UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Región Poza Rica - Tuxpan

Maestría en Ciencias del Ambiente

Trabajo de intervención

“Análisis bromatológico de cepas *Chlorella* spp. aisladas del Río Tuxpan para evaluación de su uso bioenergético”

P R E S E N T A

Ing. Amb. Jesús Iván Pérez Romero

Director

Dr. Leandro Chaires Martínez

Co- Director

Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza

Tuxpan Veracruz Diciembre, 2019

Tuxpan de Rodríguez Cano Veracruz, 25 de Noviembre de 2019

El presente Trabajo de Intervención titulado: **"Análisis bromatológico de cepas Chlorella spp. aisladas del Río Tuxpan para evaluación de su uso bioenergético",** realizado por el Ing.Amb. Jesús Iván Pérez Romero, bajo la dirección del Dr. Leandro Chaires Martínez y Co-Director del Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza, ha sido revisada y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRIA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Dr. Leandro Chaires Martínez

DIRECTOR

Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza

CO-DIRECTOR

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Revisión del Trabajo de Intervención del alumno: Jesús Iván Pérez Romero

JURADO EXAMINADOR

NOMBRE	FECHA	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Laura Lucero Alvarez-Molina	**06/septiembre/2019**	**Aprobado**	
Rodrigo Cuevas González	17/oct/2019	aprobado	
CARLOS GONZALEZ GANDARA	17/OCT/2019	APROBADO	

En la presente revisión se acordó que el Trabajo de Intervención titulado **Análisis bromatológico de cepas Chlorella spp. aisladas del Río Tuxpan para evaluación de su uso bioenergético** que presenta el sustentante **Jesús Iván Pérez Romero** para obtener el Grado de Maestro, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicialmente al Dr. Leandro Chaires Martínez por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Quiero agradecer a la Universidad Veracruzana por permitirme estudiar el posgrado.

Al Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza por sus consejos y revisiones de este trabajo.

A mi comisión revisora a la Dra. Laura Lucero Álvarez Medina, el Dr. Carlos Gonzales Gándara y el Dr. Rodrigo Cuervo Gonzáles por todas las observaciones y recomendaciones de este trabajo.

A la empresa Microalgas Óleas de México y todo personal por abrirme las puertas en la cual ayudó en la realización de este trabajo.

A conacyt por haberme otorgado la beca y haber contribuido directamente en la realización de este trabajo.

A gradezco al Centro de Investigación en Alimentos y Ambiental del Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache (CIAA-ITSAT) por abrirme las puertas y el apoyo brindado por todo el personal y estudiantes.

DEDICATORIA

A mis padres, abuelos y mi hermana, que son las personas que siempre han confiado en mí y sin su apoyo esto no hubiese sido posible.

El compromiso personal de un hombre con su habilidad, el compromiso intelectual y el compromiso emocional trabajando juntos como uno solo, ha hecho el ascenso del hombre.

Jacob Bronowsky

ÍNDICE

RESUMEN **1**

INTRODUCCIÓN **2**

ANTECEDENTES **4**
2.1 Problemática ambiental 4
2.2 El biodiésel 4
2.3 Materias primas para la producción de biodiésel 4
2.4 Aplicaciones y características de las microalgas 5
2.5 Inicios del cultivo de microalgas 6
2.6 Contenido lipídico de las microalgas 7
2.7 *Chlorella* spp. 8

III. OBJETIVOS **9**
3.1 Objetivo general 9
3.2 Objetivos específicos 9

MATERIALES Y MÉTODOS **10**
4.1 Área de estudio 10
4.2 Procedimiento de muestreo 10
4.3 Trabajo de laboratorio 12
4.3.1 Aislamiento e identificación taxonómica 12
4.3.2 Cultivos de microalgas 12
4.3.3 Evaluación de la densidad óptica 13
4.4 Análisis bromatológico 14
4.4.1 Humedad 14
4.4.2 Carbohidratos 14
4.4.3 Proteínas 15
4.4.5 Lípidos 15
4.4.6 Análisis cromatográfico 15
4.6 Cultivo masivo de microalgas 16
4.5 Análisis estadístico 16
4.7 Extracción de lípidos 16
4.8 Transesterificación y obtención de biodiésel 17

V. RESULTADOS **19**
5.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos del agua 19
5.2 Identificación taxonómica 19
5.4 Cinética de crecimiento de microalgas 21
5.5 Determinación de biomasa final 22
5.6 Análisis bromatológicos 24
5.7 Perfil de ácidos grasos 25
5.8 Cultivo masivo 26
5.9 Biodiésel de lípidos de microalgas 27

VI. DISCUSIÓN **29**
VII. CONCLUSIONES **34**
V.III APLICACIÓN PRÁCTICA **35**
XI. BIBLIOGRAFÍA **36**
X. ANEXOS **44**

Índice de figuras

Figura 1.Puntos de muestreo en el Río Tuxpan. 11

Figura 2.Placa para medición de densidad óptica en espectrofotómetro. 13

Figura 3.Pulverización de biomasa 14

Figura 4.Extracción de lípidos en extractor Soxhlet. 17

Figura 5.Recuperación de éter de petróleo en rotavapor. 17

Figura 6.Microalgas del filo Chlorophyta. A) Monactinus Simplex, B) Ankistrodesmus sp, c) Scenedesmus sp, d) Chlamydomona sp.1, e) Chlamydomona sp.2, f) Chlorella sp1, g) Chlorella sp2, h) Chlorella sp3, i) Kirchneriella sp, j) Gonium sp. 20

Figura 7.Microalgas del filo Ochrophyta. a) Melosira sp, b) Pleurosigma sp. c) Coscinodiscus asteromphalus, d) Cymbella sp, e) Gyrosigma sp, f) Entomoneis sp, g) Bacillaria paxillifer, h) Navicula sp.1, i) Navicula sp.2, j) Navicula sp.3, k) Navicula sp4. 21

Figura 8.Microalga del filo Euglenozoa. Euglena sp. 21

Figura 9.Densidad óptica del cultivo de las cepas utilizando 450mL. 22

Figura 10.Densidad óptica del cultivo de las cepas utilizando 8 L. 23

Figura 11.Densidad óptica del cultivo de las cepas utilizando 16 L. 23

Figura 12.Cultivo masivo de Chlorella sp3 (a-c) y biomasa liofilizada (d). 27

Figura 13.Biodiésel de microalgas. 28

Índice de cuadros

Cuadro 1.Producción de biodiesel a partir de aceites de algunas materias primas . 5

Cuadro 2.Parámetros físico-químicos de muestras de agua. 19

Cuadro 3.Producción de biomasa en peso seco de los cultivos seleccionados. 24

Cuadro 4.Resultados bromatológicos de las cepas. 25

Cuadro 5. Perfil de ácidos grasos para las diferentes cepas de algas. 26

RESUMEN

La problemática actual a la que se enfrenta la humanidad es la crisis energética y la contaminación ambiental. La alternativa de producir biodiésel de aceite de microalgas es prometedora, por las ventajas que tiene sobre las plantas oleaginosas como: eficiencia fotosintética, periodos de cosecha cortos, uso de suelos agrícolas no arables, por lo que no compite por suelos para alimentación humana. El trabajo realizado consistió en dos fases: el primero fue la colecta de microalgas en el Río Tuxpan con la ayuda de una red de fitoplancton 20 µm de apertura y la segunda el análisis de las muestras en el laboratorio. Se identificaron un total de 22 especies de microalgas (Chlorophyta 10, Ochrophyta 11 y Euglenozoa 1). Se seleccionaron tres especies*: Chlorella* sp1, *Chlorella* sp2 y *Chlorella* sp3 y se compararon los resultados con una cepa de *Chlorella Vulgaris* como control. Las condiciones de cultivo fueron medio de cultivo bold basal, foto periodo 12:12 y aireación constante Se observó que la cepas *chlorella* sp1 y 3 presentaron mayor producción de biomasa en cultivos en lote de 16 L (0.34 y 0.30 g/L, respectivamente) A las microalgas seleccionadas se les realizó un análisis bromatológico para la determinación de proteínas, carbohidratos y lípidos resultando estadísticamente similares, pero con la característica de que *Chlorella* sp3 contiene 28.87% de Ácido α -Linolénico C-18:3C con respecto a las Chlorellas sp1 y sp2 que presentaron en 0% en el análisis cromatográfico de perfil de ácidos grasos, el cual es útil para la formación de biodiésel y por tanto esta cepa se seleccionó para su producción masiva. Posterior a la cosecha de Chlorella sp3, la biomasa fue deshidratada, pulverizada para la extracción de lípidos y del extracto obtenido se llevó a una reacción de transesterificación. Por cada kilogramo de biomasa se obtuvieron 34.46 mL de biodiésel. La relevancia de los resultados obtenidos radica en la generación de un cuerpo de conocimientos pertinente para que a mediano y largo plazo se estructure una plataforma tecnológica de producción de biodiésel a partir de microalgas. Por otro lado, el listado ficológico reportado, puede llegar a ser útil en el desarrollo de futuras investigaciones de las microalgas presentes en el Río Tuxpan.

Palabras clave: *Chlorella*, lípidos, biomasa, transesterificación, biodiésel.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de los combustibles fósiles es el principal problema ambiental que enfrenta la humanidad; la combustión de éstos emite gases tales como dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, hidrocarburos no quemados y cenizas que provocan el efecto invernadero (Sacristan, 2013; OMS, 2015; Cruz, 2016; Arrousi *et al.,* 2017). Otro problema adicional es la crisis energética, ya que los combustibles fósiles son un recurso no renovable y se estima que las reservas de este recurso energético se agotarán tarde o temprano (Castro, 2009; Nava, 2014; Ruíz, 2014). Se estipula que el carbón se agotará en 218 años, el gas natural en 63 años y el petróleo en 41 años (Agarwal, 2007; Rodolfi; 2009; Yu *et al.,* 2012).

La crisis energética y la contaminación ambiental han orillado a diferentes naciones en todo el mundo a la generación de nuevas fuentes de energía más amigables para el medio ambiente (i.e. solar, fotovoltaica, hidroeléctrica, geotérmica, eólica y biomasa) y se espera que en el futuro los biocombustibles (biodiésel y bioetanól) puedan sustituir al diésel y la gasolina por la incertidumbre del futuro de estos recursos (Posten y Schaub, 2009; Loera-Quezada y Olguín, 2010; Cruz, 2016).

De acuerdo con la literatura actual, los lípidos producidos por microalgas se consideran con potencial para fines bioenergéticos (Chisti, 2007; Garibay-Hernández, 2013; Nava, 2014). Se han colectado y aislado microalgas de diferentes fuentes como ríos, lagos, océanos, e inclusive de aguas residuales (Sacristan, 2013; García, 2017). Diversos autores recomiendan seguir realizando trabajos de investigación enfocados al aislamiento y evaluación del potencial lipídico de las microalgas para generar información y explotar este recurso (Magaña-López, 2014; Castillo *et al*., 2017. Los cultivos de microalgas pueden proliferar en casi cualquier región y no compiten por el uso de suelo fértil destinado a las actividades antropogénicas, contrario al uso de plantas oleaginosas, cuya disponibilidad hace imposible producir la demanda de diésel en México y el mundo (Garibay *et al*., 2009; Fernández-Linares *et al.,* 2012, Faried *et al.,* 2017). El estudio y las aplicaciones de las microalgas no sólo se centran en la obtención de biodiésel, sino también en su papel para resolver problemáticas como: calentamiento global, cambio climático y

seguridad alimentaria (Greene *et al*., 2016; 2017).En la región norte del estado de Veracruz, se pueden localizar fuentes importantes para el aislamiento y estudio de diversas especies de microalgas con diferentes fines biotecnológicos. Por ejemplo, los cuerpos de agua dulce representados en la región hidrológica 27 por los ríos: Tecolutla, Cazones, Tuxpan, Nautla y Misantla (Navarrete, 2002), así como cuerpos de agua salobre (i.e. lagunas costeras), que se localizan en la costa del Golfo de México. La justificación de este trabajo es la aportación de información para la obtención de combustibles amigables con el ambiente, Hasta la fecha, no hay reportes de trabajos de investigación de microalgas para la obtención de biodiesel en el Río Tuxpan, por lo cual se consideró propicio elegir el sitio para una colecta de microalgas y evaluar su potencial lipídico. Aunado a lo anterior, el aislamiento de microalgas presentes en Río Tuxpan podría ser importante para estudios ecológicos, con aplicación de un análisis bromatológico se podrá conocer el metabolismo de estas como: carbohidratos, proteínas, lípidos y/o de diversas aplicaciones biotecnológicas que nos pueden ofrecer, como la síntesis de altas concentraciones de lípidos para la producción de biodiesel, pigmentos para la industria alimentaria, compuestos bioactivos para la industria farmacéutica, entre otras (Greene *et al*., 2017). Por lo que la realización de colectas e identificación aportará información de especies de microalgas presentes en el Río Tuxpan para la producción de biodiésel.

II. ANTECEDENTES

2.1 Problemática ambiental

Actualmente la humanidad se enfrenta a diversos problemas ambientales, sociales y económicos. El agotamiento de hidrocarburos, la demanda exponencial de combustibles fósiles y el calentamiento global han provocado la búsqueda de energías amigables con el medio ambiente. El desarrollo sostenible es el principio que el mundo se ha planteado incluyendo la conservación del medio ambiente para futuras generaciones y la investigación en energías con poca o nulas emisiones de gases de efecto invernadero (Agarwal, 2007; Ramírez *et al.,* 2012). En el año 2015 en parís acordaron limitar el aumento de temperatura que provocan los gases de efecto invernadero en la conferencia del cambio climático (Greene *et al*., 2017). Los biocombustibles, bioetanol y biodiesel, pueden ser una de las alternativas para este problema en la sustitución de combustibles fósiles para el uso de automóviles de motor para diésel y gasolina (Agarwal, 2007; Ramírez et al., 2012).

2.2 El biodiésel

El biodiésel es un combustible que se produce a partir de la transesterificación de aceites vegetales o animales (Ramírez *et al*., 2012; Mardhia *et al*., 2017). De acuerdo con Miao y Wu, (2006) está compuesto por metil ésteres de ácidos grasos de cadena larga (C14 – C22). El biodiésel es una alternativa de combustible más amigable con el medio ambiente, porque es biodegradable, posee menor toxicidad comparado con los combustibles fósiles, en la combustión genera menores emisiones de sulfatos, monóxido de carbono, dióxido de carbono, compuestos aromáticos y humo (Atabani *et al*., 2012). Varias empresas de Estados Unidos, Francia, Alemania, Brasil, Argentina, entre otras, ya utilizan biodiésel en el transporte público (Islas *et al*., 2007).

2.3 Materias primas para la producción de biodiésel

Los cultivos oleaginosos como el aceite de palma, girasol, coco, cacahuate, oliva, mostaza, colza y soya son las principales materias primas que se han utilizado para producir biodiésel (Al-Zuhair, 2007; Meng *et al*., 2009; Lam y Lee 2011), pero el cultivo de oleaginosas requiere de grandes extensiones de suelo, situación que

podría provocar una crisis alimentaria (Schenk *et al*., 2008; Garibay *et al*., 2009; *Castillo et al*., 2017). Por otro lado, se ha evidenciado que en Brasil y el sureste asiático la producción de palma y soya ha ocasionado una deforestación alarmante de la selva tropical (Schenk *et al*., 2008; *Castillo et al*., 2017). Por esto, el cultivo de microalgas constituye una alternativa, particularmente por su producción.

En Cuadro 1, se muestra el rendimiento en la obtención de biodiésel a partir de diversas materias primas (Miao y Wu, 2006; Chisti, 2007; Schenk *et al*., 2008); en el caso específico de las microalgas con la tecnología actual se estima que se puede llegar a producir hasta 20, 000 L/ha/año (Wijffels, 2008).

Cuadro 1.Producción de biodiesel a partir de aceites de algunas materias primas

Materias Primas	**Biodiesel (L /ha/año)**
Algodón	325
Soja	446
Semilla de mostaza	575
Semilla de girasol	952
Colza	1,190
Jatropha	1,892
Aceite de palma	5,950
Microalgas	20,000

2.4 Aplicaciones y características de las microalgas

Algunas especies de microalgas han sido aprovechadas en diferentes actividades acuícolas como alimento porque contienen nutrientes esenciales; proteínas, lípidos, pigmentos y minerales (Abu-Rezq *et al*., 2010; Magaña-López, 2014). Por ejemplo, para *Nannochloropsis oculata* se cuantificó hasta un 32% de contenido lipídico del

peso total, lo cual ha sido aprovechado para la producción de biodiésel (Rodolfi et al., 2009). Algunas de las características que poseen las microalgas son (Garibay *et al*., 2009; Mata *et al*., 2010):

- Las microalgas son microorganismos fotosintéticos.
- Se encuentran en casi cualquier hábitat: aguas marinas, dulces, salobres, residuales.
- Producen el 50% del oxígeno y 50% de la fijación de carbono del planeta.
- Producen diferentes metabolitos de interés biotecnológico.
- Diferentes tipos de metabolismo fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico y fotoheterotrófico.
- Gran biodiversidad, se han identificado un total de 40,000 especies y se estiman más de 100,000 especies.

El cultivo de microalgas con fines bioenergéticos ofrece mayores ventajas que las plantas convencionales, tales como: mayor eficiencia fotosintética, tasa de crecimiento elevada, periodos de cosecha muy cortos, crecen en cualquier ambiente, requieren menor cantidad de agua, mayor productividad de lípidos y el perfil de ácidos grasos puede ser controlado mediante la limitación de nutrientes. Por otro lado, la biomasa residual tiene diversas utilidades en la industria farmacéutica, agropecuaria y alimentaria (Chisti, 2007; Li *et al*., 2007; Schenk *et al*., 2008). Esta tecnología puede ser aprovechada reciclando las emisiones de CO_2 de industrias termoeléctricas y la ventaja más promisoria es el rendimiento lipídico por unidad de área que son superiores a las plantas oleaginosas (Meng *et al*., 2009; Rodolfi *et al*., 2009; Vyas *et al*., 2010).

2.5 Inicios del cultivo de microalgas

Desde los años cincuenta fue dado a conocer la importancia de las microalgas para su conversión en bioenergía. Pero a partir de la crisis energética de 1975, varias naciones como EUA, Japón y Australia reconocieron su importancia en el sector de energía (Rodolfi *et al*., 2009). Los primeros sistemas para la producción de microalgas con fines bioenergéticos datan del año 1978 por el Departamento de Energía (DOE) de los Estados Unidos, quienes usaron sistemas abiertos y cerrados.

