oligo *Euk1A-Euk516* un total de 14 OTU, fueron detectados. Mientras que para el caso del oligo *CYA359F-CYA781Rb* fueron 18 OTU en total. Como puede observarse en la tabla, no se detectaron coincidencias, es decir, las OTU detectadas en los cultivos fueron diferentes entre sí. De igual manera, los resultados sugieren que no hay OTU que estén más representadas en los cultivos establecidos.



**Figura VI.10.** Detección de bandas por QuantityOne. Fragmentos amplificados mediante Euk1A-Euk516r+GG (Eucariotas) y CYA359F-CYA781Rb+GC (Procariotas).

**Tabla VI.4.** Número de OTU del oligonucleótido Euk1A-Euk516r+GG y CYA359F-CYA781Rb+GC.

OTU	Euk1A-Euk516r+ GG	
	Sitio A	Sitio C
E1	0	1
E2	0	1
E3	1	0
E4	0	1
E5	1	0
E6	0	1
E7	1	0
E8	1	0
E9	1	0
E10	1	0
E11	1	0
E12	1	0
E13	1	0

E14	1	0
-----	---	---

**Tabla VI.4.** Número de OTU del oligonucleótido CYA359F-CYA781Rb+GC.

OTU	CYA359F-CYA781Rb+GC	
	Sitio A	Sitio C
C1	1	0
C2	1	0
C3	1	0
C4	1	0
C5	0	1
C6	1	0
C7	0	1
C8	0	1
C9	0	1
C10	0	1
C11	0	1
C12	0	1
C13	0	1
C14	0	1
C15	0	1
C16	0	1
C17	0	1
C18	0	1

Las matrices anteriores se utilizaron para calcular la distancia genética mediante el índice de Jaccard y construir el dendograma resultante (Figura VI.11). Las especies de microalgas denotadas por las bandas detectadas mediante DGGE permitió visualizar de manera gráfica que los cultivos no poseen especies de microalgas en común. En ambos hay cianobacterias, en el cultivo A están presentes 5 especies y en el C, 13 especies, pero ninguna de ellas está presente en ambos sitios. El mismo resultado se obtuvo para las microalgas eucariotas. Lo cual indica que la composición microalgal de los cultivos es completamente diferente (figura VI.12).

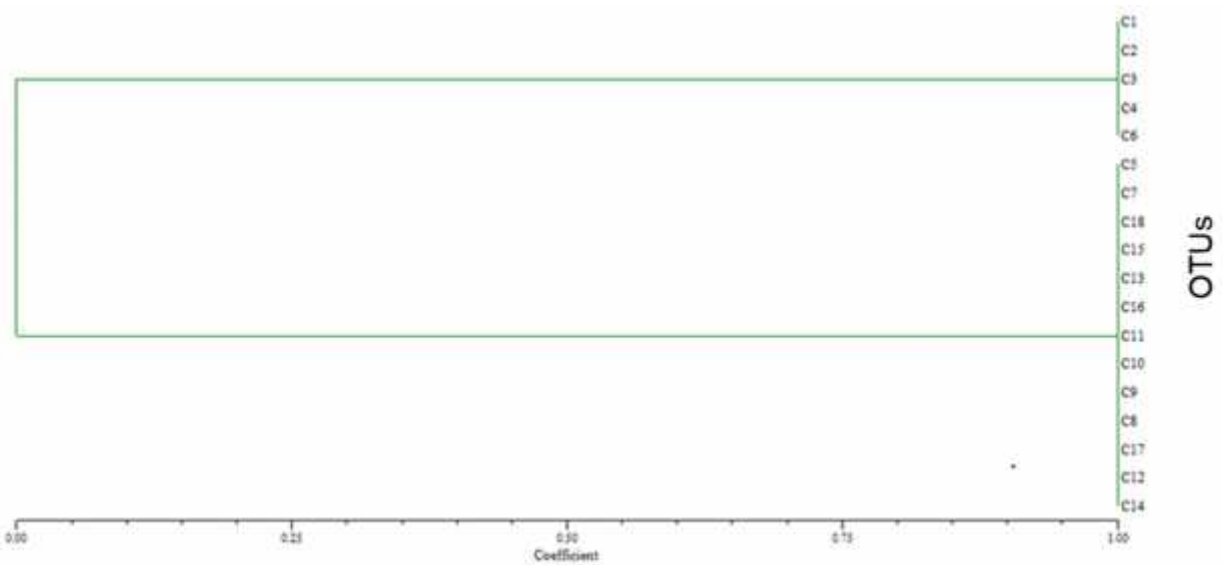
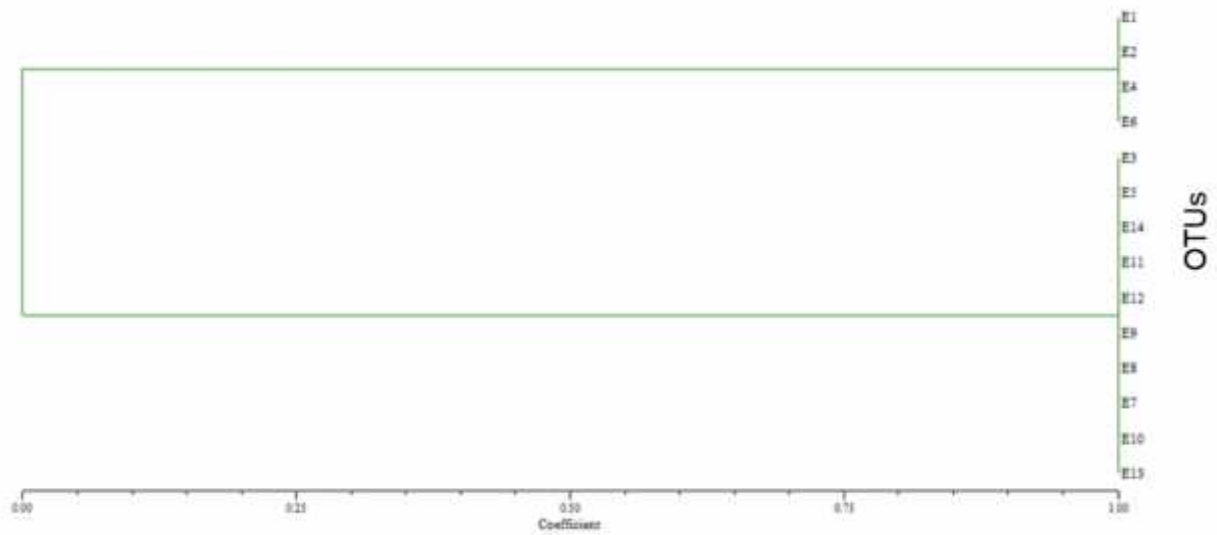


