



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

Biorrefinería microalgal destinada a la producción sustentable de aceites óptimos para biodiésel y sílice amorfa como un co-producto de valor agregado

Francisco Ezequiel Navarro

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

(Año 2024)

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida de Bahía Blanca dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional del Sur (UNS) durante el período comprendido entre el 7 de mayo de 2019 y el [Escriba aquí la fecha de presentación de la tesis a la misma Secretaría], bajo la dirección de la Dra. Cecilia A. Popovich (UNS-CERZOS-CONICET) y el Dr. Miguel D. Sánchez (UNS-INFISUR-CONICET).



Francisco Ezequiel Navarro



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el 12/12/2024, mereciendo
la calificación de 10 (diez)

RESUMEN

El aumento de la demanda energética, el agotamiento de las reservas de combustibles fósiles y sus efectos ambientales negativos, han impulsado la producción mundial de biodiésel. Tradicionalmente, este biocombustible se obtiene de aceites de semillas comestibles, lo que compite con la producción de alimentos. Las microalgas oleaginosas, que almacenan altos contenidos de lípidos neutros (LN), específicamente triglicéridos (TAG), emergen como una fuente potencial para biodiésel. Esta tesis evalúa el potencial uso de la diatomea marina *Halaphora coffeaeformis*, aislada del estuario de Bahía Blanca, como una fuente sustentable de aceites para biodiésel bajo un concepto de biorrefinería. Los objetivos específicos incluyeron: 1) determinar condiciones óptimas de crecimiento a escala de laboratorio para el escalamiento a cielo abierto; 2) desarrollar cultivos en piletas *raceways* a cielo abierto; 3) definir estresores para la acumulación de TAG; 4) determinar cantidad y calidad de lípidos; 5) estimar propiedades del biodiésel; 6) realizar un seguimiento ultraestructural de la acumulación de TAG en cultivos a cielo abierto y 7) analizar las paredes celulares o frústulos para aplicaciones biomédicas. Bajo condiciones de laboratorio, *H. coffeaeformis* mostró ser euritolerante, con un rango de tolerancia de 5°C a 30°C y de 5‰ a 95‰ de salinidad, y con un crecimiento óptimo entre 20-25 °C y una salinidad de 20‰. El estrés salino a 45‰ incrementó la acumulación de LN y el porcentaje del ácido graso palmitoleico (C16:1 ω -7), un ácido graso monoinsaturado preciado para la producción de biodiésel por brindar ventajas relacionadas con su viscosidad cinemática, especialmente en climas fríos. La relación Si:N de 0,5 favoreció el crecimiento de la cepa, mientras que una relación Si:N de 0,125 promovió una rápida acumulación de LN. Para el escalamiento de los cultivos a piletas de tipo *raceways* se prepararon inóculos en fotobiorreactores. Los cultivos en piletas *raceways* a cielo abierto, realizados en verano y primavera del 2021, se basaron en agua de mar, obtenida del estuario de Bahía Blanca, enriquecida con un biofertilizante y silicatos. La velocidad de crecimiento y productividad de biomasa fueron similares en ambas estaciones del año. El contenido de lípidos totales alcanzó aproximadamente 45% y 36% del peso seco libre de cenizas en verano y primavera, respectivamente. La salinidad fue el principal estresor que aceleró la acumulación de TAG. El perfil de ácidos grasos de esta especie cumple con estándares internacionales para biodiésel, asegurando buen rendimiento en climas fríos. Adicionalmente, la productividad lipídica ($\sim 25,6 \text{ kg ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$) superó al cultivo de soja. El análisis ultraestructural y de fluorescencia realizado a lo largo del cultivo de primavera permitió efectuar un seguimiento del origen y formación de los puntos de acumulación de TAG a nivel celular. La principal acumulación de TAG ocurrió en gotas lipídicas citoplasmáticas, durante la fase estacionaria tardía; mientras que los plastoglóbulos representaron sitios de acumulación cloroplástica de TAG. Finalmente, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y la biocompatibilidad de las paredes celulares o frústulos de *H. coffeaeformis* para aplicaciones biomédicas. Frústulos de cultivos en fotobiorreactor (F-FBR) y piletas *raceway* (F-RAC) fueron sometidos a oxidación y calcinación, mostrando cambios significativos en composición y propiedades superficiales. Los F-FBR y F-RAC a 300°C tuvieron mayor área BET, y los F-FBR presentaron mejor estabilidad en medio acuoso. Las pruebas de fragilidad osmótica mostraron que los frústulos de la cepa estudiada presentan una buena compatibilidad con eritrocitos humanos, crucial para su uso en aplicaciones biomédicas, como la administración de medicamentos. En conclusión, los cultivos de *H. coffeaeformis* representan una fuente sustentable y renovable de TAG de calidad para la producción de biodiésel y de sílice biogénico con potenciales aplicaciones biomédicas. Bajo un concepto de biorrefinería, este estudio aporta resultados de base para avanzar hacia la optimización