Los sistemas presentaron ventajas y desventajas, los abiertos resultaban de bajo costo, pero mostraron problemas de contaminación en monocultivos a largo plazo; mientras los sistemas cerrados evitan la contaminación pero su costo es relativamente caro (Green *et al.,* 2017). Huntley y Redalje (2007) desarrollaron una nueva tecnología que hizo más viables los monocultivos de microalgas, que consistieron primeramente en realizar los cultivos en sistemas cerrados hasta alcanzar una concentración celular para evitar la contaminación una vez trasladado el cultivo a sistemas abiertos.

2.6 Contenido lipídico de las microalgas

Actualmente se sabe que los lípidos o aceites de las microalgas son una alternativa que puede remplazar al petrodiésel dado sus múltiples usos y ventajas (Rodolfi *et al*., 2009). De acuerdo con distintos autores (Chisti, 2007; Mata, 2010; Lam y Lee, 2011), la elevada productividad lipídica de las microalgas es primordial para la producción de biodiésel, por lo cual los parámetros a considerar en la evaluación de una cepa son la cantidad de lípidos acumulados en la biomasa, la velocidad del crecimiento, la eficiencia metabólica y el diámetro de la microalga. Determinar el contenido lipídico de las microalgas resulta difícil ya que varía dependiendo las condiciones del cultivo: en sistemas desfavorables o bajo estrés, que muchas veces ayuda al incremento de la síntesis de lípidos. Los lípidos de microalgas constituyen entre el 20-50% en peso seco, pero en algunos casos se ha reportado hasta el 80% (Garibay-Hernández *et al.,* 2009).

Las microalgas oleaginosas pertenecen a diversos grupos taxonómicos: rodofitas, xantofitas, dinofitas, eustigmatofitas, heptofitas, crisofitas, diatomeas y clorofitas, bajo condiciones normales de cultivo sintetizan un promedio de 25.1% y bajo estrés 45%. Las algas verdes (clorofitas) se adaptan en casi cualquier sistema, son fáciles de aislar y desarrollo en condiciones de laboratorio, lo cual se han identificado numeras especies de este grupo (Garibay-Hernández *et al.,* 2009).

2.7 *Chlorella* spp.

Chlorella es un género de microalgas unicelulares con forma elipsoidal y de color verde que pertenece a la división Chlorophyta y la clase Chlorophyceae. Su estructura celular con un diámetro promedio de 2-8 µm incluye: membrana celular, cloroplastos (clorofila a y b) y no posee flagelo. Se encuentra presente en aguas dulces y salobres. Durante la fotosíntesis se multiplica exponencialmente, requiere CO2, luz solar, agua y algunos minerales. La composición bioquímica de *Chlorella* contiene cerca: 45% de proteínas, 20% de carbohidratos, 20% lípidos, 5% fibras y 10% de vitaminas y minerales. Históricamente el cultivo de *Chlorella* ha sido aprovechado para la industria alimentaria y la obtención de metabolitos. En la actualidad *chlorella* es potencial para la producción de biocombustibles por su alto contenido de lípidos. Esta microalga se ha aprovechado para el tratamiento de aguas residuales removiendo, fósforo, nitrógeno, metales pesados y demanda química de oxígeno (Teran y Posada, 2019). *Chlorella* puede desarrollarse a diversos tipos de medios de cultivo y posee gran capacidad de adaptación a diferentes sistemas ambientales por lo que su elección como cepa, es indicada para obtener lípidos para la producción de biocombustibles (Teran y Posada, 2019).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el potencial lipídico mediante un análisis bromatológico de cepas de *Chlorella* spp. aisladas del Río Tuxpan, Veracruz con fines de producción de biodiesel.

3.2 Objetivos específicos

- Colectar, aislar e identificar taxonómicamente especies de microalgas aisladas del Rio Tuxpan para la generación de información ficológica.
- Realizar un análisis bromatológico y seleccionar la cepa de *Chlorella* spp de mayor síntesis de lípidos.
- Llevar a cabo cultivos en lote para la producción masiva de biomasa microalgal de *Chlorella* sp.
- Producir biodiésel a partir de la extracción de lípidos con la cepa de microalgas seleccionada para este fin.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La etapa experimental está dividida en dos fases, la primera consiste en el trabajo de campo dónde se llevó a cabo muestreos para la colecta de material ficológico, y en la segunda es el trabajo de laboratorio, dónde se llevó a cabo la identificación taxonómica de las microalgas aisladas y purificadas, se realizó un análisis bromatológico y se seleccionó una cepa para cultivarla masivamente y llevar a cabo la producción de biodiésel.

4.1 Área de estudio

El Río Tuxpan pertenece a la Región Hidrológica 27, en la cual también se encuentra el Río Cazones, Misantla, Tecolutla y Nautla (Navarrete, 2002). El Río Tuxpan desemboca en el Golfo de México y pasa sobre la Ciudad y Puerto de Tuxpan, Veracruz. El clima de la región según INEGI es cálido subhúmedo con precipitaciones en verano, la temperatura anual promedio es de 24.9 °C (Navarrete, 2002). De acuerdo con Garduño, (2015) el pH superficial fluctúa entre 7.27 y 8. 71, y la salinidad superficial varía entre 1.51 a 35.40 ups.

4.2 Procedimiento de muestreo

El muestreo se llevó a cabo para obtener muestras de agua conteniendo fitoplancton, de las cuales fuera posible aislar y purificar microalgas útiles para el presente proyecto. El criterio utilizado para el muestreo en la localidad cercana a Juana Moza obedeció a evitar la zona urbana de Tuxpan y el contacto cercano a contracorrientes marinas; además, estuvo basado en la literatura donde los autores fijaron uno a tres puntos de muestreo para colecta de microalgas con fines de producción de biomasa y bioenergéticos (Guo *et al.*, 2013; Abdelaziz *et al.,* 2014; Mahmoud *et al*., 2015; Ferro *et al.,* 2018).

Para la colecta de material ficológico se llevaron a cabo tres muestreos en el Río Tuxpan en el mes de octubre del 2018 (Figura 2) en la zona congregación Juana Moza 20°54'47.96"N-97°27'49.18"O, 20°54'48.57"N-97°27'49.67"O y 20°54'51.31"N-97°27'.12"O en el municipio de Tuxpan Veracruz. Los muestreos se realizaron con una red de fitoplancton de 20 µm de apertura con arrestes horizontales y verticales, a 5 metros de profundidad (Bersanti y Gualtieri, 2014). Se

colectó un volumen de 500 mL en cada botella de plástico (12 en total), las cuales fueron cerradas herméticamente y colocadas en una hielera (Ruíz *et al*., 2014). A las muestras de agua se le tomaron diferentes parámetros como pH, salinidad y se determinaron fosfatos y nitratos por método visocolor ECO.

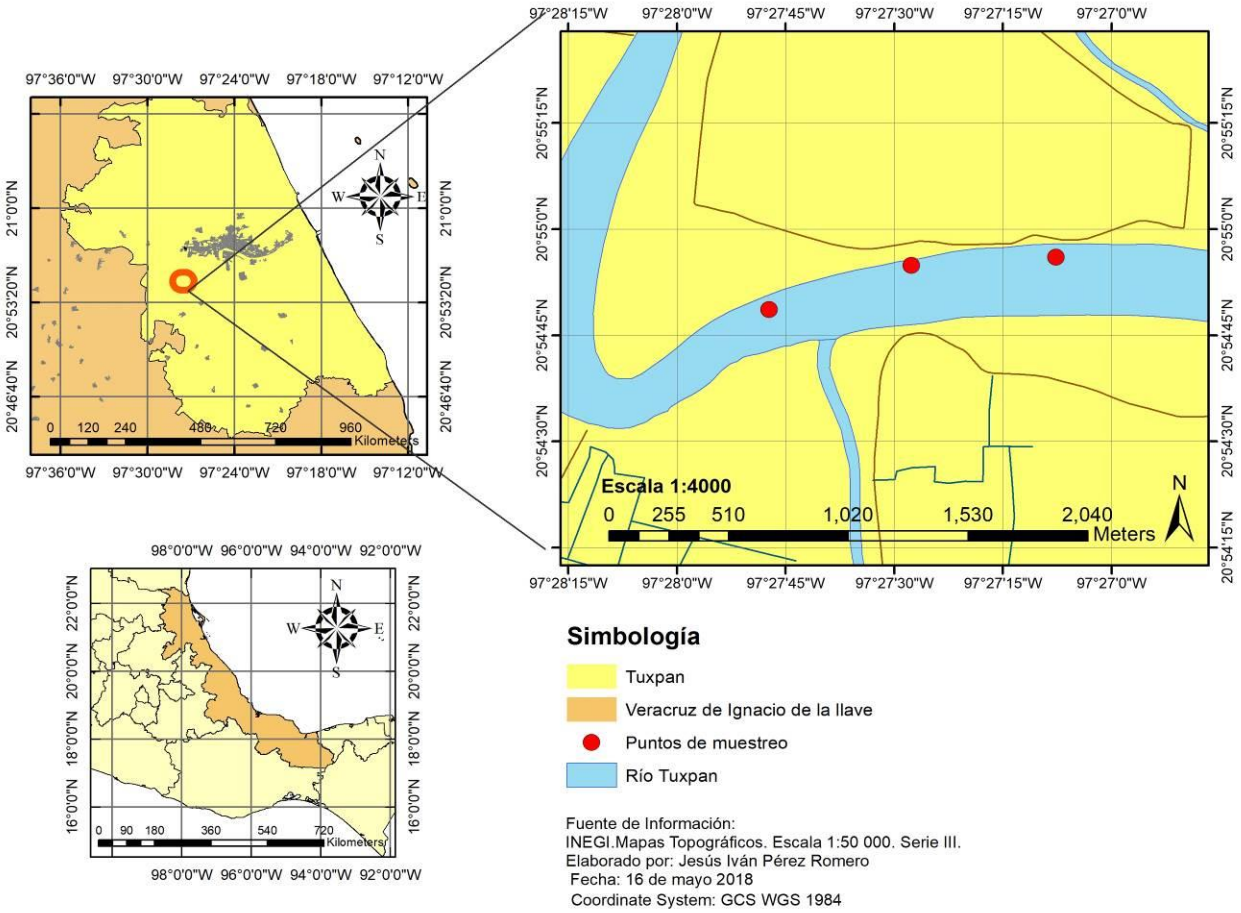


Figura 1.Puntos de muestreo en el Río Tuxpan.

Las muestras fueron trasladadas al Centro de Investigación en Alimentos y Ambiental del Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache (CIAA-ITSAT) y al laboratorio de Microalgas Oleas de México S.A de C.V. donde se realizó la identificación taxonómica, los cultivos, la cosecha y el análisis bromatológico.

4.3 Trabajo de laboratorio

4.3.1 Aislamiento e identificación taxonómica

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento y purificación de las microalgas fueron el Basal Bold (BBM), el BG11 y el F/2 (Anexo A), medios que han sido reportados de uso común para el cultivo de microalgas por diversos autores (Garibay-Hernández *et al.,* 2013; Bersanti y Gualtieri, 2014; Tale *et al.,* 2014; Pérez y Ayala, 2017). Para su preparación, una vez disueltas las sales de acuerdo a cada composición descrita (Anexo A), los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos y 15 lb de presión.

Con la finalidad de aislar las microalgas procedentes de las muestras de agua colectadas en el Río Tuxpan, se adicionaron 200 µl de cada botella de colecta en medios sólidos preparados con BBM, BG11, F/2, y replicas adicionando NaCl al 3% adicionados cada uno con agar bacteriológico a una concentración de 15 g/L. El procedimiento consistió en tomar e inocular los medios sólidos con una micro pipeta y puntas esterilizadas esparciendo con la ayuda de una espátula de vidrio para distribuir toda la muestra en el medio sólido. Posteriormente se cerraron herméticamente las muestras con parafilm y se colocaron las cajas en luz con foto periodo 12:12 (12 horas de luz y 12 de oscuridad) hasta el crecimiento abundante de las microalgas (Sacristan, 2013).

Una vez que crecieron microalgas en los medios en placas, notándose coloración verde, se procedió a realizar resiembras para lograr la máxima purificación de cada cepa. Finalmente, se llevaron a cabo preparaciones y observaciones en un microscopio óptico a 40X y con la ayuda de claves taxonómicas para microalgas (Bersanti y Gualtieri, 2014) se llevó a cabo la identificación de cada cepa aislada.

4.3.2 Cultivos de microalgas

El cultivo de microalgas fue iniciado tomando una asada de biomasa a partir de los cultivos sólidos de las cepas clasificadas como *Chlorella* sp1*, Chlorella* sp2, *Chlorella* sp3 para pasar a un matraz de 50 mL con medio BBM por triplicado y se comparó contra una cepa adquirida en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del I.P.N

denominada *Chlorella vulgaris* CDBB-A-12*,* incubando por 5 días en condiciones de aireación constante y un fotoperiodo de 12:12. Los cultivos fueron escalados una vez alcanzada la etapa estacionaria de crecimiento; primeramente, se inició el traspaso de 50 mL a matraces de 450 mL, se incubo por 7 días y posterior a este tiempo los 450 mL se traspasaron a un contenedor de 2L y se dejó incubar por 17 días. Este mismo protocolo se utilizó para escalar a garrafones con un volumen de 8 L y finalmente a 16 L (Arrendondo y Vitolina, 2007; Band-Schmidt, 2007; Magaña-López, 2014).

4.3.3 Evaluación de la densidad óptica

Para determinar la curva de crecimiento de los cultivos, periódicamente se tomó por triplicado una muestra de 300 µL de los cultivos de las microalgas *Chlorella* sp1, *Chlorella* sp2, *Chlorella* sp3 *y Chlorella vulgaris*, para el monitoreo de densidad óptica a 750 nm en el espectrofotómetro.

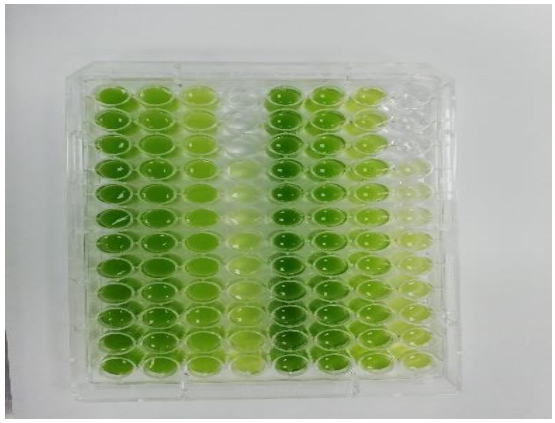


Figura 2.Placa para medición de densidad óptica en espectrofotómetro.

Para determinar la cantidad de biomasa producida en cada cultivo, se cosechó la biomasa (fase estacionaria) en tubos falcón de 50 mL y se centrifugó a 5500 rpm por 3 min a 4°C para concentrar el pellet. El sobrenadante se desechó y el pellet concentrado se transfirió al congelador a -5°C durante 24 horas y finalmente se liofilizó por 96 horas (Garduño, 2014). La muestra liofilizada se pulverizo en un mortero y se almacenó a temperatura ambiente para la determinación del peso en balanza analítica y los posteriores análisis bromatológicos.

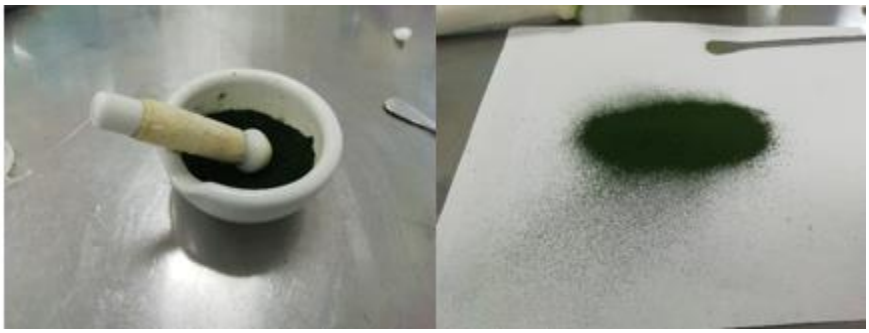


Figura 3.Pulverización de biomasa

4.4 Análisis bromatológico

Después que las muestras se pulverizaron, se llevó a cabo un análisis bromatológico, para determinar lípidos mediante el método de Folch (1956), carbohidratos mediante el método colorimétrico (DuBois *et al,* 1956), proteínas por el método de (Lowry *et al*, 1951), cenizas por la NMX-F-066-S-1978 y humedad por el método de (Nielsen, 2003).

4.4.1 Humedad

La humedad fue determinada colocando 1.0 g de muestra (pesada en balanza analítica) en charola de aluminio previamente tarada, se llevó al horno a 100°C durante 1 hora, luego al desecador y se pesó en balanza analítica, posteriormente se calculó el porcentaje de humedad peso/peso.

4.4.2 Carbohidratos

Se tomaron 10 mg de muestra y se le agregaron 5 mL de H_2SO_4 1M, se calentó durante 1 hora, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos y se tomaron 100 µL del sobrenadante, se colocaron en un tubo de ensayo, al cual se le agregaron 900 µL de H_2SO_4 1M, 1 mL de fenol al 5% y se dejó reposar 40 minutos; luego se agregaron 5 mL H_2SO_4 concentrado. La concentración de carbohidratos totales fue calculada en base a una curva de dextrosa de concentraciones de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 µg/mL; a la cual se le aplicó la misma metodología que a la muestra. Las muestras y la curva fueron colocadas por triplicado en una microplaca de 96 pocillos con volumen de 350 uL por pozo, luego se leyeron en el lector de placas a 485 nm.

4.4.3 Proteínas

Se tomaron 10 mg de muestra y se le agregaron 5 mL de NaOH 0.1N, luego se agitaron y de esta dilución se tomaron 100 µL y se colocaron en un tubo de ensayo al cual se le agregaron 900 µL de NaOH 0.1N y 5 mL de reactivo de Lowry C, se dejaron en la oscuridad 15 minutos, posteriormente se agregaron 500 µL del reactivo de Folin 1:1, se dejó nuevamente reposar en la oscuridad 40 minutos. La concentración de proteínas totales fue calculada en base a una curva de albumina de suero bovino de concentraciones de 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 y 150 µg/mL; a la cual se le aplicó la misma metodología que a la muestra. Las muestras y la curva fueron colocadas por triplicado en una microplaca de 96 pocillos con volumen de 350 µL por pozo, luego se leyeron en el lector de placas a 750 nm.