Figura VI.11 Dendograma de disimilitud de procariotas.



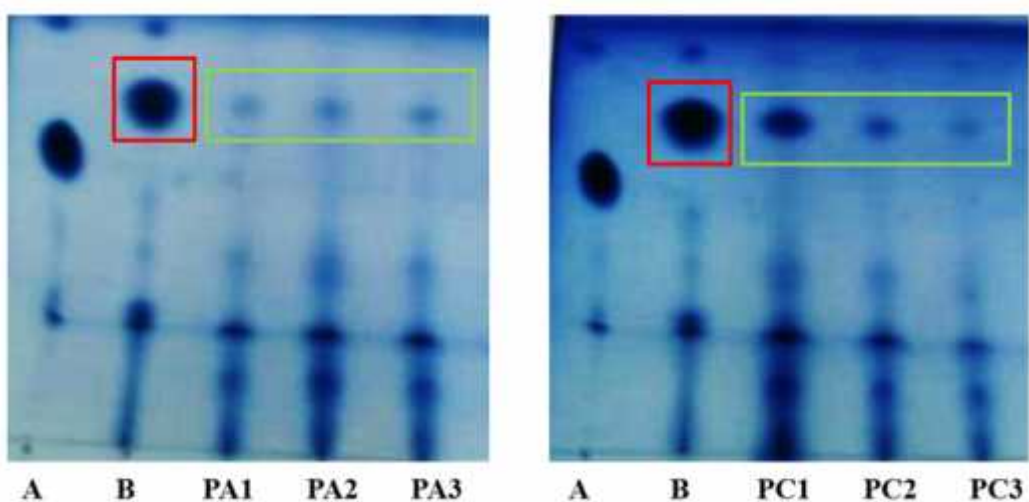
**FiguraVI.12** Dendrograma de disimilitud de eucariotas.

La diversidad de las especies presentes en cada cultivo se realizó de acuerdo al índice de Shannon-Weaver. Este índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. De esta manera, valores menores a 3 se relacionan con baja diversidad, mientras que valores superiores a 5, hacen referencia a alta diversidad[53]. Los valores obtenidos en el índice de diversidad referido fueron de 2.1453 y 1.9373 para el cultivo A y C, respectivamente. Basado en esto, ambos presentan baja diversidad, sin embargo, el cultivo A posee mayor diversidad en comparación con el cultivo C[39].

## VI.5 Caracterización lipídica.

### VI.5.1 Extracción lipídica y transesterificación.

Los extractos lipídicos fueron obtenidos por triplicado, posteriormente se purificaron y transesterificaron. El análisis cromatográfico de capa fina, previo a la cromatografía de gases, se realizó para comprobar la presencia de ésteres metilo de ácidos grasos. En este procedimiento se utilizó aceite de cocina y biodiesel como referencia. Los resultados cromatográficos obtenidos indican la presencia de ésteres metilo de ácidos grasos, en todos los extractos lipídicos obtenidos (Fig. VI.11).



**Figura VI.11.** Placas de cromatografía de capa fina de los extractos obtenidos de los cultivos A y C. PA1, PA2 y PA3, corresponden a las extracciones por triplicado del cultivo A; PC1, PC2 y PC3 corresponden a las extracciones por triplicado del cultivo C. La letra A corresponde al aceite de referencia sin transesterificar y B al biodiesel (en el recuadro rojo).

## VI.5.2 Análisis del perfil lipídico

Una vez comprobada la presencia de esteres metilo de ácidos grasos, se procedió a su análisis mediante cromatografía de gases para su caracterización cualitativa y cuantitativa mediante el uso de estándares como referencia proporcionadas por el laboratorio de Biocombustibles de la Unidad de Energía renovable Del Centro de Investigación científica de Yucatán que se muestran en el anexo . En la tabla VI.4 se muestran los valores obtenidos en Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) para cada ácido graso identificado. Estos valores se utilizaron para el cálculo que se observa en la tabla Tabla VI.5.

Tabla VI.4. Identificación de FAME de acuerdo al tiempo de retención obtenido de los extractos lipídicos.

Muestra	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )					
	C:14	C:16	C:17	C:18	C:18:1	Otro
PA1		4686.15				
				1716.24		
					2354.06	
PA2		3987.36				
				1425.34		
					1905.61	
PA3	1552.13					
		11085.12				
				2687.95		
PC1					7950.81	
		8621.54				
			1233.64			
PC2				1026.59		
		5276.73				
				596.545		
PC3					781.02	
						889.01
		5529.03				
			497.95			
				608.905		
				770.66		
					759.845	

Nota: Las muestras se inyectaron por triplicado, los valores corresponden al promedio.