de cultivos bioenergéticos, particularmente en regiones áridas y/o semiáridas, con acceso a agua de mar.

ABSTRACT

The increase in energy demand, the depletion of fossil fuel reserves and the negative environmental effects associated with their use have driven global biodiesel production. Traditionally, this biofuel is obtained from edible seed oils, which competes with food production. Oleaginous microalgae, which store high contents of neutral lipids (NL), specifically triglycerides (TAG), emerge as a potential biodiesel source. This thesis evaluates the potential use of the marine diatom *Halamphora coffeaeformis*, isolated from the Bahía Blanca estuary, as an oil sustainable source for biodiesel under a biorefinery concept. The specific objectives included: 1) determining optimal growth conditions at the laboratory scale for scaling up to outdoor systems; 2) developing cultures in outdoor raceway ponds; 3) defining stressors for TAG accumulation; 4) determining lipid quantity and quality; 5) estimating biodiesel properties; 6) performing ultrastructural monitoring of TAG accumulation in outdoor cultures; and 7) analyzing cell walls or frustules for biomedical applications. Under laboratory conditions, *H. coffeaeformis* proved to be eurytolerant, with a tolerance range of 5°C to 30°C and salinity from 5‰ to 95‰, and optimal growth between 20-25°C and a salinity of 20‰. Saline stress at 45‰ increased NL accumulation and the percentage of palmitoleic acid (C16:1 ω -7), a monounsaturated fatty acid valued for biodiesel production due to its kinematic viscosity advantages, especially in cold climates. The Si:N ratio of 0.5 favored strain growth, while a Si:N ratio of 0.125 promoted rapid NL accumulation. The scaling up of cultures to raceway ponds was carried out in photobioreactors. Open-air pond cultures, conducted in the summer and spring of 2021, were based on seawater obtained from the Bahía Blanca estuary, enriched with a biofertilizer and silicates. Biomass growth rate and productivity were similar in both seasons. Total lipid content reached approximately 45% and 36% of the ash-free dry weight in summer and spring, respectively. Salinity was the main stressor accelerating TAG accumulation. The fatty acid profile of this species meets international biodiesel standards, ensuring good performance in cold climates. Additionally, lipid productivity ($\sim 25.6 \text{ kg ha}^{-1} \text{ day}^{-1}$) surpassed that of soybean cultivation. Ultrastructural and fluorescence analysis conducted throughout the spring culture allowed tracking the origin and formation of TAG accumulation points at the cellular level. The main accumulation of TAG occurred in cytoplasmic lipid droplets during the late stationary phase, while plastoglobules represented TAG accumulation sites at the chloroplastic level. Finally, the physicochemical properties and biocompatibility of *H. coffeaeformis* cell walls or frustules for biomedical applications were evaluated. Frustules from photobioreactor cultures (F-FBR) and raceway ponds (F-RAC) were subjected to oxidation and calcination, showing significant changes in composition and surface properties. F-FBR and F-RAC at 300°C had a higher BET surface area, and F-FBR showed better stability in an aqueous medium. Osmotic fragility tests showed that the frustules of the studied strain present good compatibility with human erythrocytes. In conclusion, *H. coffeaeformis* cultures represent a sustainable and renewable source of high-quality TAG for biodiesel production and biogenic silica with potential biomedical applications. Under a biorefinery concept, this study provides baseline results to advance towards the optimization of bioenergy crops, particularly in arid and/or semi-arid regions with access to seawater.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Dra. Cecilia A. Popovich por aceptarme bajo su dirección durante estos años, por su predisposición para enseñarme y guiarme en mi formación profesional, por la paciencia y por los enriquecedores intercambios que tuvimos.