4.4.4 Cenizas

Para determinar la fracción de cenizas, se tomaron de 0.5 a 1.5 g de cada muestra, éstas se colocaron en crisol de 100 mL previamente tarado y posteriormente en una mufla a 600 °C durante 12 horas, enseguida se desecó y fue pesada en balanza analítica.

4.4.5 Lípidos

Se pesó 1 g de biomasa en un frasco ámbar al cual se le agregó una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) y se homogenizó por 10 minutos. El extracto obtenido se centrifugó 2 veces a 2500 rpm por 4 minutos, se separó la parte superior en embudos de decantación de 125 mL y se le agregó 0.8 partes de NaCl 0.09%, se mezcló y se dejó reposar 1 hora para que se diera la separación de fases, luego se decantó la fase inferior a un matraz bola previamente tarado y esté se llevó al rotavapor hasta completa evaporación del cloroformo y peso constante utilizando N_2.

4.4.6 Análisis cromatográfico

Se pesaron aproximadamente 10 mg de muestra en un tubo Pyrex de vidrio con tapa de teflón, luego se le agregó 1 mL de ácido tridecanoíco como patrón interno en hexano de concentración de 0.5 mg/mL, se agregaron 2 mL de NaOH 0.5 M; la mezcla se llevó a ebullición durante 15 minutos, luego se enfriaron en baño de hielo

y se agregaron 5 mL de BF_3 al 14%. Nuevamente se llevaron a ebullición 5 minutos, se enfriaron y se agregaron 5 mL de solución saturada de NaCl y 3 mL de hexano HPLC, se agitó lentamente la fase superior hexánica que contiene los esteres metílicos. Finalmente se filtró la muestra en una columna de Na_2SO_4 anhidro y se llevó al inyector del cromatógrafo de gases.

4.6 Cultivo masivo de microalgas

El cultivo masivo se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el apartado de cultivos de microalgas; la microalga seleccionada fue la *Chlorella* sp3 acorde a los resultados obtenidos presentó una mayor síntesis de lípidos respecto a las otras dos cepas analizadas de *Chlorella spp.* El cultivo masivo se escaló hasta 420L por un periodo de ocho días, para ser cosechada y liofilizada la biomasa (Arrendondo y Vitolina, 2007; Band-Schmidt, 2007; Magaña-López, 2014).

4.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de: Muestreos, cosecha de biomasa y análisis bromatológico de las Chlorellas sp1, sp2, sp3 y *Chlorella Vulgaris* se realizó una: media, desviación estándar de los tratamientos y sus réplicas. Así mismo un análisis de regresión lineal para verificar la distribución de normalidad, además un Análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba (Tukey) mediante el uso del programa estadístico Minitab 16.

4.7 Extracción de lípidos

Para la extracción de lípidos de biomasa seca se empleó el método de extracción Soxhlet utilizando éter de petróleo (Figura 4). La extracción de lípidos consiste en lavar repetidamente el cartucho dónde se encuentra la biomasa con el solvente hasta extraer los lípidos de la biomasa (Li *et al.,* 2007).

Figura 4.Extracción de lípidos en extractor Soxhlet.

Posterior a la extracción de lípidos el concentrado fue colocado en el rotavapor (Figura 5) con la finalidad de recuperar el solvente y contar solo con el aceite procedente de las microalgas.

Figura 5.Recuperación de éter de petróleo en rotavapor.

4.8 Transesterificación y obtención de biodiésel

Para la transesterificación del aceite se realizó una mezcla 5:1 de metanol (CH_4O) + hidróxido de sodio (NaOH). Previamente se colocó el NaOH al 1% respecto a la

cantidad de aceite, mezclando con el metanol en agitación para formar la reacción de metóxido de sodio (CH_3ONa). El cual fue vaciado al matraz de aceite de microalga en agitación moderada para alcanzar un mejor rendimiento de la reacción y a una temperatura de 65 °C por una hora. Finalmente la mezcla fue colocada en embudo de decantanción para separar las fases metil-esteres (biodiésel) + glicerina. Se separó la glicerina quedando el biodiésel de microalgas (Naik *et al.,* 2008; Sacristán, 2013).

V. RESULTADOS

5.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos del agua

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras de agua en los sitios de muestreo durante el mes de octubre se muestran en el cuadro 2. El análisis estadístico se reporta en el anexo C. Como se puede ver en el cuadro, los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$).

Cuadro 2.Parámetros físico-químicos de muestras de agua.

Muestreos	**pH**	**Salinidad** %	**NO_3 mg/L**	**PO_4 mg/L**
P1	7.5±0.1	3.0±0.11	0.2±0.05	0.2±0.05
P2	7.4±0.1	3.1±0.15	0.2±0.11	0.3±0.1
P3	7.4±0.5	3.1±0.15	0.2±0.11	0.2±0.05

Nomenclatura. ± Desviación estándar. P1-P3 muestreos realizados.

5.2 Identificación taxonómica

Se identificaron un total de 22 especies de microalgas del Río Tuxpan. En la figura 5 (A-H) se muestran las microalgas aisladas en su mayoría en medio bold basal y BG11. Estas corresponden al filo Chlorophyta, de las cuales las cepas seleccionadas para realizar un análisis bromatológico y evaluar su potencial lipídico fueron las del género *Chlorella*, que se clasificaron como *chlorella* sp1, *chlorella* sp2 y *chlorella* sp3.

En la figura 6 (A-J) se muestran microalgas del filo Ochrophyta, que son diatomeas, que en su mayoría crecieron en el medio F/2. En la figura 7 se muestra una fotografía de Euglena sp. (Filo: Euglenozoa), la cual creció en medio BG11.

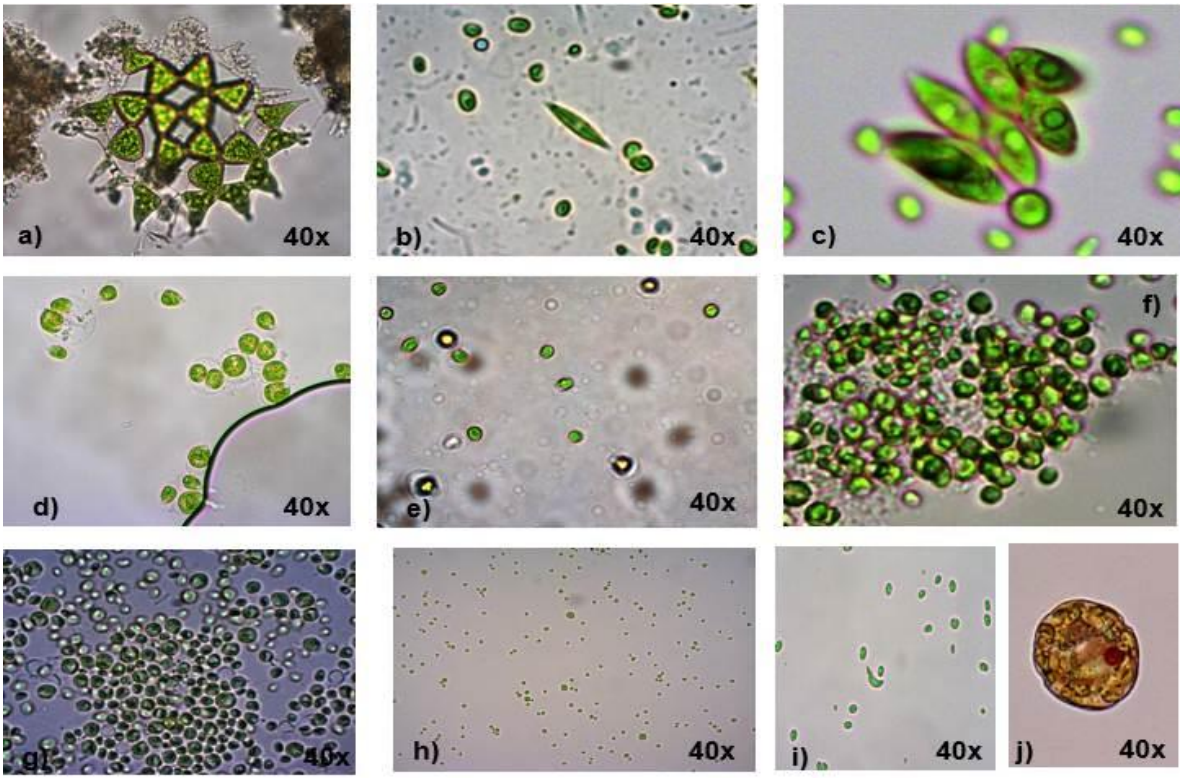


Figura 6.Microalgas del filo Chlorophyta. A) *Monactinus Simplex*, B) *Ankistrodesmus* sp, c) *Scenedesmus* sp, d) *Chlamydomona* sp.1, e) *Chlamydomona* sp.2, f) *Chlorella* sp1, g) *Chlorella* sp2, h) *Chlorella* sp3, i) *Kirchneriella* sp, j) *Gonium* sp.

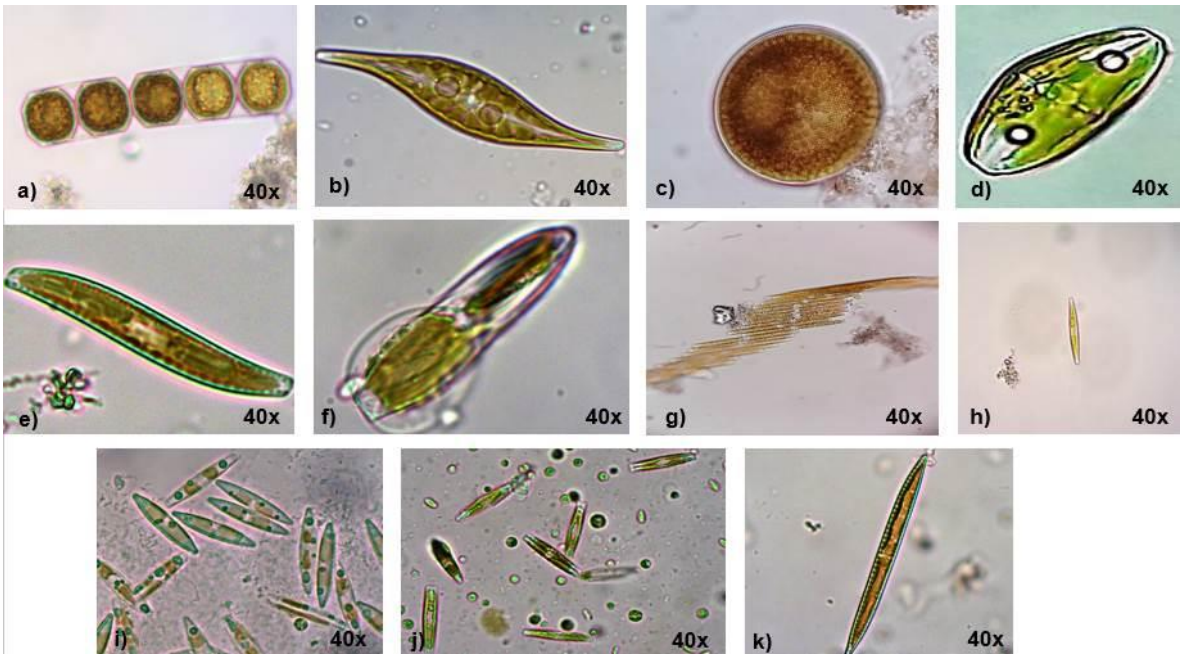


*Figura 7.*Microalgas del filo Ochrophyta*. a) Melosira* sp*, b) Pleurosigma* sp. *c) Coscinodiscus asteromphalus, d) Cymbella* sp*, e) Gyrosigma* sp*, f) Entomoneis* sp*, g) Bacillaria paxillifer, h) Navicula* sp.1*, i) Navicula* sp.2*, j) Navicula* sp.3*, k) Navicula* sp4*.*

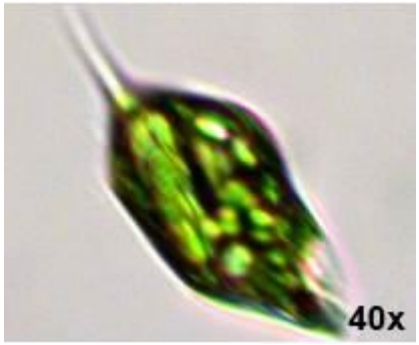


Figura 8.Microalga del filo Euglenozoa*. Euglena* sp*.*

5.4 Cinética de crecimiento de microalgas

Se optó por conseguir en un cepario nacional una cepa de *Chlorella vulgaris* para la comparación de resultados. En la figura 9, 10 y 11 se muestran las cinéticas de crecimiento de las cepas *Chlorella* sp1 (Csp1), *Chlorella* sp2 (Csp2), *Chlorella* sp3 (Csp3) y *Chlorella vulgaris* (CV) a los diferentes volúmenes del medio de cultivo en lotes. Como se puede observar los resultados son variables dependiendo del

volumen de trabajo utilizado. Por ejemplo, se obtuvo mayor crecimiento de la cepa Csp3 en el contenedor de 2 L y en el volumen de 450 mL la cepa Csp1 obtuvo el valor más alto. Ambas cepas mostraron mejor crecimiento en comparación con la cepa de *Chlorella vulgaris*. Este mismo comportamiento se mostró en los recipientes de 16 L, siendo la cepa Csp3 la de mejor resultado.

5.5 Determinación de biomasa final

Los resultados de la biomasa seca obtenida de la cosecha de los cultivos en garrafones de 16 L se muestran en el Cuadro 3. Como se puede observar y en concordancia con los datos de densidad óptica, las cepas sp1 y sp3 poseen significativamente ($P<0.05$) los valores más altos de biomasa en peso seco obtenidos. El análisis estadístico se puede encontrar en el anexo D.

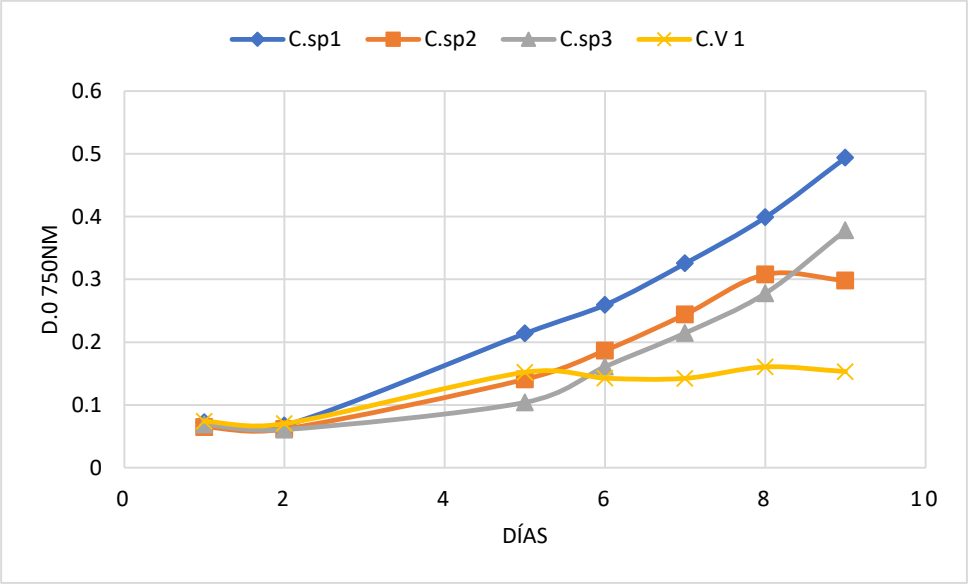


Figura 9.Densidad óptica del cultivo de las cepas utilizando 450mL.

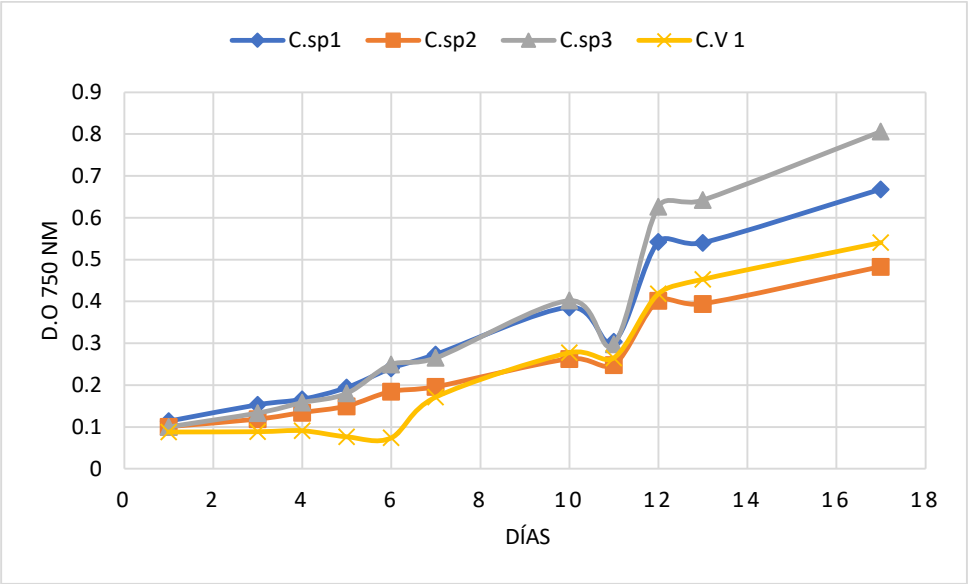


Figura 10.Densidad óptica del cultivo de las cepas utilizando 8 L

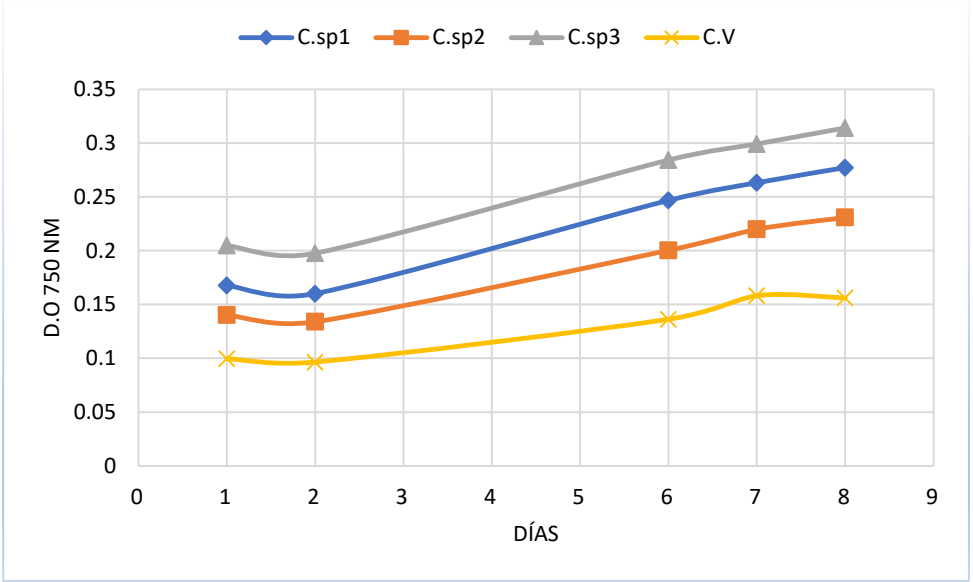


Figura 11.Densidad óptica del cultivo de las cepas utilizando 16 L.