Tabla VI.5. Concentración de FAME obtenidos de los extractos lipídicos de los cultivos A y C.

Muestra	FAME (mg/mL)					
	C:14	C:16	C:17	C:18	C:18:1	Otro 1
PA1	0	0.00117	0	0.000429	0.000588	0
PA2	0	0.0009968	0	0.0003563	0.000467	0
PA3	0.000388	0.002771	0	0.0006719	0.001987	0
PC1	0	0.002155	0.000308	0.0002566	0	0
PC2	0	0.001319		0.0001491	0.0001952	0.0002222
PC3	0	0.001382	0.0001244	0.0001522	0.0001926	0.0001899

Una vez calculado el valor en mg/mL se calculó el porcentaje de los FAME (Fig.VI.12). La presencia de C16:0, C18:0 y C18:1 fue evidente en todos los extractos. El cultivo C presentó un porcentaje mayor de C16:0 mientras que C18:0 y C18:1 se encontraron en mayor porcentaje en el cultivo A. El C17:0 fue identificado solo en las muestras del cultivo C. Mientras que C14:0 se identificó en una réplica del cultivo A. Adicionalmente otro ácido graso se detectó en dos de las réplicas del cultivo C, sin embargo no fue posible identificarlo, debido a que no se cuenta con el estándar que corresponde al tiempo de retención del compuesto y al programa correspondiente al utilizado..

Las diferencias en la composición lipídica en los cultivos se deben a las especies de microalgas presentes en cada uno. Esto a su vez se explica por los dos sitios de colecta de donde se obtuvieron dichos cultivos, como se mencionó anteriormente, el cultivo A pertenece al sitio A y el cultivo C al sitio de colecta C. Pese a ser del mismo puerto, las condiciones en cada sitio no eran las mismas, por consiguiente no es de extrañar que la composición del fitoplancton mostrara variación entre los dos sitios, por consiguiente en los cultivos.

Las diferencias en las réplicas del mismo cultivo pueden deberse a la disposición de cada matraz en la conformación del biorreactor, ya que los matraces se colocan en serie y el primero suele mostrar una reducción en el medio, disminución que se ve inversamente reflejada en el último matraz que presenta un incremento en el nivel de medio de cultivo, esto a su vez pudo ocasionar que una especie proliferara más en un cultivo que en el otro. Explicando la presencia de por ejemplo C14:0 en una de las réplicas del cultivo A. Quiere

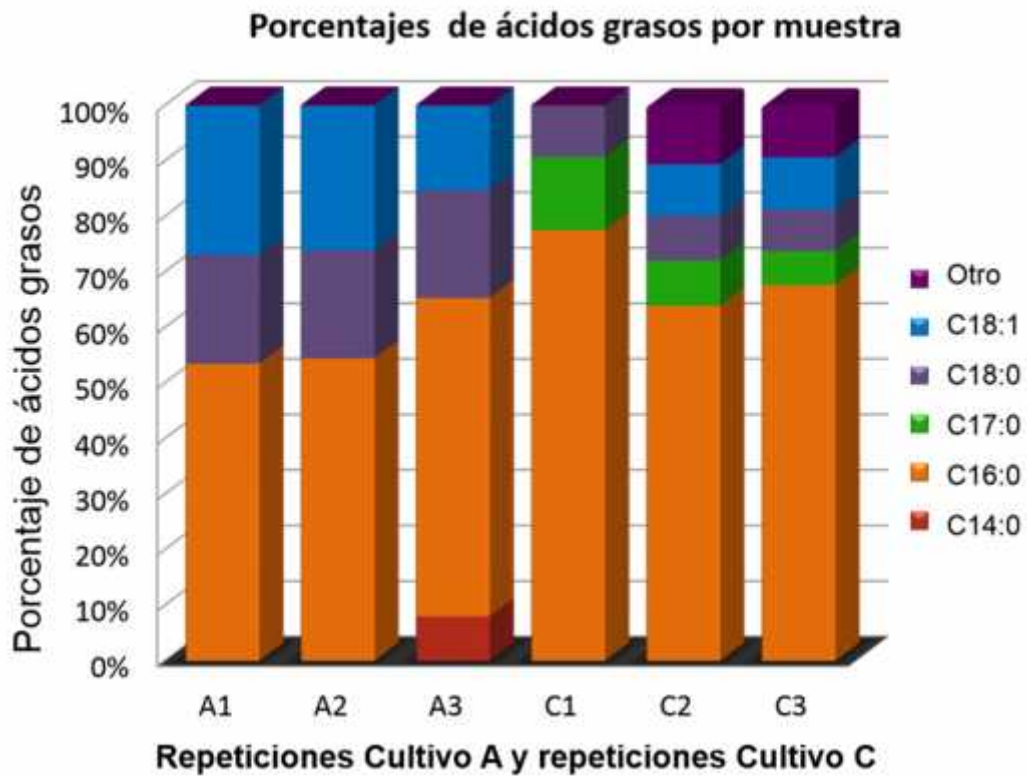
decir que el crecimiento de la microalga que está aportando el C:14:0, fue mayor en esta réplica, y aun que estaba presente en las otras réplicas, no proliferó de la misma manera. Pese a que el inóculo utilizado fue el mismo para todas las réplicas del cultivo A ( inóculo proveniente del sitio de colecta A), y para las réplicas del cultivo C (inóculo proveniente del sitio de colecta C). Los patrones observados en la cromatografía nos indican que una especie puede estar en mayor cantidad en un matr az y en menor cantidad en otro, reflejándose de este modo en su aportación de ácidos grasos.