A mi co-director, el Dr. Miguel D. Sánchez, por ayudarme a comprender con facilidad ideas que escapan a mi disciplina de base.

A la Doctoras Mariela Agotegaray, Fernanda Horst y Ana M. Martínez por ayudarme durante desarrollo de esta tesis.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CICpBA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado las becas para realizar mi doctorado y llevar a cabo esta Tesis.

Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, de la Universidad Nacional del Sur, y al Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) por brindarme los medios necesarios y el lugar de trabajo para el desarrollo de esta Tesis.

A la Dra. Patricia I. Leonardi por sus consejos, revisiones y buena predisposición.

Al Dr. Lucas A. Martín y a Jorge Oyola por sus consejos, sus charlas y su ayuda.

A la Dra. M. Cecilia Damiani quien me acompañó y me brindó su ayuda en varios de los experimentos llevados a cabo a lo largo de esta tesis.

A todos mis compañeros del LEBBA, Delfi, Melanie, Pao(la), Pao(lo), Anita y Pablo por sus charlas y momentos compartidos a lo largo de estos años.

A mis compañeros becarios del CERZOS, especialmente a mis amigos Juan y Cielo quienes me acompañaron gran parte de mi carrera de grado y afortunadamente pude coincidir con ellos durante este tiempo.

A mi familia y amigos por bancarme durante estos años y aceptar los momentos en los que desaparecí de sus vidas concentrado en proyectos personales y el desarrollo de esta tesis.

A mi papá Jorge E. y a mi mamá M. Fernanda por su apoyo durante todos estos años. Llegar hasta acá hubiera sido imposible sin todo lo que hicieron por mí. Los quiero mucho.

A mi hermano Iván, por ser un compañero y un estímulo, impulsándome a ser más curioso, detallista y preciso es mis ideas.

A Virginia, por el amor y compañía que me da.

Esto habría sido más difícil sin todos ellos.

ESCRITURA DE LA TESIS

En el **Capítulo 1** se realiza una introducción general de la temática desarrollada en esta Tesis. Se aborda brevemente la situación energética mundial, enfatizando en el creciente interés global por las energías alternativas y renovables, y particularmente en los biocombustibles. Dentro de ellos, el biodiésel de tercera generación a partir de la producción de aceites microalgales, se presenta como una vía alternativa que no compite por alimentos ni agua para consumo humano. Se hace mención a las características generales de las microalgas, y se destacan las principales ventajas de las microalgas oleaginosas como materia prima para la producción de biodiésel. Se desarrolla el concepto de biorrefinería y sus ventajas para aumentar la rentabilidad de procesos de producción de biomasa microalgal. Además, se detalla la importancia de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis*, aislada del estuario de Bahía Blanca, como potencial fuente de materia prima para la obtención de aceites para biodiésel y sílice amorfa como un co-producto de valor agregado. Finalmente, se presenta el objetivo general y los objetivos específicos de esta Tesis. Las hipótesis de trabajo se detallan en cada capítulo según corresponda.

En el **Capítulo 2** se detallan los materiales y métodos comunes al desarrollo de la Tesis.

En el **Capítulo 3** se evalúan los efectos de diferentes condiciones ambientales (temperatura, salinidad y relación Si:N) sobre la velocidad de crecimiento y el contenido y la calidad lipídica de *H. coffeaeformis*, analizando el contenido de lípidos totales, clases y fracciones lipídicas y la composición de los ácidos grasos.