Cuadro 3.Producción de biomasa en peso seco de los cultivos seleccionados.

Cepa	g/L
Chlorella sp 1	0.34±10a
Chlorella sp 2	0.20± 02ab
Chlorella sp 3	0.31±04a
Chlorella vulgaris	0.14±02b

Nomenclatura. ± Desviación estándar. (a-c) letras diferentes significan que existen diferencias significativas entre las medias.

En las figuras (9-11) se muestra el crecimiento celular de los cultivos de *Chlorella* sp1, *Chlorella* sp2, *Chlorella* sp3 y *Chlorella Vulgaris* a diferentes volumen: 450 mL, 8 L y 16 L, se monitoreó tomando muestras por triplicado y analizadas en espectrofotómetro a 750 nm por día. Al escalar el cultivo a 16 L al octavo día se recolectó la biomasa para calcular los gramos por litro (cuadro 3) *chlorella* sp3 0.31±04a g/L y *Chlorella* sp1 0.34±10a g/L estadísticamente son similares comparado con *chlorella* sp2 0.20± 02ab g/L. La cepa seleccionada para el cultivo masivo fue la cepa de *chlorella* sp3, por la característica de contener 28.87 % de Ácido α -Linolénico C-18:3C que contiene ácidos de cadena larga óptima para la producción de biodiésel con respecto a las Chlorellas sp1 y sp2 que presentaron en 0% en el análisis cromatográfico de perfil de ácidos grasos. El cultivo masivo de *chlorella* sp3 escalado a 420 L se recolectó 130 g biomasa, de los cuales se extrajo 5 ml de aceite para la producción de biodiésel.

5.6 Análisis bromatológicos

A continuación, se muestran los resultados bromatológicos obtenidos de las cepas (Cuadro 4). Los resultados muestran que las cepas *Chlorella* sp1, *Chlorella* sp2 y *Chlorella* sp3 estadísticamente no tienen diferencias significativas en las medias de proteínas y lípidos, en cambio en carbohidratos *Chlorella* sp3 presentó un mayor porcentaje 22.96±0.68a % en peso seco, respecto a *chlorella* sp1 15.09±0.93b % y *chlorella* sp2 16.49±1.16b %. La cepa control *Chlorella vulgaris* estadísticamente presentó un mayor porcentaje en proteínas 30.83±0.96a y carbohidratos

23.60±1.51a y en lípidos obtuvo el menor rendimiento 13.84±1.48b %, comparado con las Chlorellas sp1, sp2 y sp3 (18.76±0.50a %, 18.08±0.54a % y 19.0±0.08a %.

Las cuatro cepas en cenizas no presentan diferencias significativas, en cambio en en la columna de otros *chlorella* sp1 38.40±0.60a % y *chlorella* sp2 37.52±0.50a son iguales, en cambio existen diferencias en *chlorella* sp 3 31.83±0.40b % y *Chlorella Vulgaris* 26.46±1.06c % lo cual se presenta como fibra celular y otras impurezas no calcinadas.

Cuadro 4.Resultados bromatológicos de las cepas.

Resultados de biomasa base seca					
Cepa	%Proteínas	%Carbohidratos	%Lípidos	% Cenizas	%Otros
Csp1	23.92±1.04b	15.09±0.93b	18.76±0.50a	3.58±0.53a	38.40±0.60a
Csp2	23.56±0.57b	16.49±1.16b	18.08±0.54a	3.58±0.49a	37.52±0.50a
Csp3	22.79±0.22b	22.96±0.68a	19.0±0.08a	4.34±0.58a	31.83±0.40b
CV	30.83±0.96a	23.60±1.51a	13.84±1.48b	4.83±0.27a	26.46±1.06c

Nomenclatura. ± Desviación estándar. (a-c) letras diferentes significan que existen diferencias significativas entre las medias.

5.7 Perfil de ácidos grasos

En el cuadro 5 se presentan los resultados del análisis cromatográfico de los lípidos extraídos en las cepas de estudio, resaltando la presencia de ácido α –linolénico en *Chlorella vulgaris* y *Chlorella* sp3, por la característica de contener 27.24 % y 28.87 % de ácido α -linolénico C-18:3C óptimo para la producción de biodiésel. También mencionar el ácido linoleíco C-18:2C en *Chlorella* sp1 32.59% y *Chlorella* sp2 25.23%. Así con mismo, la presencia de ácido esteárico C-18 y palmítico C-16 fue importante en todas las muestras. Los cuales los ácidos grasos de 14 - 24 carbonos son propicios para la transesterificación de ácidos grasos.

Cuadro 5. Perfil de ácidos grasos para las diferentes cepas de algas.

ÁCIDOS GRASOS	CEPAS			
	C.sp1	C.sp2	C.sp3	CV
Ácido Caproico C-6	0.05	0.06	0.03	0.02
Ácido Cáprilico C-8	0.00	0.00	0.19	0.00
Ácido cáprico C-10	0.39	0.47	0.19	0.75
Ácido.láurico C-12	0.91	0.80	0.86	0.88
Ácido pentadecanoico C-15	0.00	0.00	0.00	1.96
Ácido Pentadecenoico C-15:1	10.40	12.38	8.83	5.26
Ácido Palmítico C-16	17.53	20.99	15.40	15.17
Ácido Palmitoleico C-16:1	0.00	0.00	0.00	6.89
Ácido Margárico C-17	11.65	10.81	3.81	1.36
Ácido Heptadecenoico C-17:1	0.22	0.23	3.65	0.41
Ácido Esteárico C-18	20.11	24.09	15.68	12.76
Ácido oleico C-18:1C	6.02	4.61	5.33	6.50
Ácido linoleico C-18:2C	32.59	25.23	17.15	12.26
Ácido α -Linolénico C-18:3C	0.00	0.09	28.87	27.24
Ácido γ -Linolénico C-18:3C	0.00	0.00	0.00	8.27

5.8 Cultivo masivo

En la figura 12 se muestra el proceso de escalamiento del cultivo de *Chlorella* sp3 (a-c) y fotografía de la muestra liofilizada (11-d) bajo las mismas condiciones de trabajo mencionadas anteriormente en la metodología. El cultivo masivo de *chlorella* sp3 escalado a 420 L y cosechado a 5500 rpm al octavo día, colectando 130 g de biomasa celular, para después deshidratar en liofilizador y posteriormente la extracción de lípidos en Soxhlet, obteniendo 5ml de aceite para la producción de biodiésel.

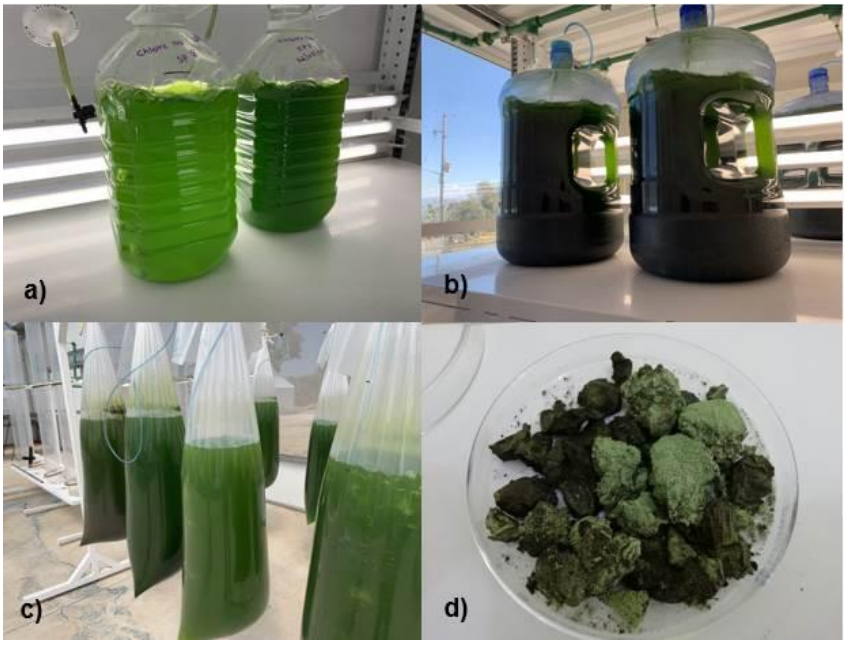


Figura 12.Cultivo masivo de Chlorella sp3 (a-c) y biomasa liofilizada (d).

5.9 Biodiésel de lípidos de microalgas

Del aceite extraído de *Chlorella* sp3 se realizó la transesterificación resultando dos sub productos: metil-esteres y glicerina, se colocó la reacción en embudo de decantanción para separar las fases por diferencia de densidades, la prueba fue comparada con la obtención de biodiésel a partir de aceite vegetal de girasol (figura 13) se puede observar que la reacción del aceite de microalgas presenta impurezas por lo que es difícil observar la glicerina y el biodiésel. El resultado indica que por cada 1kg de biomasa de *chlorella* sp3 se produce 34.46 ml, cabe mencionar no se utilizó algún método de destrucción celular previa a la extracción de lípidos en Soxhlet, lo cual mejoraría la extracción de lípidos significativa mente.

Figura 13.Biodiésel de microalgas.

V. DISCUSIÓN

A nivel mundial se estima que la biodiversidad de microalgas puede alcanzar las 350,000 especies (Brodie y Zuccarello, 2007).Se identificaron un total de 22 especies de microalgas para la generación de información del Río Tuxpan, para decidir con cuales cepas se continuaría el proyecto; en primera instancia se descartó a las microalgas no identificadas tomando en consideración que es muy importante primero conocer a que genero pertenecen en orden de poder comparar con literatura los resultados que se van generando en el presente proyecto. Posteriormente, se descartó trabajar con las diatomeas (filo Ochrophyta), ya que este tipo de microalgas no son aptas para producción y extracción de lípidos debido a su estructura celular que poseen. Finalmente, entre las microalgas restantes se optó por trabajar con las clórelas del filo Chlorophyta denominadas *Chlorella* sp1, *Chlorella* sp2 y *Chlorella* sp3 para su estudio, por la gran capacidad de desarrollarse en diversos medios de cultivo, adaptación en diversos sistemas ambientales y síntesis de lípidos, lo cual se seleccionó para la producción de biodiésel (Teran y Posada, 2019). La elección de *chlorella* sp3 para el cultivo masivo se debió por la característica de contener 28.87 % de Ácido α -Linolénico C-18:3C perfecto para la producción de biodiésel con respecto a las Chlorellas sp1 y sp2 que presentaron en 0% en el análisis cromatográfico de perfil de ácidos grasos.

Otros autores, han abordado estudios relacionados al del presente proyecto con resultados similares. Por ejemplo, Eladel *et al.,* (2018), realizaron un muestreo en una planta de tratamiento de aguas residuales en Benha, Egipto, de la cual pudieron aislar *Chlorella sorokiniana*, que evaluaron en la producción de biodiesel; el caso de Ferro *et al.,* (2018) quienes colectaron *Chlorellas* sp. en plantas de tratamiento de aguas en Suecia. En Jhelum, Pakistan Abeera *et al.,* (2017) aislaron *Scenedesmus sp* y *Chlorella sp* para su evaluación. En Giza, Egipto, Mahmoud *et al*., (2015) colectaron en un canal y aislaron microalgas del género *Chlorella sp* y *Chlorella sorokiniana.* También es el caso de Abdelaziz *et al*., (2014), quienes aislaron en su mayoría microalgas del filo *Chlorophyta* de una laguna de agua dulce en Montreal, Canada. Tenemos el caso de Magaña-López (2014), que aislaron del Río

Coatzacoalcos, Veracruz a *Scenedesmus Obliquus* para su evaluación bromatológica. Los autores Smith-Bädorf *et al.,* (2013) aislaron *Chlorella emersonii* de los famosos baños de aguas termales en Roma para su evaluación. Los autores Guo *et al* (2012) colectaron en Shenzhen, China para aislar microalgas *Chlorellas* sp.

Como se puede observar en las referencias de literatura, resulta muy común encontrar y aislar microalgas del género *Chlorella* a partir de diferentes tipos de efluentes y cuerpos de agua. Por ello, la importancia de la selección de una cepa con fines bioenergéticos radica en la necesidad de encontrar una alta productividad de biomasa, un alto contenido de lípidos y las características de proceso de producción asociadas como la facilidad de manipulación, los bajos requerimientos nutricionales y facilidad de cosecha (Larkum *et al*., 2012). Por estas razones, desde hace algunos años se ha incrementado el número de estudios relacionados al aislamiento y selección de microalgas para producir biocombustibles (Vandamme *et al*., 2013). Por lo anterior, resalta que el presente trabajo de intervención es el primer estudio con fines bioenergéticos a partir del aislamiento de microalgas que se genera en la región, y que permitirá continuar estudios enfocados a la determinación de condiciones específicas de crecimiento para las microalgas identificadas. Cabe mencionar, que de igual manera se pueden continuar estudios que aborden temas ecológicos de las poblaciones microalgales, estudios metabólicos, genéticos y/o de aprovechamiento en otras ramas industriales (pigmentos, vitaminas, etc).

En cuanto a la biomasa obtenida en los cultivos, se obtuvo un rendimiento máximo de biomasa de 0.34±10 g/L y un rendimiento lipídico de 18.76±0.50% para *Chlorella sp*1 y para *Chlorella sp3* 0.31±04 g/L y 19.0±0.08 % respetivamente, en medio bold basal BBM y condiciones de aireación constante con un foto periodo 12:12 en un tiempo de 8 días de cultivo. En literatura se ha reportado que *Chlorella minutissima* produjo una biomasa de 0.73g/L y los rendimientos lipídicos 19 % con medio BBM (Chandra *et al*., 2018). El trabajo de Sharma *et al*., (2016) evaluó la concentración de biomasa de 5 especies de *Chlorella. Chlorella vulgaris* en medio BG-11 obtuvo

1.64 g/L, seguido de BBM 1.58 g/L, medio Fog's 1.33 g/L, y medio M4N 1.30 g/L. Las concentraciones máximas para *Chlorella minutissima* fue de 1.52 g/L y para *Chlorella sp1* de 1.39 g/L en medio BG-11 y las especies de *Chlorella Pyrenoidosa* y *Chlorella sp2* 1.69 y 1.48 g/L respectivamente. Cabe mencionar que en el medio dónde se observó una mayor productividad lipídica de las 5 especies fue en el medio BBM. El contenido lipídico más alto fue de 15.87% para *Chlorella sp*1. Los autores Dehaghani y Pirouzfar (2017) publicaron que *Chlorella sp*. Obtuvo una biomasa y un rendimiento de contenido lipídico de 0.2-0.5 g/L y 26.2%, respectivamente. Los resultados son muy similares a los obtenidos en el presente trabajo de intervención Cepas reportadas por su alta capacidad de producción de lípidos intracelulares son *Neochloris oleoabundans* (37%), *Chlorella protothecoides* (30.6%), *Botryococcus braunii* (30.3%) y *Nannochloropsis salina* (22%) (Ryu *et al*., 2014; Yeesang y Cheirlsilp, 2014; Miranda *et al*., 2015; Abu *et al*., 2017).

El obtener altas densidades celulares en un cultivo mejora la viabilidad económica del proceso, ya que compensa los gastos en cosecha y extracción de los lípidos (Hannon *et al*., 2010). En el presente trabajo, los cultivos se llevaron a cabo de forma simple, sin tomar en cuenta los efectos negativos del auto-sombreado que se genera cuando se incrementa el número de células en el reactor y las limitaciones de la transferencia de masa relacionada a la solubilidad del CO_2 (Yuvrai, 2017); por lo que se abre la puerta a futuras investigaciones con estas temáticas y con la finalidad de incrementar la producción de biomasa por unidad de volumen. Por otro lado, para considerar a una microalga como oleaginosa, está debe ser capaz de acumular más del 20% de su peso seco en forma de lípidos (Yoshida *et al*., 2012). Muchas de las microalgas estudiadas acumulan lípidos en forma de glicerolípidos no polares tales como el triacilglicerol (Kim *et al*., 2016) y los ácidos grasos poliinsaturados no son deseables para la producción de biodiésel debido a los problemas adyacentes de oxidación (Lanjekar y Deshmukh, 2016). En el presente trabajo se reportó 18-19% de lípidos, valor muy cercano para considerar a las cepas como oleaginosas y su composición lipídica rica en compuestos saturados y de baja insaturación. El perfil de ácidos grasos determinado en las cepas *Chlorella sp1, Chlorella sp2, Chlorella sp3,* fue representado principalmente por el ácido

pentadecenoico (C15:1), ácido palmítico (C16:0), ácido margárico (C17:0), ácido heptadecenoico (C17:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido α-linolénico (C18:3). El perfil de ácidos grasos de *Chlorella sp* reportado por Dehaghani y Pirouzfar (2017) arrojó la presencia principal del ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido α -linolénico (C18:3).

El rendimiento de *Chlorella* sp 3, generado en esta investigación (34.46 ml de biodiesel) contrasta con los resultados de Palacios (2013) quién utilizando C*hlorella vulgaris* obtuvo 27 ml de biodiesel y Teran y Posada (2019) reportaron una producción de 108 ml de biodiesel usando *Chlorella* sp. Las diferencias se explican por el método usado para la liberación de lípidos, que consiste en choques inducidos con ondas de alta frecuencia para destruir la membrana celular o en la destrucción mecánica. Por esto, es muy recomendable en el futuro, hacer pruebas con diferentes técnicas para potenciar la extracción de lípidos.