Los resultados del análisis estadístico indicaron que el cultivo A podría representar una opción más prometedora para la producción de biodiesel, debido a que posee un mayor porcentaje de C16:0 y C18:0 los cuales son altamente deseables para la producción de biodiesel, debido a que éste ácido graso es responsable del incremento en el número de cetano [6]. Al mismo tiempo que presenta C18:1 en mayor proporción que el cultivo C. Knotheet al., 2005 señala que el C18:1 presenta una combinación de dos características, largo de cadena e insaturación, ambas mejoran las propiedades del biodiesel. Las insaturaciones mejoran la operatividad del biodiesel a bajas temperaturas, pero disminuyen su estabilidad a la oxidación, por lo cual son deseables en bajas proporciones[10].

La identificación de los organismos presentes en cada cultivo a través de los ácidos grasos que componen el biodiesel obtenido, no es del todo posible, ya que son pocos los ácidos grasos taxonómicamente específicos para una sola especie. Por ejemplo, el ácido eicosapentaenoico(20:5n-3) ha sido documentado como biomarcador y su presencia se asocia directamente a la diatomea *Cyclotella* sp[54]. Sin embargo una mayor presencia de cianobacterias en el cultivo C, explicaría a su vez la presencia de ácidos grasos más complejos como el C18:2.

Microalgas como *Nannochloropsis* sp. ha sido reportada para aguas costeras de la península de Yucatán y presenta una composición de 34.3%, 44.4% y 21,2% de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente. Por su parte Zittelliet al. (1999)[55] reportan para esta misma microalga 32,7%, 31,6% y 34,1% de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente. Estas composiciones se asemejan más a las encontradas en los cultivos evaluados, sin embargo es importante considerar que los ácidos grasos encontrados son comunes a muchas microalgas y no son útiles como biomarcadores específicos, y al ser cultivos mixtos, estas aportaciones pueden provenir de cualquiera de las especies en el

cultivo. Entre los dos sitios, los aceites de las microalgas presentes en el sitio A favorecen la selección de este cultivo para la producción de biodiésel.



**Figura VI.12.** Porcentaje de ácidos grasos presentes cultivo A y cultivo C.

## CONCLUSIONES

La constitución *in vitro* de dos cultivos microalgales mixtos marinos fue corroborada mediante DGGE, a través del cual fue posible determinar la presencia de microalgas eucariotas y procariotas. De esta manera, se determinó que el cultivo A, está compuesto por 10 especies de microalgas eucariotas y 4 procariotas. Mientras que el cultivo C, está compuesto por 5 especies de microalgas eucariotas y 13 procariotas.

Los aceites obtenidos a partir de las microalgas que constituyeron los cultivos mixtos, y bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, fue determinada. Un gran contenido de ácido palmítico, esteárico y ácido linoleico fue detectada en ambos extractos. El extracto de ésteres metilo de ácidos grasos del cultivo A estuvo constituido por C16:0 (51.95%), C18:0 (16.54%) y C18:1 (28.89%). Mientras que los del cultivo C, estuvo constituido por C16:0 (72.32%), C17:0 (6.07%), C18:0 (8.26%) y C18:1 (6.59%). Los aceites microalgales encontrados en ambos cultivos son aptos para producir biodisel. Sin embargo, entre los dos cultivos, las microalgas en el cultivo A son una alternativa más prometedor para la producción de biodiesel. Esto debido a las proporciones de ácidos grasos así como por su respuesta a cultivo *in vitro*.

## REFERENCIAS

- [1] X. Meng, j. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie y M. Xian, Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renew. Energ.* 34, 1-5, 2009.
  
- [2] S. Mohan, D. Prathima, G. Mohanakrishna, N. Amarnath, M. Lenin y P. Sarma, Potencial of mixed microalgae to harness biodiesel from ecological water-bodies with simultaneous treatment, *Bioresourse Technol.* 102, 1109-1117, 2011.
  
- [3] Z. Liu , C. Liu, Y. Hou, S. Chen, D. Xiao, J. Zhang y F. Chen, Isolation and Characterization of Marine Microalga for Biofuel Production with Astaxanthin as a Co-Product, *Energies.* 6, 2759-2772, 2013.
  
- [4] B. R. Moser, Biodiesel production, properties, and feedstocks, *Vitro Cell.Dev.Biol.* 45 229–266, 2009.
  
- [5] E. Shalaby, Algal Biomass and Biodiesel Production, InTech, 2011, 112-131.
  
- [6] G. Knothe, Dependence of biodiesel properties on the structure of fatty alkyl esters, *Fuel Process. Technol.* 86, 1059-1070, 2005.
  
- [7] F. Eman y D. El Maghraby, Fatty Acids Composition and Biodiesel Characterization of *Dunaliella salina*, *Journal of Water Resource and Protection.* 5 , 894-899, 2013.
  
- [8] X. Deng, Y. Li y X. Fei, Microalgae: A promising feedstock for biodiesel, *African Journal of Microbiology Research.* 3, 1008-1014, 2009.
  
- [9] B. Rittmann, Opportunities for Renewable Bioenergy Using Microorganisms, *Biotechnology and Bioengineering.* 47, 203-212, 2008.