En el **capítulo 4** se realiza una evaluación de los efectos de variables ambientales y fisicoquímicas sobre cultivos estacionales de *H. coffeaeformis* en piletas *raceway* a cielo abierto. Se analizan, el crecimiento de la cepa, la productividad de biomasa y lípidos, la calidad lipídica y el momento óptimo de cosecha. Además, se realiza una comparación de las propiedades de biodiésel, estimadas a partir del perfil de ácidos grasos de *H. coffeaeformis* cultivada a cielo abierto, con las propiedades del biodiésel obtenido a partir de aceites de cultivos de soja.

En el **capítulo 5** se realiza un estudio con microscopio electrónico de transmisión y microscopio confocal de fluorescencia y para evaluar la acumulación de lípidos neutros y el estado fisiológico de las células de *H. coffeaeformis* cultivada a cielo abierto.

En el **capítulo 6** se realiza una caracterización de las paredes celulares o frústulos de *H. coffeaeformis*, provenientes de cultivos en fotobiorreactor y pileta *raceway*, abarcando los siguientes aspectos: análisis ultraestructural con microscopio electrónico de barrido, composición elemental, área superficial, grupos funcionales, potencial z, diámetro hidrodinámico, polidispersión y biocompatibilidad con eritrocitos humanos. Dicha información es usada para evaluar el potencial de los frústulos en aplicaciones nanotecnológicas, particularmente en aplicaciones biomédicas, y proponer su aprovechamiento en un proceso de biorrefinería para aumentar la rentabilidad del proceso.

Finalmente, en el **Capítulo 7**, se presentan una síntesis y conclusiones generales donde se destacan los hallazgos más relevantes de esta Tesis, y se plantean lineamientos para seguir avanzando en futuros estudios en este campo.

Índice

PREFACIO	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ESCRITURA DE LA TESIS.....	VI
Capítulo 1 – Introducción.....	1
1.1. Problemática.....	1
1.2. Biocombustibles.....	3
1.3. Biodiésel.....	5
1.4. Cultivos de microalgas con fines bioenergéticos.....	6
1.5. Biorrefinerías	9
1.6. Selección de la diatomea nativa <i>Halamphora coffeaeformis</i> para el desarrollo de cultivos bioenergéticos a cielo abierto	13
1.7. Objetivo general.....	14
1.8. Objetivos específicos.....	15
1.9. Hipótesis.....	15
Capítulo 2 – Materiales y Métodos comunes en esta Tesis	17
2.1. Especie seleccionada y condiciones de mantenimiento.....	17
2.2. Acondicionamiento del material de cultivo	18
2.3. Preparación de medios de cultivo	18
2.3.1. Filtración y esterilización del agua de mar	18
2.3.2. Preparación del medio de cultivo f/2.....	19
2.3.3. Preparación del medio de cultivo BAY.....	20
2.4. Determinación de la densidad celular y de la velocidad de crecimiento	20
2.5. Determinación del peso seco y del peso seco libre se cenizas	20
2.5.1. Determinación del peso seco.....	20
2.5.2. Determinación del peso seco libre se cenizas	21
2.6. Determinación de la cinética de fluorescencia de la clorofila-a y Rojo Nilo ...	22
2.6.1. Detección de la intensidad de fluorescencia de la clorofila-a	22
2.6.2. Detección de la intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo	22
2.6.3. Relación entre el Rojo Nilo y la clorofila-a.....	23
2.7. Extracción de lípidos totales, fraccionamiento y caracterización del perfil de ácidos grasos.....	23
2.7.1. Extracción de lípidos totales	23
2.7.2. Fraccionamiento	26
2.7.3. Determinación del perfil de ácidos grasos	28