Este proyecto tuvo como finalidad sentar las bases del conocimiento en materia de biotecnología de microalgas del Río Tuxpan, zona norte del estado de Veracruz. La continuación de esta línea de investigación abre la puerta para futuras investigaciones en la producción de biodiésel de microalgas y diversas aplicaciones biotecnológicas como: aprovechamiento de proteínas, carbohidratos, aceites esenciales y productos de alto valor que a su vez abren la posibilidad de desarrollar una biorrefinería en el futuro, lo cual sería benefactor para la ciencia y tecnología para el país. Como sabemos actualmente en el mundo se vive los estragos del cambio climático por lo que se busca un desarrollo sostenible, en el mundo existen empresas que se dedican a las aplicaciones biotecnológicas de microalgas, en México existen algunas plantas, por lo que estado de Veracruz puede dar un paso hacia esa meta. La ventaja de las microalgas es que pueden ser aprovechadas para captación de CO_2 atmosférico y producción de combustibles más eficientes y amigables con el medio ambiente.

El camino es largo para la construcción de una biorrefinería, se debe de desarrollar tecnologías más eficientes para que el producto sea viable y compita con el diésel de petróleo, como: en la extracción de lípidos falta método eficaz para la extracción del aceite sin tener pérdidas considerables. También se debe de desarrollar un método eficaz en la cosecha de microalgas para evitar pérdidas y aprovechar al máximo la biomasa y así como mejorar la producción a gran escala de algas y la producción eficiente de biodiésel. En este trabajo de evaluaron cepas de Chlorella, con esto quiero decir que hay un mundo de trabajo para futuros investigadores que se aventuren en la investigación de microalgas del Río Tuxpan.

VII. CONCLUSIONES

- Como primer objetivo se logró identificar y aislar un total de 22 especies de microalgas de 3 filos: Chlorophyta (10 especies), Ochrophyta (11) y Euglenozoa (1). De estas microalgas se seleccionaron tres especies del filo Chlorophyta denominadas: *Chlorella* sp1, *Chlorella* sp2 y *Chlorella* sp3 para su evaluación energética.
- El análisis bromatológico arrojó que *chlorella* sp3 en peso secó posee un contenido lipídico del 19% con presencia de 28.87 % de ácido α -Linolénico C-18:3C; en cambio Chlorellas sp1 y sp2 contienen estadísticamente el mismo porcentaje de lípidos pero no presentaron ácido α –Linolénico, el cual es deseable para la producción de biodiésel; por lo tanto *Chlorella* sp3 fue seleccionada para su producción masiva.
- El cultivo de *Chlorella* sp3 se realizó a un volumen de 420 L en un tiempo de ocho días hasta alcanzar su fase exponencial, con una productividad de 0.31 g/L de biomasa, dando como resultado 130 g de biomasa total para la extracción de lípidos.
- El rendimiento de lípidos por cada kg de biomasa de *Chlorella* sp3 fue de 38.46 ml de aceite útiles para la producción de biodiésel.
- Finalmente se puede concluir que del análisis bromatológico efectuado, las cepas de Chlorella spp contiene una productividad significativa de lípidos destacando *Chlorella* sp3 por el perfil de ácidos grasos que posee; por tanto se propone a esta cepa con potencial bioenergético para proyectos futuros. De igual manera se abre la puerta en la búsqueda de nuevos conocimientos para la optimización de los procesos de generación de biodiésel enfocando los esfuerzos a elevar la productividad de biomasa, mejorar el método de extracción de lípidos y sobre la obtención de biodiésel de calidad comercial con la finalidad de mejorar la viabilidad técnico-económica de esta tecnología.

V.III APLICACIÓN PRÁCTICA

La aplicación práctica es beneficiar a la sociedad y al medio ambiente, proponiendo el aprovechamiento de las diferentes aplicaciones biotecnológicas de las microalgas, generando fuentes de empleo para las personas con la inversión de un proyecto de microalgas. La generación de información generada de las 22 especies de microalgas identificadas da camino a un campo en esta área, revisando literatura las microalgas son aprovechadas para diversas aplicaciones como: suplemento alimenticio, alimento para animales, metabolitos de interés comercial en la industria cosmética, farmacéutica y producción de biocombustibles (bioetanól y biodiésel) (Palacios, 2013). Las cepas de Chlorellas estudiadas presentaron valores de alto valor en proteína y lípidos, por lo que su utilidad es de vital importancia. Las cepas de chlorella han sido reportadas en diferentes artículos para el tratamiento de aguas residuales eliminando, fósforo, nitrógeno, metales pesados y demanda química de oxigeno (García, 2017; Teran y Posada, 2019) por que se sugiere implementar una planta de tratamiento de aguas residuales en el cual la biomasa obtenida sea aprovechada para algún fin biotecnológico, cómo producción de lípidos para biodiésel y biofertilizantes.

Por lo anterior expuesto, el presente proyecto de intervención inicio una línea de generación de conocimiento en la región norte de Veracruz relacionada al aislamiento e identificación de microalgas presentes en el Río Tuxpan así como una evaluación del potencial bio-energético que poseen, con la finalidad de generar una plataforma de conocimientos que a mediano y largo plazo coadyuven al desarrollo de plantas de producción de biodiésel en nuestro país a partir del cultivo de microalgas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Rezq., Al-Hooti., Jacob, D., Al-Shamali., Ahmed, A. y Ahmed, N. 2010. Induction and extraction of β-carotene from the locally isolated *Dunaliella salina.* Journal of Algal Biomass Utilization. 1(4): 58-83

Abu, A., Hajar, R. y Riefler, B. 2017. Cultivation of the microalga *Neochloris oleoabundans* for biofuels production and other industrial applications (a review). Applied Biochemical Microbiology. 53 (6) 640–653.

Abdelaziz, M., Leite, B., Belhaj, A. y Hallenbeck, C. 2014. Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production. Bioresource Technology.1 (3): 13-21

Abeera. A., Khoja, H., Nawar., Qayyum, M. y Ali, E. 2017. Wastewater treatment by local microalgae strains for CO2 sequestration and biofuel production. Applied Water Science.1 (7): 4151–4158

Agarwal, A. 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. Progress in Energy and Combustion Science. 33(3): 233-271.

Al-Zuhair, S. 2007. Production of biodiesel: possibilities and challenges. Biofuels Bioproducts and Biorefining. 1: 57-66.

Arrendondo, V. y Voltolina, D. 2007. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La paz, México. 3 (3): 17-25.

Arroussi, H., Benhima, R., Mernissi, N., Bouhfid., Tilsaghani, C., Bennis, R. y Wahby, I. 2017. Screening of marine microalgae strains from Moroccan coasts for biodiesel production. Renewable Energy. 113(1): 1515-1522.

Atabani, E., Silitonga, S., Badruddin, A., Mahlia, I., Masjuki, H. y Mekhilef, S. 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 16(4) 2070-2093.

Band-Schmidt, C. 2007. Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México. 3(1): 1-16.

Bersanti, L. y Gualtieri, P. 2014. ALGAE, Anatomy, Biochesmistry and Biotechnology. Istituto di Biofisica. Pisa Italy. 344pp.

Brodie, G. y Zuccarello, J. 2007. Systematics of the Species-rich Algae: Red Algal Classification. Phylogeny and Speciation, CRC Press. London, pp. 323–336.

Cardeño, F., Ríos L. y Franco A. 2010. Producción de biodiesel de aceite crudo de palma mediante catálisis heterogénea. Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia. 51(1): 81-86.

Castro, M. y Gallego T. 2009. La educación energética. The Education Energetics. 4(1): 323-327.

Castillo, S., Torres-Badajoz, G., Núñez-Colín, A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, H. y Rodríguez-Núñez, R. 2017. Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. Hidrobiológica. 27 (3): 337-352.

Chandra., Amit. y Ghosh, K. 2018. Effects of various abiotic factors on biomass growth and lipid yield of *Chlorella minutissima* for sustainable biodiesel production. Environmental Science and Pollution Research. 7(9): 67- 78

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology advances. 25 (3):294-306.

Cruz. O. 2016. PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Dehaghani, S. y Pirouzfar, V. 2017. Investigation on the Effect of Microalgae *Chlorella* sp. and Spirulina on Biodiesel Production. Petroleum Chemistry. 58(8): 702-708.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. “Colorimetric method for determination of sugars and related substances.” Analytical Chemistry. 28 (3): 350-356.

Eladel, H., Abomohra, E., Battah, M., Mohmmed, S., Radwan, A., y Abdelrahim, H. 2018. Evaluation of *Chlorella sorokiniana* isolated from local municipal wastewater for dual application in nutrient removal and biodiesel production. Bioprocess and Biosystems Engineering. 4(7): 34-45

Faried, M., Samer, M., Abdelsalam, E., Yousef, R., Attia y. Ali, A. 2017. Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 79(1): 893-913.

Ferro, F., Gentili, G. y Funk, C. 2018. Isolation and characterization of microalgal strains for biomass production and wastewater reclamation in Northern Sweden. Algal Research. 32(4): 44-53.

Fernández-Linares, C. Montiel-Montoya, J. Millán-Oropeza, A. y Badillo-Corona, A. PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS .2012. Ra Ximhai. 8(3): 101-115.

Folch, J., Less, M. y Stanley, S. 1956. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. The Journal of Biological Chemistry. 226(1): 497-509.

Garduño, R. E. 2014. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE PRECONCETRACIÓN DE METALES DISUELTOS: Cu, Ni y Pb Y SU APLICACACIÓN EN LA LAGUNA DE TAMPAMACHO Y UNA PORCIÓN ESTUARINA DEL RÍO TUXPAN, VER.MÉXICO. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

García, H. 2017. Efecto de las condiciones de cultivo en la composición bioquímica y producción de biomasa de un consorcio de microalgas cultivadas en agua residual y lixiviado. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Garibay-Hernández., Vasquez-Duhalt., Serrano-Carreón. y Martínez, A. 2013. Nitrogen Limitation in *Neochloris oleoabundans*: A Reassessment of Its Effect on Cell Growth and Biochemical Composition. Applied Biochemistry and Biotechnology. 171 (7): 1775–1791.

Garibay-Hernández., Vázquez-Duhalt., Sánchez S., Leobardo, y Martínez, J. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. Artículos. 13(3): 38-61

Greene, C., Huntley, E., Archibald, I., L. Gerber, N., Sills, L., Granados, J., Tester, W., Beal, M., Walsh, J., Bidigare, R., Brown, L., Cochlan, P., Johnson, I., Lei, G., Machesky, C., Redalje, G., Richardson, F., Kiron, V. y Corless, V. 2016. Marine microalgae: Climate, energy, and food security from the sea. Oceanography 29(4):10–15.

Guo, H., Daroch, M., Liu, L., Qiu, G., Geng, S. y Wang. G. 2012. Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta. Bioresource Technology. 127(1):422-428.

Hannon, M. Gimpel, J. Tran, M. Rasala, B. y Mayfield, S. 2010. Biofuels from algae: challenges and potential, Biofuels 1 (5) (2010) 763–784.

Islas, J., Manzini, F. y Mansera, O. 2007. A prospective Study of Bioenergy Use in Mexico. Energy. 32(1): 2306-2320.

Kim, H. 2016. Microfluidic high-throughput selection of microalgal strains with superior photosynthetic productivity using competitive phototaxis. Science Reports. 6(1): 21155.

Lam, K. y Lee, T. 2011. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. Biotechnology Advances. 30(1): 673-69

Lanjekar, D. y Deshmukh. 2016. A review of the effect of the composition of biodiesel on NOx emission, oxidative stability and cold flow properties, Renewable. Sustainable Energy. 54(1): 1401–1411.

Larkum, A., Ross, I., Kruse, O. y Hankamer, B. 2012. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. Trends Biotechnology. 30 (4): 198–205.

Li, X., Xu, H. y Wu, Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. Biotechnology and Bioengineering. 98(4): 764-771.

Loera-Quezada, M. y Olguín, J. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel:retos y oportunidades. Latinoam Biotecnology Amb Algal 1(1):91-116.

Lowry, O., Nira J., Rosebrough, A., Lewis, F. y Randall, J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, 193(1): 265-275.

Magaña-Lopez, C. 2014. Crecimiento poblacional y contenido de proteínas y lípidos de cuatro microalgas en diferentes tipos de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad nacional autónoma de México. México.

Mahmoud, A., Farahat, A., Abdel, K., Fatthallah, A. y Salah, A. 2015. Evaluation of the potential for some isolated microalgae to produce biodiesel. Egyptian Journal of Petroleum. 24(1): 97-101.

Mata, M., Martins, A. y Caetano, S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(1): 217-232.

Mardhiah, H., Masjuki., C. Lim., H. y Lee, H. 2017. A review on latest developments and future prospects of heterogeneous catalyst in biodiesel production from non-edible oils. 67(1): 1225-1236.

Meng, X., Yang X., Xu X., Zhang L., Nie, Q. y Xian., M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy. 34(1): 1-5.

Miao, X. y Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology. 97(6): 841-846.

Miranda, C., Pinto, R., Lima, C., Viegas, S., Costa, y Azevedo, O. 2015. Microalgae lipid and biodiesel production: a brazilian challenge. American journal of plant sciences. 6 (15): 2522–2533.

Naik M., Meher L.C., Naik S.N. y Das L.M (2008). Production of biodiesel from high free fatty acid karanja (*pongamia pinnata*) oil. Biomass and Bioenergy. 32(4): 354-357

Nava, B. 2014. BALANCE ENERGÉTICO DE PRODUCCÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS SEPARADAS DE MEDIO ACUOSO. Tesis de maestria. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. México.

Navarrete, A. S. 2002. ESTUDIO HIDROLÓGICO Y DE PROTECCIÓN CIVIL DE LA CUENCA BAJA DEL RÍO TUXPAN. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Nielsen, S. 2003. Food Analysis Laboratory Manual. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.

NMX-F-066-S-1978. DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN ALIMENTOS. NORMAS MEXICANAS.

Organización Mundial de la Salud. 2015. [Actualizado 1 de noviembre del 2017]. (http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/reducing-climate-pollutants/es/)

Palacios, G. I. 2013. Producción de biodiésel a partir de microalgas. Análisis del ciclo de vida y factibilidad económica. Tesis de maestría. Centro de investigación de materiales avanzados, S. C. Chihuahua, México.

Pérez, V. y Ayala, I. 2017. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CURVA DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *Scenedesmus obliquus* CON FINES BIOTECNOLÓGICOS. Jóvenes en la Ciencia. 3(1): 144-148.

Posten, C. y Schaub, G. 2009. Microalgae and terretrial biomass as source for fuels. A process view. Journal Biotechnology. 142(1):64-69.

Ramírez, M., Vela, C. y Rincon, J. 2012. Biodiesel, un combustible renovable. Investigación y ciencia. 20(55): 62-70.

Ryu, B., Kim, J., Farooq, W., Han, I., Yang, W. y Kim, W. 2014. Algal–bacterial process for the simultaneous detoxification of thiocyanate-containing wastewater and maximized lipid production under photoautotrophic/photoheterotrophic conditions, Bioresour. Technology. 162(1) 70–79.

Rodolfi, L., Zittelli, C., Bassi N., Padovani G., Biondi, N., Bonini G. y Tredici. R. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology bioengineering. 102(1): 100-112

Ruiz, C. Gómez C. y Gutiérrez, C. 2014. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE BIODIESEL DE MICROALGAS OLEAGINOSAS AISLADAS DEL RÍO ITAYA, LORETO, PERÚ. Ecología Aplicada. 13 (2): 169-175.

Sacristan, A, M. 2013. PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS EMPLEANDO DIFERENTES CALIDADES DE AGUA. Tesis de maestria. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. México.

Schenk, M., Thomas-Hall., Stephens, E., Marx, C., Mussgnug, H., Posten, C., Kruse, O. y Hankamer, B. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. Bioenergy Research. 1(1): 20-43

Smith-Bärdorf, D., Chuk, J., Mokebo, R., MacDonald, H., Davison, G. y Scott, J. 2013. Bioprospecting the thermal waters of the Roman baths: isolation of oleaginous species and analysis of the FAME profile for biodiesel production. AMB Express. 3(9).

Sharma, K., Sahoo, K., Singhal, S. y Patel, A. 2016. Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. Biotechnology. 6:116

Tale, M., Ghosh, S., Kapadnis, B. y Kale S. 2014. Insolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. Bioresource Technology. 161(1): 328-335.

Teran, A. y Posada, E. 2019. “OBTENCIÓN DE BIODIESEL DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL

CULTIVO DE LA MICROALGA CHLORELLA SP DE ORIGEN MARINO.“ Tesis de licenciatura. Universidad de Guayaquil. Ecuador.

Vandamme, D. Foubert, I. y Muylaert, K. 2013. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production, Trends Biotechnology. 31 (4) (2013) 233–239.

Vyas, P., Verma, L. y Subrahmanyam N. 2010. A review on fame production processes. Fuel. 89(1): 1-9

Wijffels, H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. 2008. Cell Press. 26 (1): 26-31

Yoshida, M. Tanabe, Y. Yonezawa, N. 2012. Watanabe, Energy innovation potential of oleaginous microalgae. Biofuels 3 (6):761–781.

Yeesang, C.y Cheirsilp, B. 2014.Low-cost production of green microalga *botryococcus braunii* biomass with high lipid content through mixotrophic and photoautotrophic cultivation, Appl. Biochemical. Biotechnology. 174 (1):116–129.

Yuvraj, P. y Padmanabhan, L. 2017. Technical insight on the requirements for CO2-saturated growth of microalgae in photobioreactors. Biotechnology. 7 (2): 119.

Yu, X., Zhao, P., He, C., Li, J., Tang, X., Zhou, J. y Huang Z. 2012. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. Bioresource Technology, 121(1): 256- 262.

X. ANEXOS

Anexo A. Medios de cultivo preparados

Formulación para preparación de medio basal bold (BBM).