- [10] Q. Li, W. Du y D. Liu, Perspectives of microbial oils for biodiesel production, *A lied Microbiology and Biotechnology*. 80,749-756, 2008.
- [11] T. Ramachandra, K. Sajina y G. Supriy, Lipid composition in microalgal community under laboratory and outdoor conditions, *Indian Journal of Science and Technology*, 4, 2011.
- [12] N. Simon, A. Cras, E. Foulon y R. Lemée, Diversity and evolution of marine Phytoplankton, *Comtes Rendus Biologies*.332, 159-170, 2009.
- [13] T. Mata, A. Martins y N. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other aplicaciones: A review., *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 217-232, 2010.
- [14] L. Tomaselli, The Microalgal Cell, de *Handbook of Marine Culture: Biotechnology and A lied Phycology*, 2004, 3-18.
- [15] P. Vanormelingen y E. Verleyen, The diversity and distribution of diatoms: from cosmopolitan to narrow endemism, *Biodiversity and conservation*. 17,. 393-405, 2008.
- [16] V. Thang, Y. Li, E. Nowak y P. Schenk, Microalgae Isolation and Selection for Prospective Biodiesel Production, *Energies*. 5,. 1835-1849, 2012.
- [17] L. L. Beer, E. Boyd, J. Peters y M. Posewitz, Engineering algae for biohydrogen and biofuel production, *Current Opinion in Biotechnology*. 20, 264–271, 2009.
- [18] R. Radakovits, R. E. Jinkerson, A. Darzins y M. Posewitz, Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production, *Eukaryotic cell*.9, 486–501, 2010.

- [19] K. Sharma, . H. Schuhmann y P. Schenk, High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production, *Energies* , 5. 1532-1553, 2012.
- [20] E. Fakhry y . D. El Maghraby, Fatty Acids Composition and Biodiesel Characterization of *Dunaliella salina*, *Journal of Water Resource and Protection*. . 894-899, 2013.
- [21] D. Arias, . G. Hayashida, M. Aranda, S. Araya, T. Portilla, A. García y P. Díaz, Protocol for maximizing the triglycerides-enriched lipids production from *Dunaliella salina* SA32007 biomass, isolated from the Salar de Atacama (Northern Chile), *Advances in Bioscience and Biotechnology*.2, 830-839, 2013.
- [22] A. Illman, A. Scragg y S. Shales, Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme and Microbial Technology*. 27, 631–635, 2000.
- [23] O. Komolafe, S. Velasquez, I. Monje, I. Yáñez, A. Harvey y M. Orta, Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater, *Bioresource Technology*. 23, 297–304, 2014.
- [24] T. Mata, A. Melo, . S. Meireles, A. Martins y N. Caetano, Potential of Microalgae *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater for Biodiesel Production, *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*. 32, 901-906, 2013.
- [25] K. Sharma, H. Schuhmann y P. Schenk, High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production, *Energies*. 5, 1532-1553, 2012.
- [26] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*. 25, 294–306, 2007.

- [27] B. Wahlen, R. Willis and L. Seefeldt, "Biodiesel production by simultaneous extraction and total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures," *Bioresource Technology*. 15, 2724-2730, 2011.
- [28] K. Selvan, R. Revathi, S. Piriya y V. Thirumalai, Biodiesel production from marine cyanobacteria cultured in plate and tubular photobioreactors, *Indian Journal of Experimental Biology*, . 162-268, 2012.
- [29] M. Mingazzini y M. T. Palumbo, Open Mass Cultures of Marine Microalgae for Biodiesel Production: Laboratory Approach to Study Species Competition in Mixed Cultures, *Natural Resources*. 6,174-180, 2015.
- [30] M. Stockenreiter, A. K. Graber, F. Haupt y H. Stibor, The effect of species diversity on lipid production, *Journal of Applied Phycology*. 24, 45-54, 2011.
- [31] M. Stockenreiter, F. Haupt, K. Spilling, J. Seala y D. Enss, Phytoplankton Diversity Influences Algal Fatty Acid Composition- Implications For The Aquatic Food Web, de *Microalgal Applications*, 2012.
- [32] D. Spiegelman, G. Whissell y C. W. Greer, A survey of the methods for characterization of microbial consortia and communities, *Can. J. Microbiol.* 51,555-586, 2005.
- [33] U. Nübel, F. Garcia y G. Muyser, PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria, *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 3327-3332, 1997.
- [34] C. Boutte, S. Grubisic, P. Balthasart y A. Wilmotte, Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE, *J Microbiol. Methods*. 65, 542-550, 2006.



- [35] A. Piquet, W. van de Poll, W. Visser, C. Wiencke, H. Bolhuis y A. Buma, Springtime phytoplankton dynamics in Arctic Krossfjorden and Kongsfjorden (Spitsbergen) as a function of glacier proximity, *Biogeosciences*. 11, 2263–2279, 2014.
- [36] C. Pedrós, M. Terence, B. Díez y M. Ramon, Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques, *Applied And Environmental Microbiology*. 65, 2942–2951, 2001.
- [37] A. Rossell, J. Gonzalez, J. Del Torno y M. Galván, Técnicas De Muestreo Y Analisis De Plancton Y Perifiton, 1982.
- [38] B. Díez, C. Pedrós, T. Marsh y R. Massana, Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study The Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison with Other Molecular Techniques, *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 2942-2951, 2001.
- [39] N. Boon, W. Windt, W. Verstraete y E. Top, Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants, *FEMS Microbiol Ecol*. 39, 101-112, 2002.
- [40] J. Wall, *Comparison Of Methods For The Purification Of Biodiesel* College Of Graduate Studies, 2009.
- [41] C. Schmitt, S. Aranda, L. Krause, M. Manique, M. Espinosa, R. Rodrigues, E. Benvenuti y E. Caramão, Dry washing in biodiesel purification: a comparative study of adsorbents, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, . 558-563, 2011.
- [42] A. Chhetri, C. Watts y R. Islam, Waste Cooking Oil as an Alternate Feedstock for

Biodiesel Production, *Energies*. 18,. 3-18, 2008.