Capítulo 3 – Evaluación del efecto de la temperatura, la salinidad y la relación Si:N sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos neutros en <i>Halamphora coffeaeformis</i>	30
3.1. Introducción	30
3.2. Materiales y Métodos.....	35
3.2.1. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento	35
3.2.2. Efecto de la salinidad sobre la velocidad de crecimiento	36
3.2.3. Efecto de la salinidad sobre la acumulación, cantidad y calidad lipídica de la especie	37
3.2.4. Efecto de diferentes combinaciones de salinidad y relaciones Si:N sobre la velocidad de crecimiento y la acumulación de TAG	38
3.2.5. Análisis Estadístico.....	39
3.3. Resultados.....	39
3.3.1. Efecto de la temperatura y la salinidad sobre la velocidad de crecimiento de <i>H. coffeaeformis</i>	39
3.3.2. Efecto de la salinidad sobre la acumulación de lípidos neutros y la cantidad y calidad lipídica de <i>H. coffeaeformis</i>	42
3.3.3. Efecto de diferentes combinaciones de salinidad y relación Si:N sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos neutros de <i>H. coffeaeformis</i>	47
3.4. Discusión.....	48
3.5. Conclusiones	54
Capítulo 4 – Cultivo de <i>Halamphora coffeaeformis</i> a cielo abierto en pileta tipo <i>raceway</i>	56
4.1. Introducción	56
4.2. Materiales y Métodos.....	60
4.2.1. Clima del área de estudio	60
4.2.2. Producción de inóculo	60
4.2.3. Cultivos a cielo abierto en piletas tipo <i>raceway</i>	62
4.2.4. Determinación de la cinética de la intensidad de fluorescencia de la clorofila- <i>a</i> y el rojo Nilo. Cálculo de la relación Rojo Nilo y clorofila- <i>a</i>	65
4.2.5. Monitoreo de variables climáticas y fisicoquímicas	66
4.2.6. Determinación de la densidad celular y la velocidad de crecimiento	66
4.2.7. Determinación del peso seco y la productividad de biomasa	67
2.1.1.1. Determinación del peso seco.....	67
2.1.1.2. Determinación de la productividad volumétrica y areal	67
4.2.8. Determinación de la cinética de nutrientes disueltos.....	68
4.2.9. Extracción de lípidos totales	68
4.2.10. Fraccionamiento de lípidos	70
4.2.11. Determinación del perfil de ácidos grasos	70
4.2.12. Calidad del biodiésel a partir de perfiles de ácidos grasos.....	70

4.2.13. Análisis estadístico	71
4.3. Resultados.....	71
4.3.1. Cinética de Cla y RN, velocidad de crecimiento y producción de biomasa 71	
4.3.2. Clima y condiciones fisicoquímicas del cultivo durante los ensayos a cielo abierto 73	
4.3.3. Cinética de nutrientes inorgánicos disueltos	75
4.3.4. Cantidad y calidad de lípidos	77
4.3.5. Propiedades del biodiésel estimadas a partir del perfil de ácidos grasos 81	
4.4. Discusión.....	83
4.5. Conclusión.....	90
Capítulo 5 – Análisis ultraestructural de la acumulación de triglicéridos en <i>Halamphora coffeaeformis</i> cultivada a cielo abierto	92
5.1. Introducción	92
5.2. Materiales y Métodos.....	97
5.2.1. Estudio con microscopio electrónico de transmisión (MET)	97
5.2.2. Estudio con microscopio confocal de fluorescencia (MCF)	98
5.2.3. Estudio con microscopio electrónico de barrido (MEB)	98
5.2.4. Estimación del número y tamaño de puntos de acumulación de lípidos neutros en cultivos de <i>H. coffeaeformis</i>	99
5.3. Resultados.....	99
5.4. Discusión.....	110
5.5. Conclusión.....	115
Capítulo 6 - Caracterización de la pared celular de <i>Halamphora coffeaeformis</i> y su posible aplicación como transportador de drogas	117
6.1. Introducción	117
6.2. Materiales y métodos.....	124
6.2.1. Obtención de biomasa para análisis de frústulos	124
6.2.2. Limpieza de frústulos por oxidación y tratamiento térmico	124
6.2.3. Composición elemental superficial.....	126
6.2.4. Morfología y composición elemental.....	128
6.2.5. Área superficial BET	128
6.2.6. Presencia de grupos funcionales	129
6.2.7. Potencial Zeta.....	129
6.2.8. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersión	130
6.2.9. Caracterización de hemoglobina libre media y fragilidad osmótica de eritrocitos.....	131
6.2.10. Determinación de hemoglobina libre.....	132