Medio Basal Bold			
Reactivo	**Nombre**	**Cantidad**	**Solución Stock**
N_3NO_3	Nitrato de Sodio	30 ml/L	10g/ 400 ml H2O
$CaCl_2.H_20$	Cloruro de Calcio Hidratado	10 ml/L	1/400 ml H2O
$MgSO_4.7H_20$	Sulfato de Magnesio Hepta Hidratado	10 ml/L	3g/400 ml H2O
K_2HPO_4	Fosfato de Potasio dibásico	10 ml/L	3g/400 ml H2O
NaCl	Cloruro de Sodio	10 ml/L	1g/400 ml H2O
KH_2PO_4	Fosfato de Potasio Monobásico	10 ml/L	7g/400 ml H2O
Solución de metales P-IV		10 ml/L	

Solución de metales P-IV		
Reactivo	Nombre	Cantidad
$Na_2EDTA.2H_2O$	Ácido Etilendiamina tetra acético de Sodio Dihidratado	0.75 g/L
$FeCl_3.6H_20$	Tricloruro de Hierro Hexa Hidratado	0.097 g/L
$MnCl_2.4H20$	Cloruro de Manganeso Tetra Hidratado	0.04 g/L
$ZnCl_2$	Cloruro de Zinc	0.005 g/L
$CoCl2.6H_2O$	Cloruro de Cobalto Hexa hidratado	0.002 g/L
$Na_2MoO4.2H_2O$	Molibdato de Sodio	0.004 mg/L

Formulación para preparación de medio BG11.

Medio BG11			
Reactivo	**Nombre**	**Cantidad**	**Solución Stock**
$NaNO_3$	Nitrato de Sodio	10 ml/L	30g/200 ml H20
K_2HPO_4	Fosfato de Potasio dibásico	10 ml/L	0.8 g/200 ml H20
$MgSO_4.7H_20$	Sulfato de Magnesio Hepta Hidratado	10 ml/L	1.5g/200 ml H20
$C6H8O7.H_20$	Ácido Crítico Hidratado	10 ml/L	0.72g /200 ml H20
$C_5H_{11}FeNO$-	Citrato de Amonio Férrico	10 ml/L	0.12g/200 ml H20
$Na_2EDTA.2H_2O$	Ácido Etilendiamina tetra acético de Sodio Dihidratado	10 ml/L	0.02g/200 ml H20

Na_2CO_3	Carbonato de sodio	10 ml/L	0.4g/200 ml H20
Solución de metales Traza BG11		1 ml/L	
Tiosulfato de Sodio Penta Hidratado		1 ml/ L	49.8 g/200 ml H20

Solución de metales P-IV		
Ractivo	**Nombre**	**Cantidad**
H3BO3	Ácido Trixobórico	2.86 g/L
$MgCl_2$.4H20	Cloruro de Magnesio Tetra Hidratado	1.86 g/L
ZnSo4.7H2O	Sulfato de Zinc Hepta Hidratado	0.22 g/L
NaMoO4.2H2O	Molibdato de Sodio Dihidratado	0.39 g/L
CuSO4.5H2O	Sulfato de Cobre Penta Hidratado	0.079 g/L
Co(NO3)2.6H2O	Nitrato de Cobalto Hex Hidratado	49.4 mg g/L

Formulación para preparación de medio F/2.

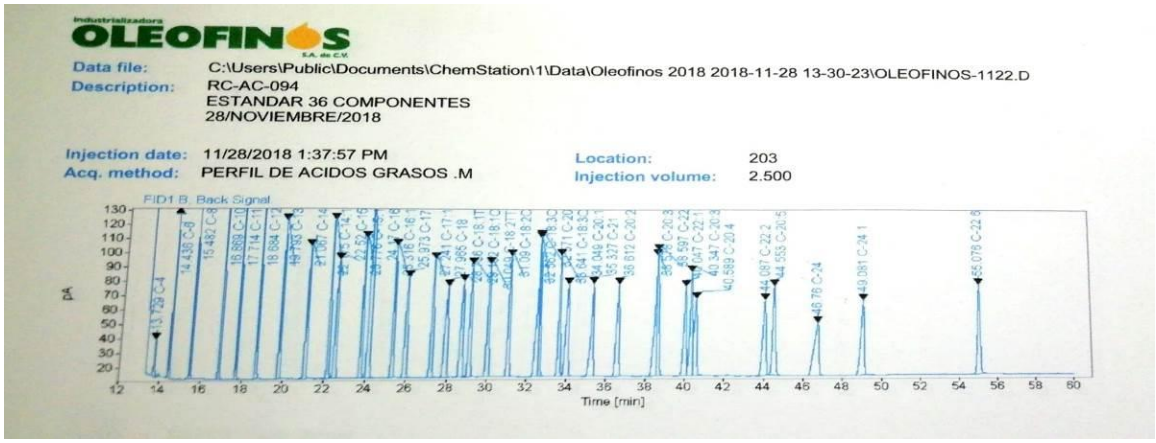
Medio F/2		
Componente	**Cantidad**	**Solución Stock**
NaNO3	1 ml	7.5 g/ 100 ml H20
NaH2PO4.H20	1ml	0.5 g/ 100 ml H20
Na2SiO3.9H20	1 ml	3 g/100 ml H2o
Solución Metales Traza		

Solución de Metales Traza F/2	
Componente	**Cantidad**
ZnSo4.7H2O	23mg/L
MnSO4.H20	152 mg/L
Na2MoO4.H2O	7.3 mg/L
COSO4.7H2O	14 mg/L
CuCl2.2H2O	6.8 mg/L
Fe(NH4)2(SO4)2.6H2O	4.6 g/L
Na2EDTA.2H2O	4.4 g/L

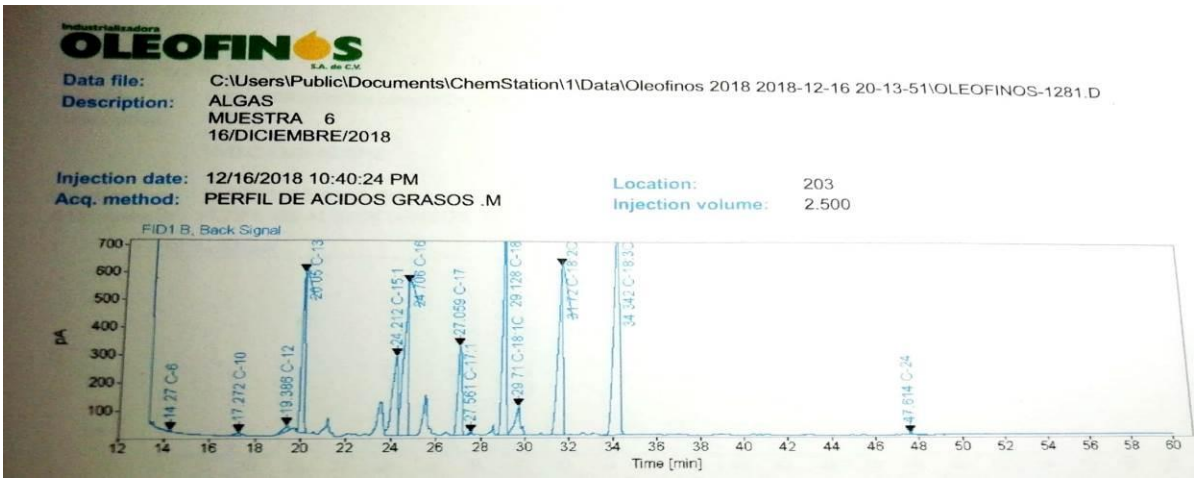
Anexo B. Cromatogramas de ácidos grasos de las muestras

Columna estándar de 36 componentes de ácidos grasos

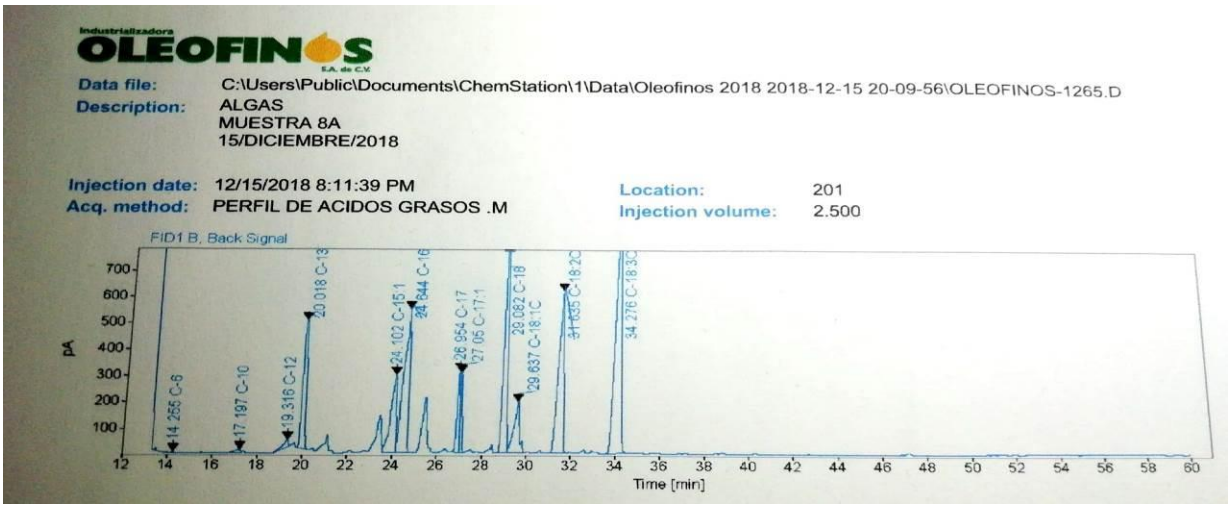
Cromatograma de muestra de *Chlorella sp*1



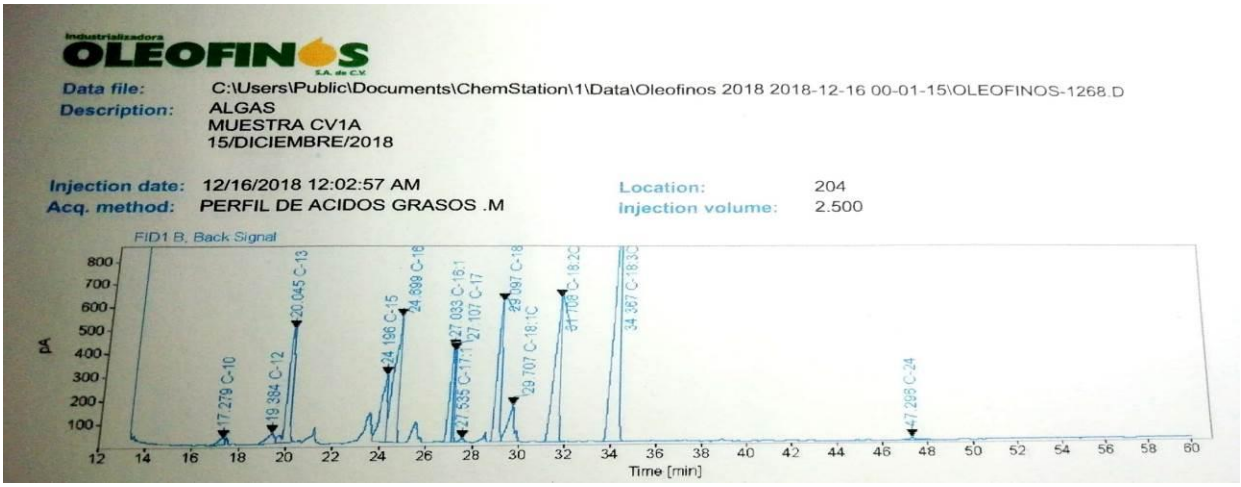
Cromatograma de muestra de Chlorella sp2



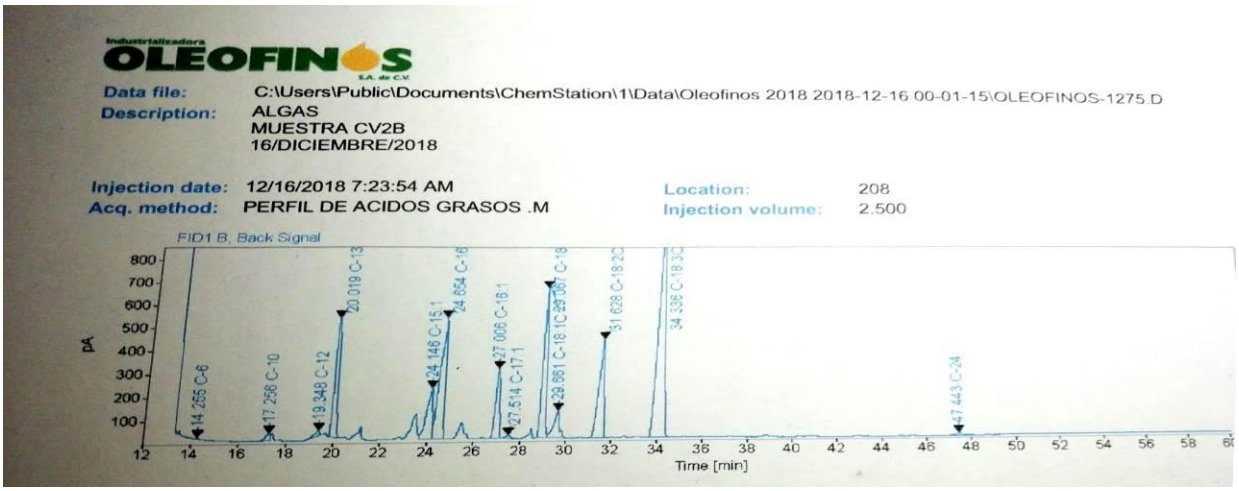
Cromatograma de muestra de Chlorella sp3.



Cromatograma de muestra de *Chlorella Vulgaris* 1.



Cromatograma de muestra *Chlorella Vulgaris* 2.



Anexo C. Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos de los puntos de muestreo del Río Tuxpan.

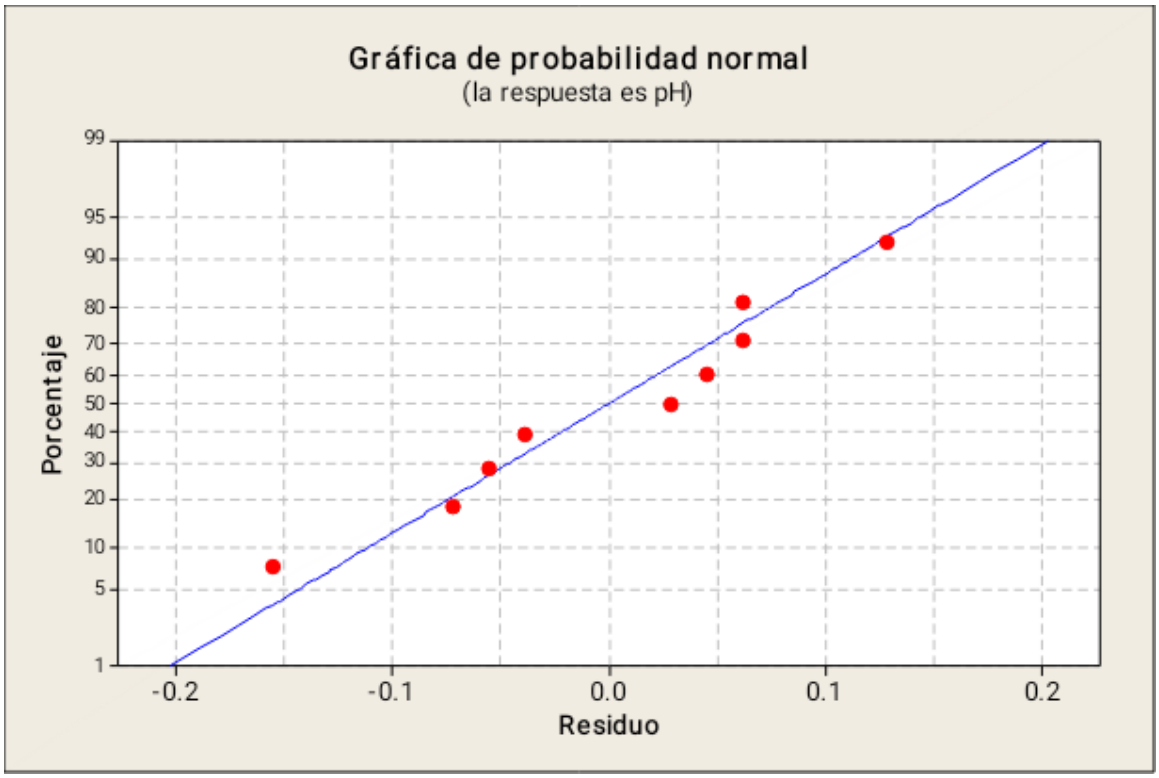
Anexo 1. Análisis de pH de los puntos de muestreo. *P*: pH de los puntos de muestreo.

Desviación estándar de p1 = 0.1

Desviación estándar de p2 = 0.1

Desviación estándar de p3 = 0.0577350

Análisis de regresión general: pH versus trat



Gráfica normal de residuos para pH.