- [43] K. Ga Vin, C. Woong Yong, K. DoHyung, L. Shin Young y L. Hyeon Yong, Enhancement of Biodiesel Production from Marine Alga, *Scenedesmus* sp. through In Situ Transesterification Process Associated, *Journal of Hydrology*. 510, 70-78 2014.
- [44] R. Moheimani, M. McHenry, C. Boer, A. Bahri, Biomass and Biofuels from Microalgae, *Biofuel and Biorefinery Technologies*. 2, 2015.
- [45] V. Makareviciene, V. Andrulevičiūtė, V. Skorupskaitė y J. Kasperovičienė, Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock, *Environmental Research, Engineering and management*. 3, 21-27, 2011.
- [46] A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Iowa: Garsington Road, Oxford, 2004.
- [47] K. Lee, M. Eisterhold, F. Rindi, S. Palanisami y P. Nam, Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources, *J Nat Sci Biol Med*. 5, 333–339, 2014.
- [48] R. Andersen, *Algal Culturing Techniques*, California: Elsevier Academic Press, 2005.
- [49] C. Ugwu y H. Auyagi, Microalgae Culture Systems: an insight into their designs and applications, *Biotechnology*. 11, 127-132, 2012.
- [50] T. Stulnig y A. Amberger, Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations, *BioTechniques*. 16,. 402-404, 1994.
- [51] F. García Pichel, A. López Cortés y U. Nubel, Phylogenetic and Morphological

- Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau. 67, 2001.
- [52] R. Myers, T. Maniatis y L. Lerman., Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Methods in Enzymology*.19, 1987.
- [53] Laura y L. Pla, Biodiversidad: inferencia basada en el índice de shannon y la riqueza, *Interciencia*. 31, 583-590, 2006.
- [54] U. Strandberg, S. J. Taipale, M. Hiltunen, A. Galloway, M. Brett Y P. Kankaala, Inferring Phytoplankton Community Composition With A Fatty Acid Mixing Model, *Ecosphere*.6, 2-18, 2015.
- [55] G. Zittelli, F. Lavista, L. Bastianini, L. Rodolfi, M. Vincezini y M. Tredici, Production of eicosapentanoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors, *Journal of Biotechnology*, . 299-312, 1999.
- [56] M. Song, H. Pei, W. Hu y G. Ma, Evaluation of the potencial of 10 microalgal strains for biodiesel production, *Bioresours Technology*.8,. 245-251, 2013.
- [57] J. Herrera Silveira, I. Medina Gomez y R. Colli, Trophic status based on nutrient concentration scales and primary producers community of tropical coastal lagoons influenced by groundwater discharges, *Hidrobiología*, . 91-98, 2002.
- [58] J. Herrera-Silveira, N. Aranda Cirerol, L. Troccoli Ghinaglia, F. Comín y C. Madden, EUTROFIZACIÓN COSTERA EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN, *LOS ECOSISTEMAS DEL GOLFO DE MÉXICO*, *Ecotropicos*. 18,. 822-847, 2005.
- [59] L. Hernández, M. Rebolledo, M. Merino, M. Soto, A. Le-Cossec y E. Monroy, Groundwater Pollution in a Karstic Region (NE Yucatan): Baseline Nutrient Content and Flux to Coastal Ecosystems, *Water, Air & Soil Pollution*. 218, 517–528, 2011.

- [60] R. Carlson, A trophic state index for lakes, *Limnology and Oceanography*.22,. 361-369, 1977.
- [61] F. Espinosa, A CLOROFILA A COMO BASE PARA UN ÍNDICE TRÓFICO EN LAGUNAS COSTERAS MEXICANAS, 1994.
- [62] C. Álvarez, M. d. I. A. Liceaga y J. Herrera , Variaciones estacionales de la estructura comunitaria del fitoplancton en zonas de descarga de agua subterránea en la costa norte de la Península de Yucatán, *Revista de Biología Tropical*. 60, 157-172, 2012.
- [63] J. Herrera-Silveira, F. Comin, N. Aranda-Cirerol, L. Troccoli y L. Capurro, Coastal water quality assessment in the Yucatan Peninsula: management implication, *Ocean & Coastal Management*. 47, 625-639, 2004.
- [64] F. García , Y. Freile-Pelegrín y D. Robledo, Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico, *Bioresource Technology*.7, 1359–1365, 2007.
- [65] A. Shenbaga Devi, P. Santhanam, V. Rekha, S. Ananth, B. Balaji y R. Prasath, Culture and biofuel producing efficacy of marine microalgae *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis* sp, *Algal Biomass Utilization*.3, 38–44 , 2012.
- [66] G. Muyzer y K. Smalla, A lication of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie Leeuwenhoek*, vol. 73, 127-141, 1998.
- [67] S. Fischer y L. Lerman, DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, 1579-1583, 1983.

- [68] I. Guschina y J. Harwood, Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, *Progress in Lipid* , vol. 45, 160–186, Research.
- [69] L. C. Fernández-Linares, J. Montiel-Montoya, . A. Millán-Oropeza y J. Badillo-Corona, Producción de biocombustibles a partir de microalgas, *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo*, vol. 8, 101-115, 2012.
- [70] M. Loera-Quezada y E. Olgúin, Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades, *Latinoam Biotechnol Amb Algal.1*, 91-116, 2010.
- [71] A. Garibay Hernández, R. Vázquez-Duhalt, M. d. P. Sánchez Saavedra, L. Serrano Carreón, y A. Martínez Jiménez, Biodiesel a Partir de Microalgas, *BioTecnología*. 13, 38-61, 2009.