6.2.11. Fragilidad osmótica.....	133
6.3. Resultados.....	133
6.3.1. Descripción morfológica del frústulo	133
6.3.2. Análisis termogravimétrico.....	138
6.3.3. Composición elemental con XPS y EDS.....	138
6.3.4. Presencia de grupos funcionales.....	139
6.3.5. Área superficial BET	142
6.3.6. Diámetro hidrodinámico (DH), índice de polidispersión (IPD) y potencial zeta (ζ)	142
6.3.7. Caracterización de hemoglobina libre media y fragilidad osmótica de eritrocitos.....	143
6.4. Discusión.....	146
6.5. Conclusión.....	152
Capítulo 7 - Síntesis y conclusiones generales.....	153
Referencias	158

Capítulo 1 – Introducción

1.1. Problemática

El crecimiento constante de la población mundial y la expansión de las economías han generado un aumento sin precedentes en la demanda de los recursos no renovables, especialmente de los combustibles fósiles (Awosusi *et al.* 2022). Por su parte, el uso de estos combustibles representa la principal fuente de gases de efecto invernadero (GEI) (Wang & Azam 2024), con un gran impacto sobre el cambio climático global (Naik *et al.* 2010 Zheng *et al.* 2019). A medida que las temperaturas globales aumentan debido a estas emisiones, la sequía y la desertificación en algunas áreas reducen la disponibilidad de agua dulce y tierras cultivables (Wang & Azam 2024).

En la actualidad, la demanda energética global se satisface principalmente mediante la explotación y producción de combustibles fósiles, que representan el 82,3% del total, distribuidos en carbón (26,9%), petróleo (30,1%) y gas natural (24,4%), mientras que la energía hidroeléctrica y otras fuentes renovables constituyen solo el 6,76% y el 6,71% de la matriz energética, respectivamente (Fig. 1.1) (BP 2022). En Argentina, en particular, la dependencia de los combustibles fósiles es aún más pronunciada, alcanzando el 86% del total, siendo el gas natural (48%) y el petróleo (35,9%) los principales contribuyentes, seguido por energía hidroeléctrica y otras fuentes renovables con el 5,25% y 5,83%, respectivamente (BP 2022).