ANOVA unidireccional: pH vs. trat

Fuente	GL	SC	CM	F	P
trat	2	0.01556	0.00778	1.00	0.422
Error	6	0.04667	0.00778		
Total	8	0.06222			

S = 0.08819 R-cuad. = 25.00% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	--+---------+---------+---------+-------
1	3	7.5000	0.1000	(----------*----------)
2	3	7.4000	0.1000	(----------*----------)
3	3	7.4667	0.0577	(----------*----------)

--+---------+---------+---------+-------

7.30 7.40 7.50 7.60

Desv.Est. agrupada = 0.0882

Agrupar información utilizando el método de Tukey

trat	N	Media	Agrupación
1	3	7.50000	A
3	3	7.46667	A
2	3	7.40000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95% Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de trat

Nivel de confianza individual = 97.80%

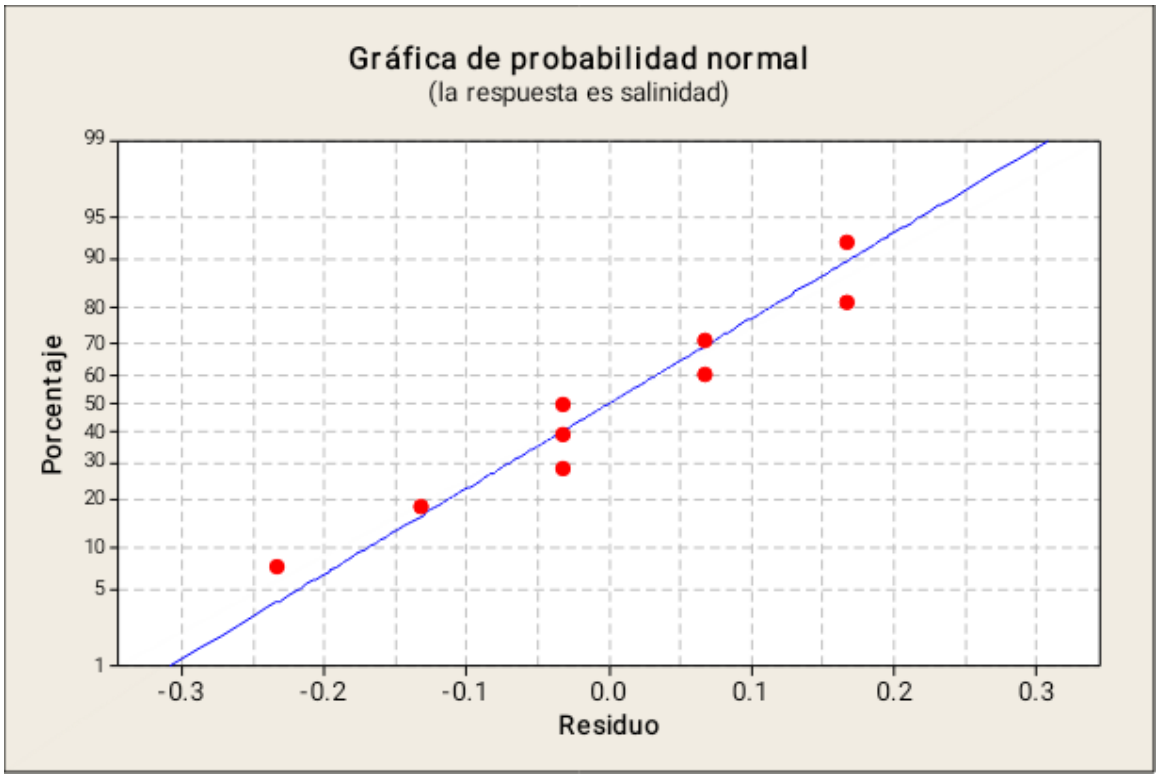
Anexo 2. Análisis de salinidad de los puntos de muestreo. *m*: salinidad de los puntos de muestreo

Desviación estándar de m1 = 0.115470

Desviación estándar de m2 = 0.152753

Desviación estándar de m3 = 0.152753

Análisis de regresión general: salinidad vs trat2



Gráfica normal de residuos para salinidad.

ANOVA unidireccional: salinidad vs. trat2

Fuente	GL	SC	CM	F	P
trat2	2	0.0200	0.0100	0.50	0.630
Error	6	0.1200	0.0200		
Total	8	0.1400			

S = 0.1414 R-cuad. = 14.29% R-cuad.(ajustado) = 0.00

ICs de 95% individuales para la media

basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	---------+---------+---------+---------+
1	3	3.1667	0.1155	(----------*----------)
2	3	3.0667	0.1528	(----------*----------)
3	3	3.1667	0.1528	(----------*----------)

---------+---------+---------+---------+

3.00 3.15 3.30 3.45

Desv.Est. agrupada = 0.1414

Agrupar información utilizando el método de Tukey

trat2	N	Media	Agrupación
3	3	3.1667	A
1	3	3.1667	A
2	3	3.0667	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95% Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de trat2

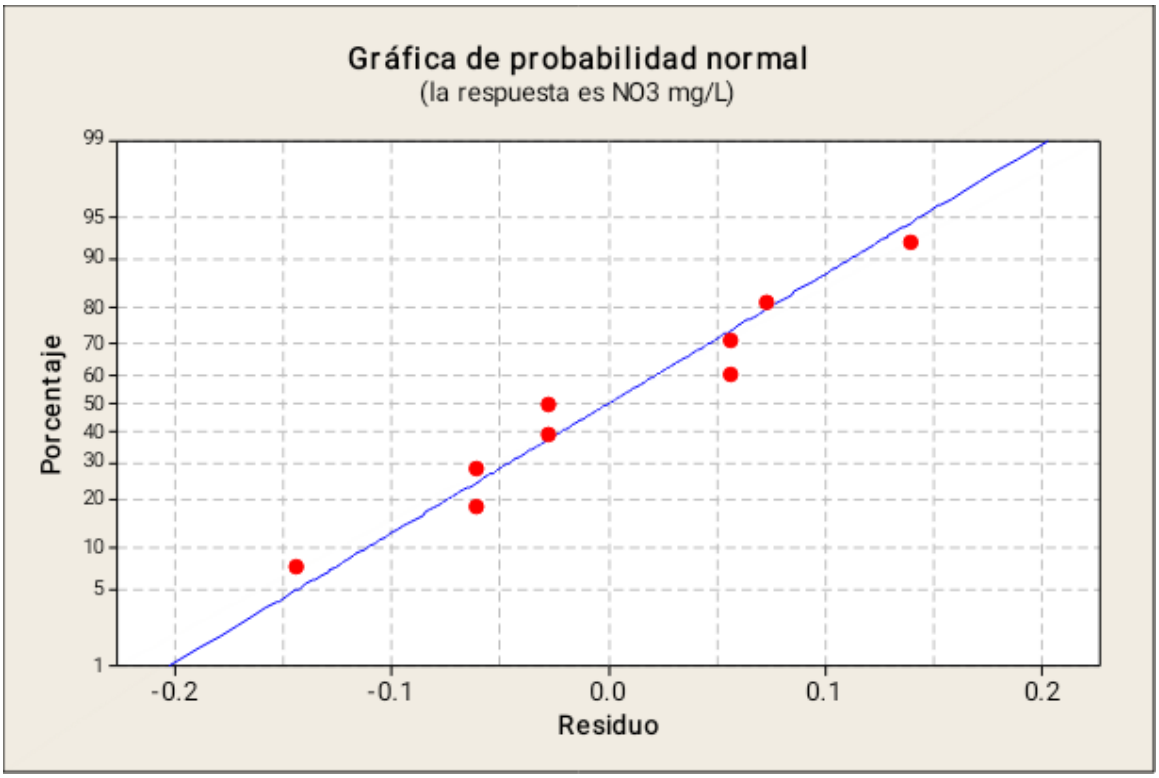
Nivel de confianza individual = 97.80%

Anexo 3. Análisis de NO_3 mg/L de los puntos de muestreo. *T*: NO_3 mg/L de los puntos de muestreo.

Desviación estándar de T1 = 0.0577350

Desviación estándar de T2 = 0.115470

Desviación estándar de T3 = 0.115470



Gráfica normal de residuos para NO3 mg/L

ANOVA unidireccional: NO3 mg/L vs. trat3

Fuente	GL	SC	CM	F	P
trat3	2	0.0022	0.0011	0.11	0.897
Error	6	0.0600	0.0100		
Total	8	0.0622			

S = 0.1 R-cuad. = 3.57% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

ICs de 95% individuales para la media

basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	--------+---------+---------+---------+-
1	3	0.2333	0.0577	(----------*----------)
2	3	0.2333	0.1155	(----------*----------)
3	3	0.2667	0.1155	(----------*----------)

--------+---------+---------+---------+-

0.160 0.240 0.320 0.400

Desv.Est. agrupada = 0.1000

Agrupar información utilizando el método de Tukey

trat3	N	Media	Agrupación
3	3	0.2667	A
2	3	0.2333	A
1	3	0.2333	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95% Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de trat3.

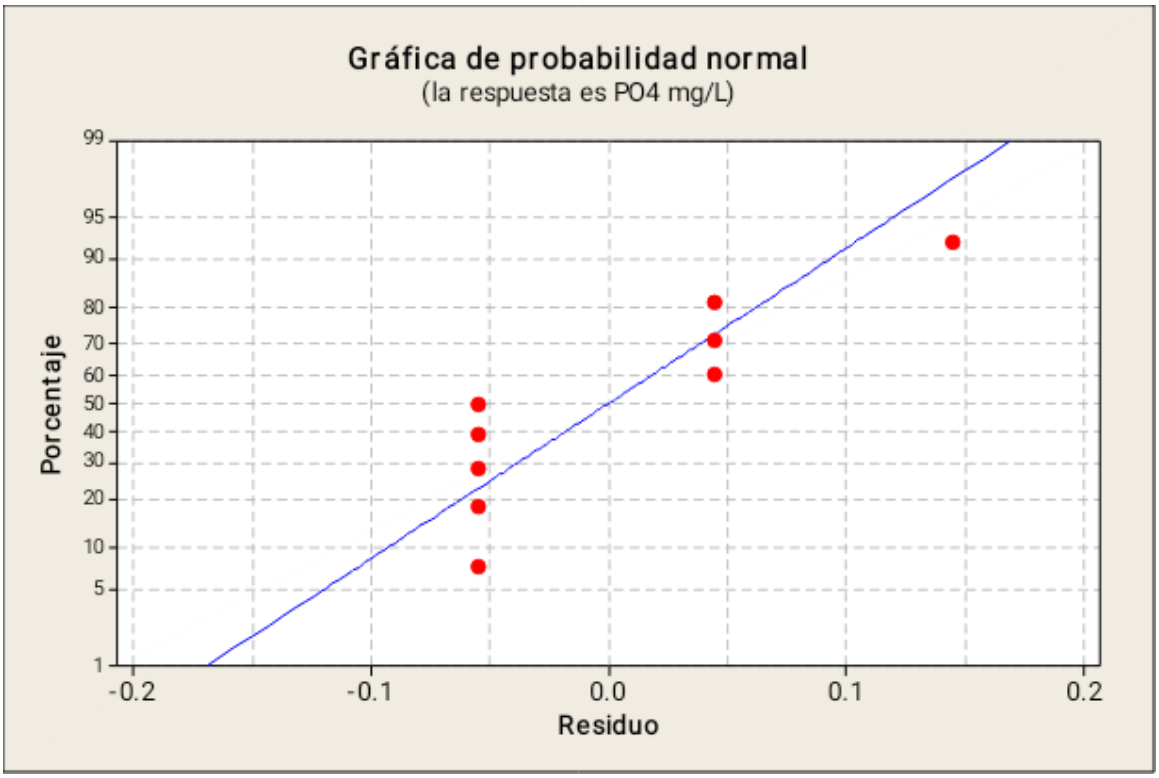
Nivel de confianza individual = 97.80%

Anexo 4. Análisis de PO4 mg/L de los puntos de muestreo. *D*: PO4 mg/L de los puntos de muestreo.

Desviación estándar de D1 = 0.0577350

Desviación estándar de D2 = 0.1

Desviación estándar de D3 = 0.0577350



Gráfica normal de residuos para PO4 mg/L

ANOVA unidireccional: PO4 mg/L vs. trat4

Fuente	GL	SC	CM	F	P
trat4	2	0.00889	0.00444	0.80	0.492
Error	6	0.03333	0.00556		
Total	8	0.04222			

S = 0.07454 R-cuad. = 21.05% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

ICs de 95% individuales para la media

basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	--+---------+---------+---------+-------
1	3	0.23333	0.05774	(----------*----------)
2	3	0.30000	0.10000	(----------*----------)
3	3	0.23333	0.05774	(----------*----------)

--+---------+---------+---------+-------

0.140 0.210 0.280 0.350

Desv.Est. agrupada = 0.07454

Agrupar información utilizando el método de Tukey

trat4	N	Media	Agrupación
2	3	0.30000	A
3	3	0.23333	A
1	3	0.23333	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%. Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de trat4.

Nivel de confianza individual = 97.80%

Anexo D. Análisis estadístico de la cosecha de los cultivos de las cepas de *Chlorella.*

Anexo 1. Cosecha de las cepas

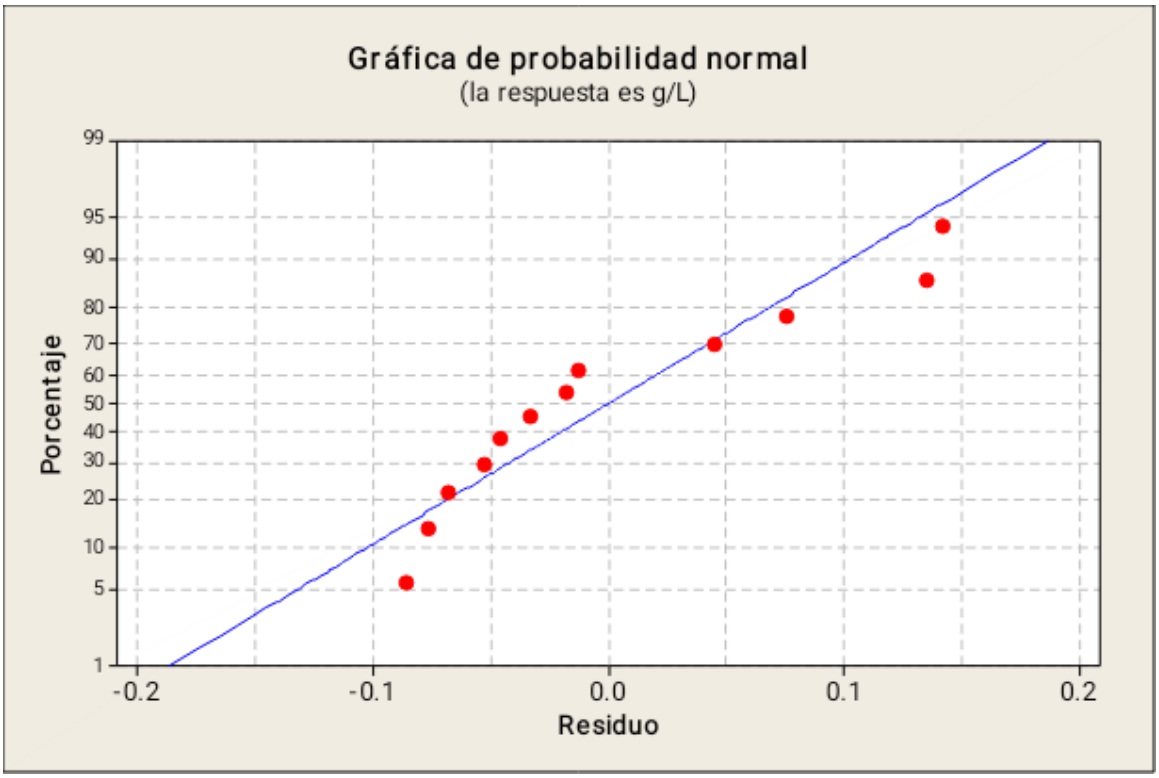
Desviación estándar de C.sp1 = 0.0550757

Desviación estándar de C.sp2 = 0.0208167

Desviación estándar de C.sp3 = 0.0458258

Desviación estándar de C.vulgaris = 0.02

Análisis de regresión general: g/L versus Cepas



Gráfica normal de residuos para g/L

ANOVA unidireccional: g/L vs. Cepas

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Cepas	3	0.08076	0.02692	7.19	0.012
Error	8	0.02993	0.00374		
Total	11	0.11069			

S = 0.06117 R-cuad. = 72.96% R-cuad.(ajustado) = 62.82%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	----+---------+---------+---------+-----
1	3	0.34667	0.10970	(-------*-------)
2	3	0.20667	0.02082	(-------*-------)

3	3	0.31000	0.04583	(-------*-------)
4	3	0.14000	0.02000	(-------*-------)

```
                                    ----+---------+---------+---------+-----
                                      0.10      0.20      0.30      0.40
```

Desv.Est. agrupada = 0.06117

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Cepas	N	Media	Agrupación
1	3	0.34667	A
3	3	0.31000	A
2	3	0.20667	A B
4	3	0.14000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%.Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Cepas

Nivel de confianza individual = 98.74%

Anexo E. Análisis estadístico del análisis bromatológico de los cultivos de las cepas de *Chlorella.*

Anexo 1. Análisis estadístico de proteínas de las cepas.

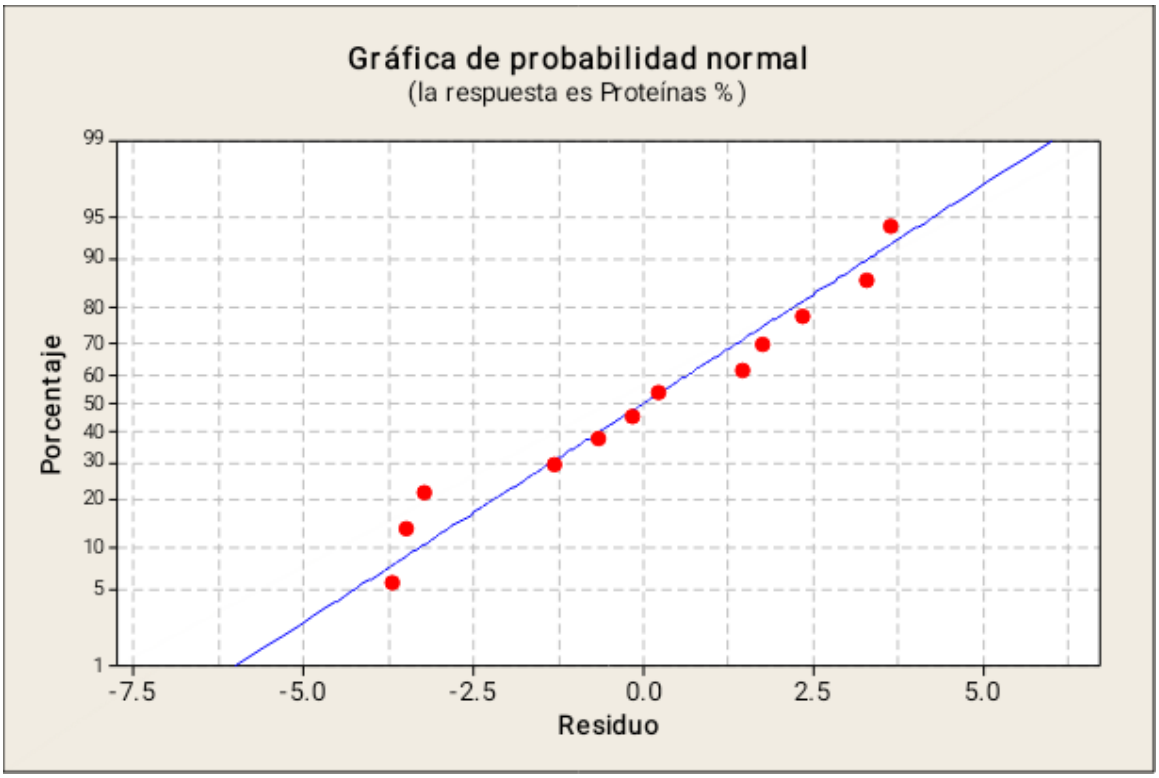
Desviación estándar de C.sp1 proteínas. = 1.04111

Desviación estándar de C.sp2 proteínas. = 0.572364

Desviación estándar de C.sp3 proteínas. = 0.225462

Desviación estándar de Vulgaris proteínas. = 0.963967

Análisis de regresión general: Proteínas % versus Trat.1



Gráfica normal de residuos para Proteínas %

ANOVA unidireccional: Proteínas % vs. Trat.1

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Trat.1	3	125.527	41.842	45.30	0.000
Error	8	7.390	0.924		
Total	11	132.917			

S = 0.9611 R-cuad. = 94.44% R-cuad.(ajustado) = 92.36%

ICs de 95% individuales para la media

basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	--------+---------+---------+---------+-
1	3	23.923	1.545	(----*---)
2	3	23.560	0.572	(----*---)
3	3	22.797	0.225	(---*---)
4	3	30.837	0.964	(---*---)

--------+---------+---------+---------+-

24.0 27.0 30.0 33.0

Desv.Est. agrupada = 0.961

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Trat.1	N	Media	Agrupación
4	3	30.837	A
1	3	23.923	B
2	3	23.560	B
3	3	22.797	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%. Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Trat.1

Nivel de confianza individual = 98.74%

Anexo 2. Análisis estadístico de carbohidratos de las cepas.