## Anexos

### Formulación del medio BG-11

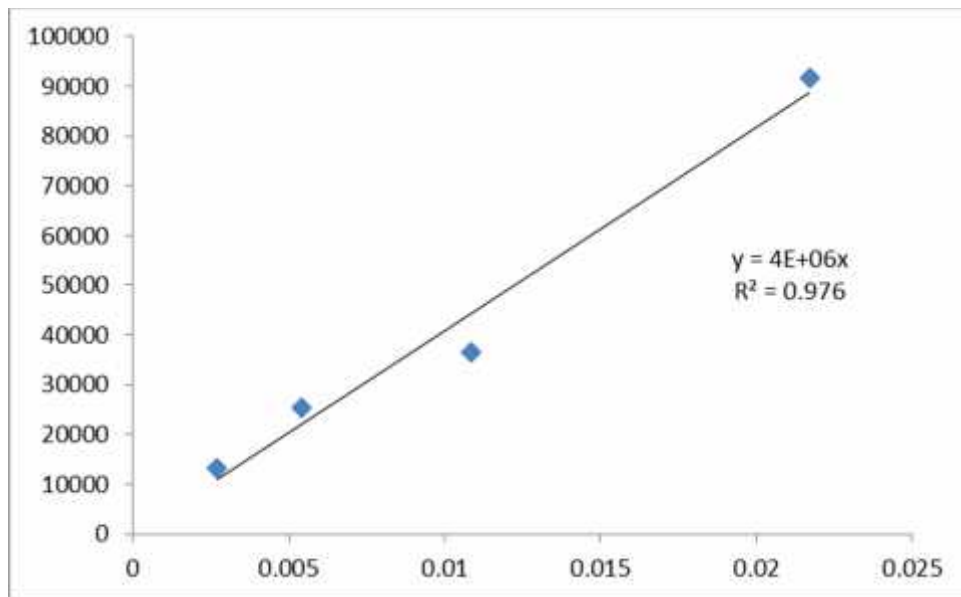
Componente	Cantidad	Solución stock	Concentración final
NaNO <sub>3</sub>	10 mL/L	30 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	17.6 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mL/L	0.8 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.22 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mL/L	1.5 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.03 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mL/L	0.72 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.2 mM
Ácido Citrico·H <sub>2</sub> O	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.03 mM
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·Fe <sup>3+</sup> ·NH <sub>3</sub>	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.02 mM
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	10 mL/L	0.02 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.002 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 mL/L	0.4 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.18 mM
Solución de metales traza (46 μM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 9 μM MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 0.77 μM ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 1.6 μM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0.3 μM CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, 0.17 μM Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	1 mL/L		1 mM
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	24.8 g/100 mL		

### Formulación del medio Guillard (f/2)

Componente	Cantidad	Concentración final
NaNO <sub>3</sub>	74.96mg/L	8.82 x10 <sup>-4</sup> M
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> NA·H <sub>2</sub> O	4.343mg/L	3.62 x10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	12.939 mg/L	1.06 x10 <sup>-4</sup> M
Solución de metales traza	1 mL/L	
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O		1.1 x10 <sup>-5</sup> M
FeCl <sub>3</sub>		1.1 x10 <sup>-5</sup> M
SO <sub>4</sub> Cu·5H <sub>2</sub> O		3.9 x10 <sup>-8</sup> M
SO <sub>4</sub> Zn·7H <sub>2</sub> O		7.6 x10 <sup>-8</sup> M
Cl <sub>2</sub> CO·6H <sub>2</sub> O		4.2 x10 <sup>-8</sup> M
Cl <sub>2</sub> Mn·4H <sub>2</sub> O		9.0 x10 <sup>-7</sup> M
MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		
Solución de vitaminas		
Cianocobalamida	3.7 μL	3.6 x10 <sup>-10</sup> M
Tiamina	9 μL	3.6 x10 <sup>-7</sup> M
Biotina	20μL	3.6 x10 <sup>-9</sup> M
NOTA: El medio se prepara con agua de mar estéril		

C14

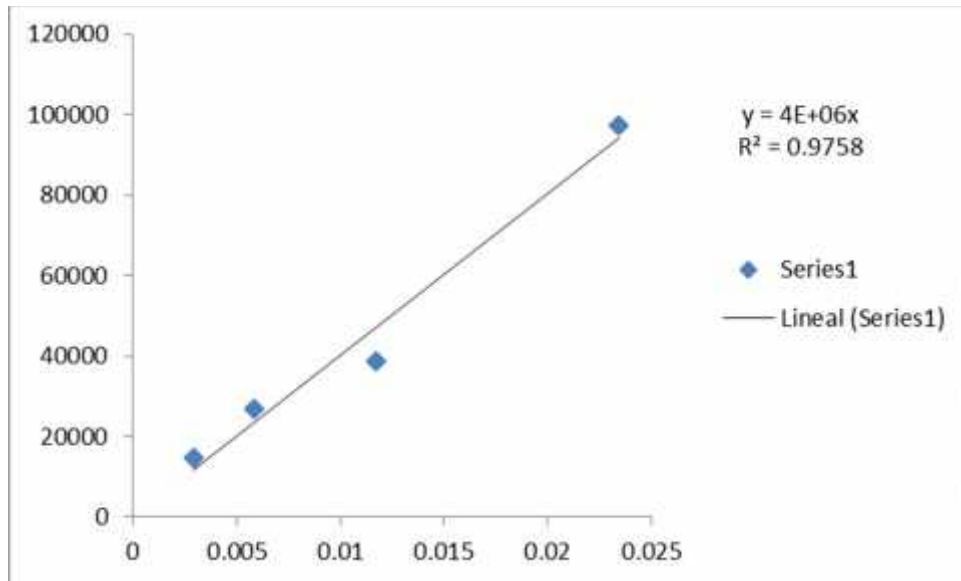
	mg	area
4(2.5 mg/ml)	0.0027125	13165.18
3(5mg/ml)	0.005425	25472
2(10mg/ml)	0.01085	36433.54
1 (20mg/ml)	0.0217	91653.21





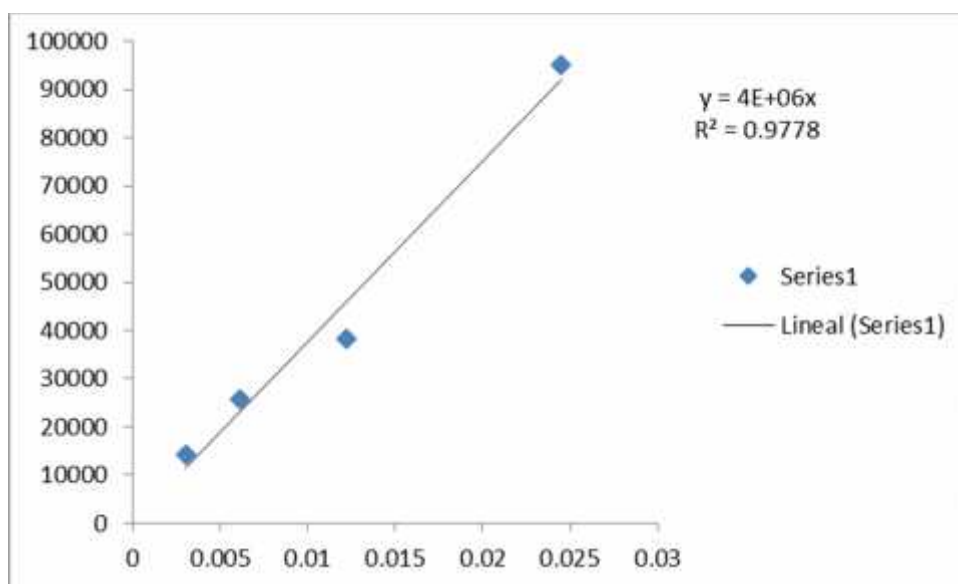
C16

	mg	area
<b>4(2.5 mg/ml)</b>	0.00293125	14749.74
<b>3(5mg/ml)</b>	0.0058625	26860.06
<b>2(10mg/ml)</b>	0.011725	38860.25
<b>1 (20mg/ml)</b>	0.02345	97271.19



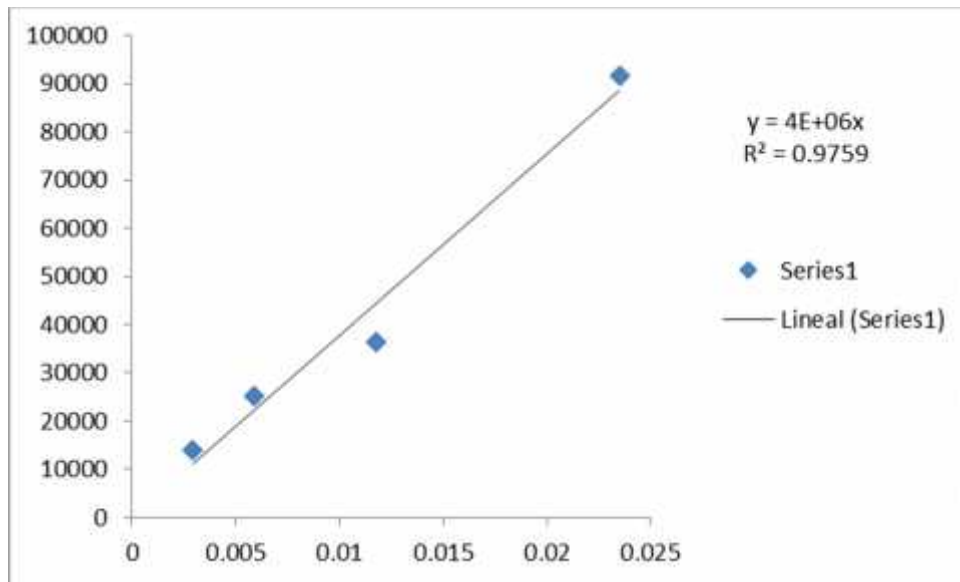
C17

	mg	area
<b>4(2.5 mg/ml)</b>	0.0030625	14330.97
<b>3(5mg/ml)</b>	0.006125	25611.03
<b>2(10mg/ml)</b>	0.01225	38154.12
<b>1 (20mg/ml)</b>	0.0245	95040.14



C18

	mg	area
<b>4(2.5 mg/ml)</b>	0.0029375	13882.75
<b>3(5mg/ml)</b>	0.005875	25114.3
<b>2(10mg/ml)</b>	0.01175	36515.8
<b>1 (20mg/ml)</b>	0.0235	91508.22



C18:1

	mg	area
<b>4(2.5 mg/ml)</b>	0.00291875	14460.24
<b>3(5mg/ml)</b>	0.0058375	25932.37
<b>2(10mg/ml)</b>	0.011675	38029.96
<b>1 (20mg/ml)</b>	0.02335	94006.25