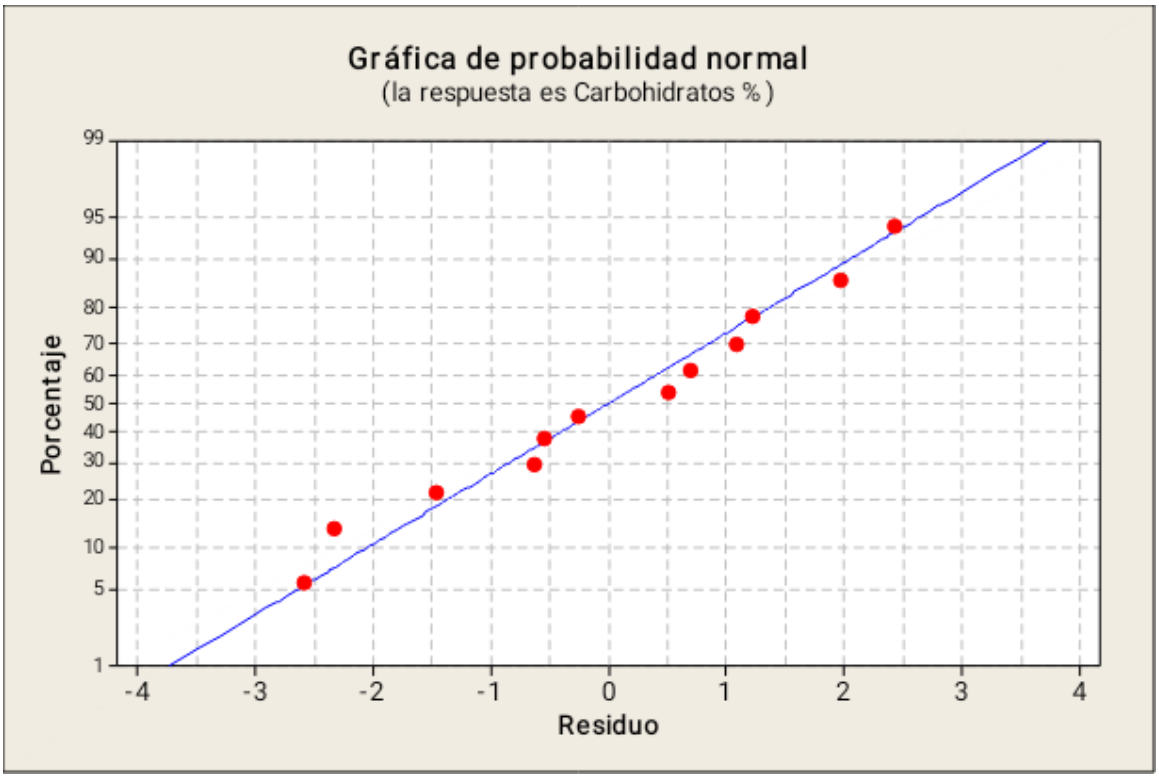
Desviación estándar de C.sp1 carbohidratos. = 0.932541

Desviación estándar de C.sp2 carbohidratos. = 1.16529

Desviación estándar de C.sp3 carbohidratos. = 0.680882

Desviación estándar de Vulgaris carbohidratos. = 1.51744

Análisis de regresión general: Carbohidratos % versus Trat2.



Gráfica normal de residuos para Carbohidratos %

ANOVA unidireccional: Carbohidratos % vs. Trat2.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Trat2.	3	171.93	57.31	45.90	0.000
Error	8	9.99	1.25		
Total	11	181.92			

S = 1.117 R-cuad. = 94.51% R-cuad.(ajustado) = 92.45%

ICs de 95% individuales para la media

basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+---------+---------+---------+----
1	3	15.093	0.933	(----*----)
2	3	16.490	1.165	(----*----)
3	3	22.960	0.681	(----*---)
4	3	23.607	1.517	(----*----)

-----+---------+---------+---------+----

15.0 18.0 21.0 24.0

Desv.Est. agrupada = 1.117

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Trat2.	N	Media	Agrupación
4	3	23.607	A
3	3	22.960	A
2	3	16.490	B
1	3	15.093	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95% . Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Trat2.

Nivel de confianza individual = 98.74%

Anexo 3. Análisis estadístico de lípidos de las cepas.

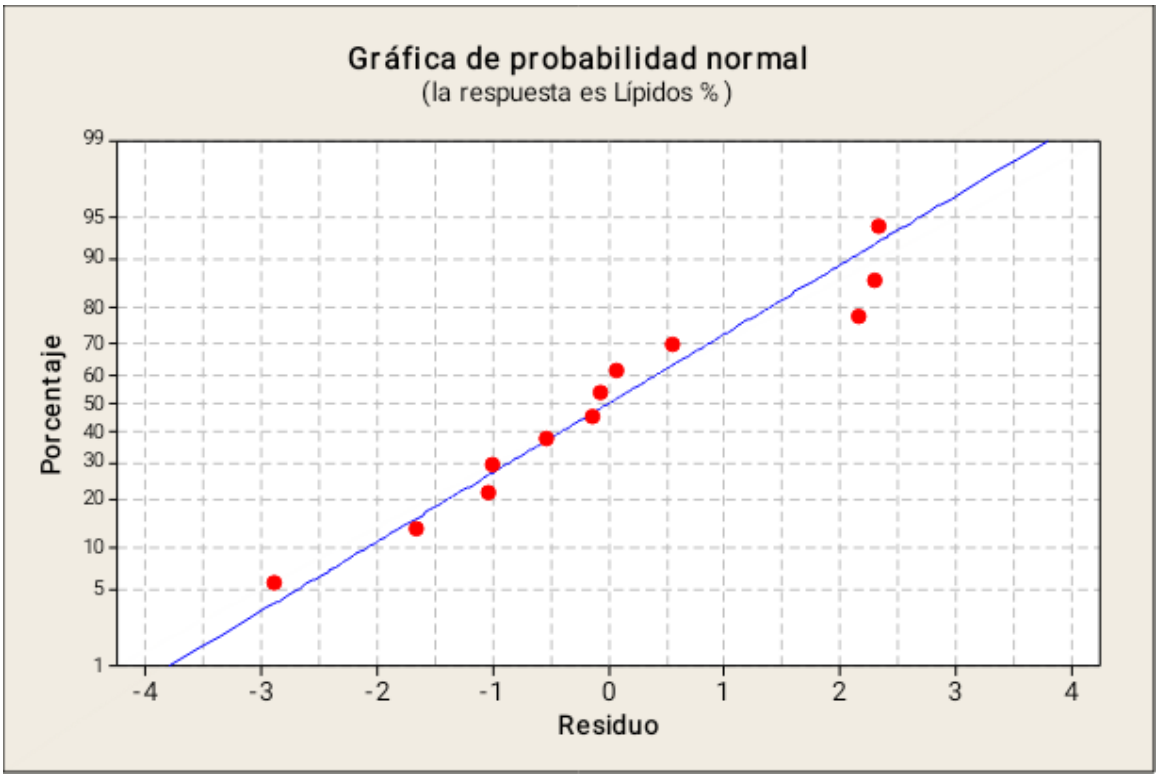
Desviación estándar de C.sp1 lípidos = 0.502693

Desviación estándar de C.sp2 lípidos = 0.546291

Desviación estándar de C.sp3 lípidos = 0.0888819

Desviación estándar de Vulgaris lípidos = 1.48702

Análisis de regresión general: Lípidos % versus Trat.3



Gráfica normal de residuos para Lípidos %

ANOVA unidireccional: Lípidos % vs. Trat.3

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Trat.3	3	52.408	17.469	25.22	0.000
Error	8	5.541	0.693		
Total	11	57.948			

S = 0.8322 R-cuad. = 90.44% R-cuad.(ajustado) = 86.85%

ICs de 95% individuales para la media

basados en Desv.Est. agrupada

Nivel N Media Desv.Est. ------+---------+---------+---------+---

1	3	18.760	0.503	(-----*----)
2	3	18.083	0.546	(----*-----)
3	3	18.990	0.089	(-----*----)
4	3	13.847	1.487	(----*-----)

```
------+---------+---------+---------+---
  14.0      16.0      18.0      20.0
```

Desv.Est. agrupada = 0.832

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Trat.3	N	Media	Agrupación
3	3	18.9900	A
1	3	18.7600	A
2	3	18.0833	A
4	3	13.8467	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%. Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Trat.3

Nivel de confianza individual = 98.74%

Anexo 4. Análisis estadístico de cenizas de las cepas.

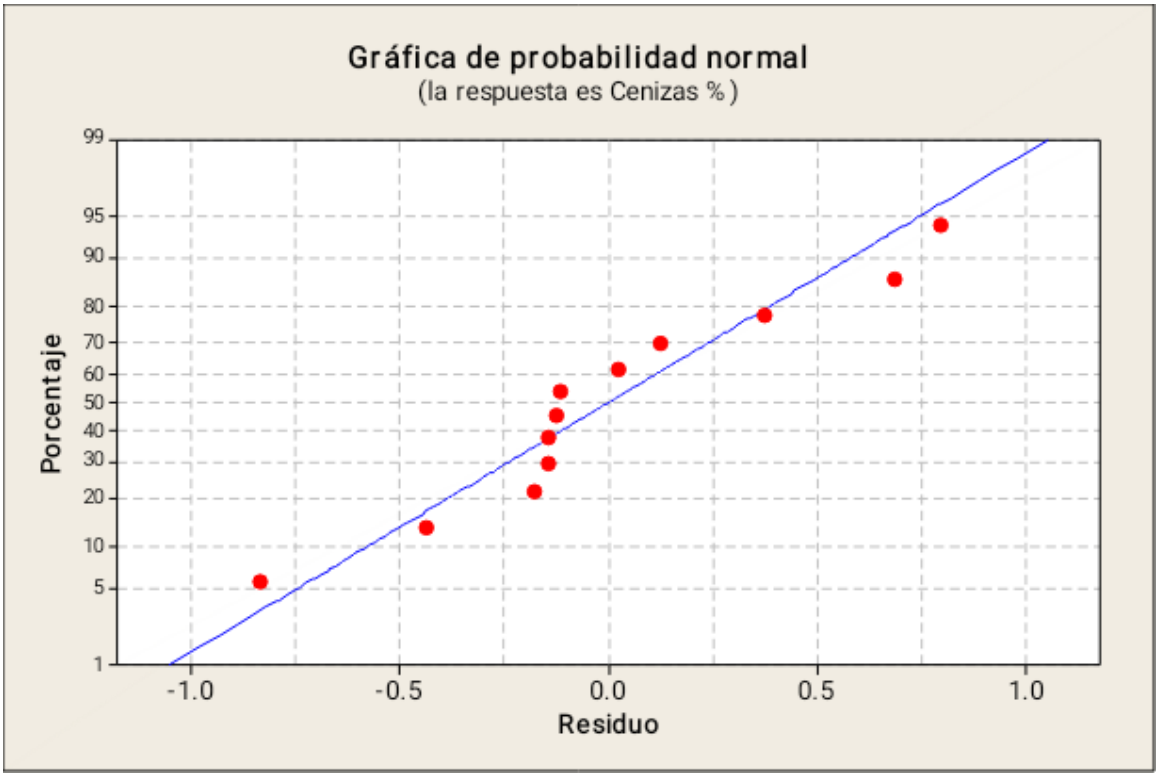
Desviación estándar de C.sp1 cenizas = 0.537029

Desviación estándar de C.sp2 cenizas = 0.499600

Desviación estándar de C.sp3 cenizas = 0.581292

Desviación estándar de C. vulgaris cenizas = 0.278388

Análisis de regresión general: Cenizas % versus Trat.4



Gráfica normal de residuos para Cenizas %

ANOVA unidireccional: Cenizas % vs. Trat.4

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Trat.4	3	3.390	1.130	4.74	0.035
Error	8	1.907	0.238		
Total	11	5.297			

S = 0.4882 R-cuad. = 64.00% R-cuad.(ajustado) = 50.50%

```
                    ICs de 95% individuales para la media
                    basados en Desv.Est. agrupada
Nivel  N   Media  Desv.Est.  --------+---------+---------+---------+-
1      3   3.5800    0.5370  (--------*--------)
2      3   3.5800    0.4996  (--------*--------)
3      3   4.3400    0.5813            (--------*--------)
4      3   4.8300    0.2784                    (--------*--------)
                             --------+---------+---------+---------+-
                                   3.50      4.20      4.90      5.60
```

Desv.Est. agrupada = 0.4882

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Trat.4	N	Media	Agrupación
4	3	4.8300	A
3	3	4.3400	A
2	3	3.5800	A
1	3	3.5800	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%. Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Trat.4

Nivel de confianza individual = 98.74%

Anexo 5. Análisis estadístico de “otros” de las cepas.

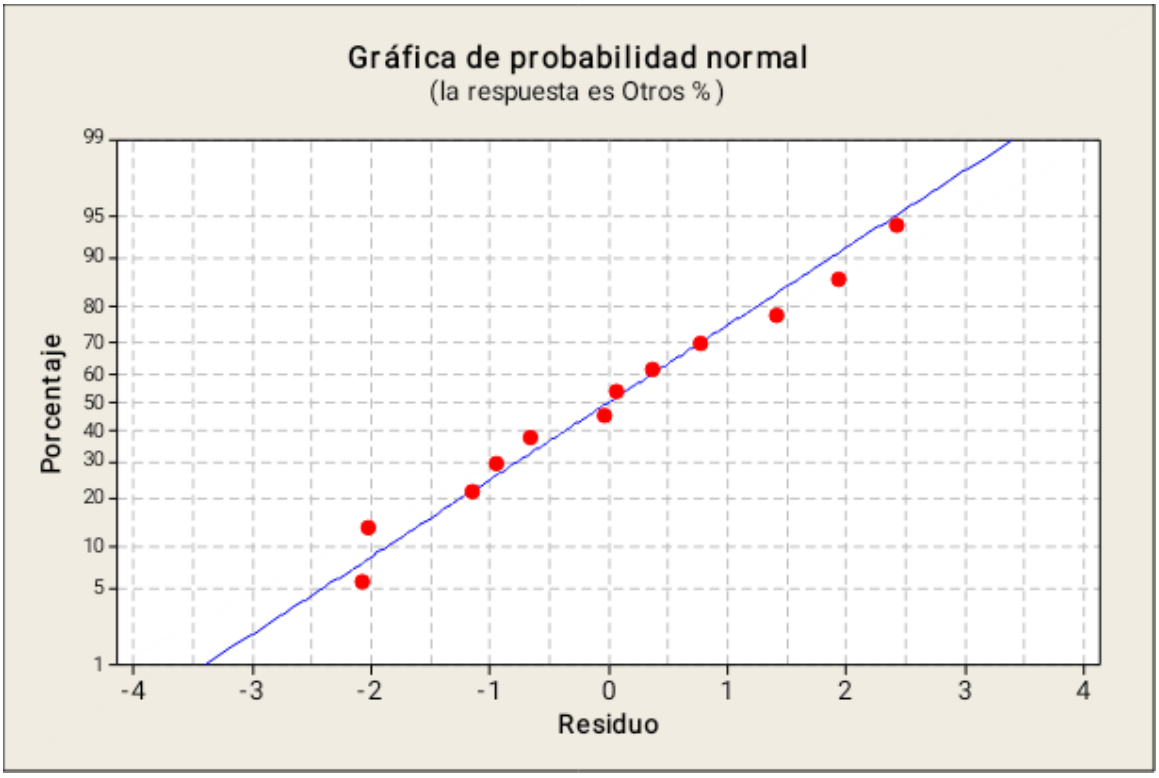
Desviación estándar de C.sp1 otros = 0.606712

Desviación estándar de C.sp2 otros = 0.505074

Desviación estándar de C.sp3 otros = 0.4

Desviación estándar de C. vulgaris otros = 1.06071

Análisis de regresión general: Otros % versus Trat. 5



Gráfica normal de residuos para Otros %

ANOVA unidireccional: Otros % vs. Trat. 5

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Trat. 5	3	275.793	91.931	192.70	0.000
Error	8	3.817	0.477		
Total	11	279.609			

S = 0.6907 R-cuad. = 98.64% R-cuad.(ajustado) = 98.12%

```
                        ICs de 95% individuales para la media
                        basados en Desv.Est. agrupada
Nivel  N   Media  Desv.Est.  -------+---------+---------+---------+--
1      3   38.340    0.607                                   (--*-)
2      3   37.520    0.505                                 (-*--)
3      3   31.830    0.400                     (--*--)
4      3   26.460    1.061   (--*-)
                             -------+---------+---------+---------+--
                                28.0      31.5      35.0      38.5
```

Desv.Est. agrupada = 0.691

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Trat. 5	N	Media	Agrupación
1	3	38.340	A
2	3	37.520	A
3	3	31.830	B

4	3	26.460	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%. Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Trat. 5

Nivel de confianza individual = 98.74%

XI. Calendario de actividades

	1° SEMESTRE						2° SEMESTRE						3° SEMESTRE						4° SEMESTRE					
ACTIVIDAD	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**
Búsqueda bibliográfica																								
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Muestreo y colectas de microalgas																								
							X	X	X	X	X													
Planeación y preparación de los cultivos																								
							X	X	X	X	X	X	X	X										
Análisis bromatológico																								
																	X	X						
Producción de Biodiesel																								
																						X	X	
Elaboración de Tesis																								
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X