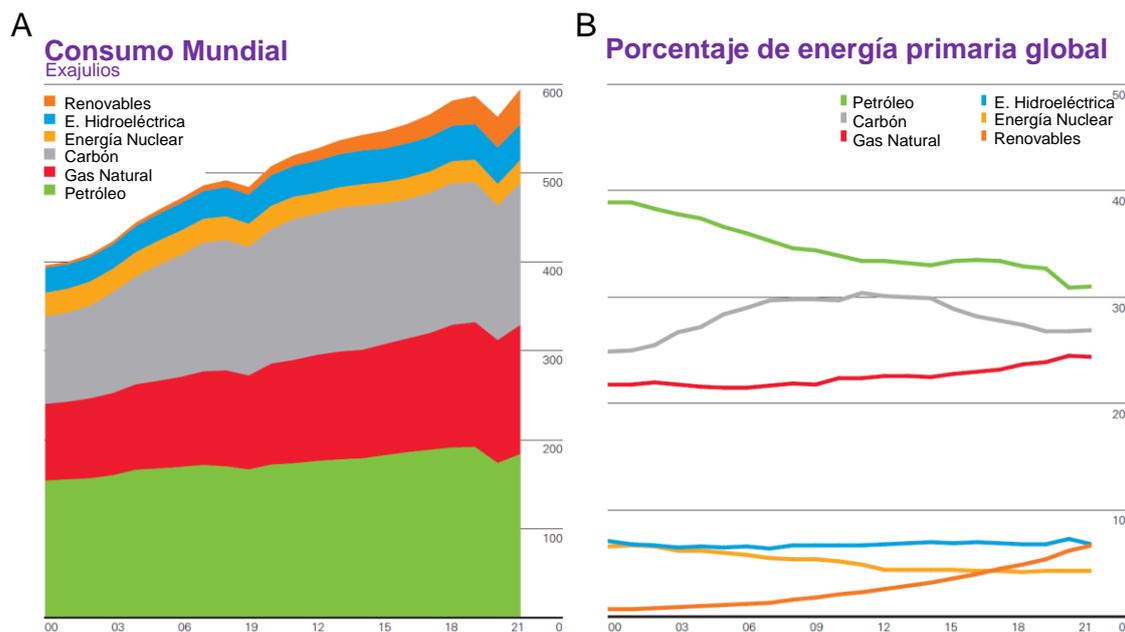


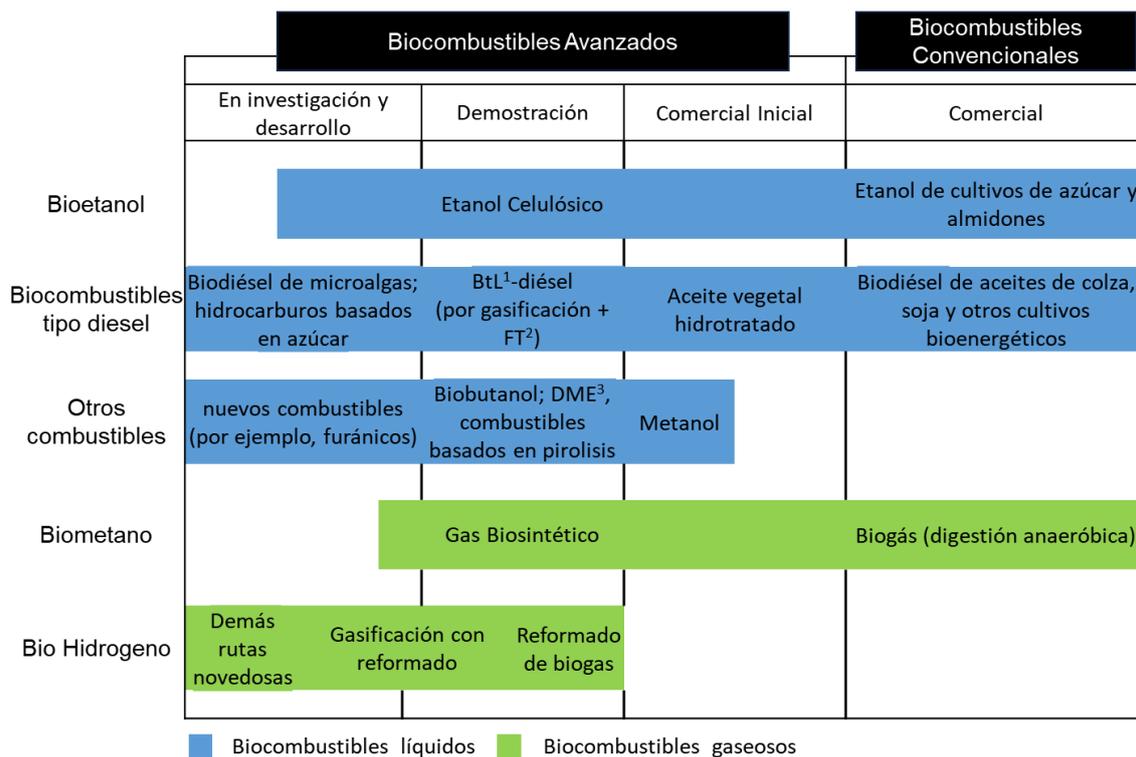
Figura 1.1 A) Consumo mundial de energía entre 2000 y 2021. **B)** Porcentaje de consumo de energía primaria según el tipo de energía entre 2000 y 2021. Fuente: modificado de BP 2022.

Bajo este escenario, la viabilidad a largo plazo de los combustibles fósiles ha ido disminuyendo en los últimos años (Holechek *et al.* 2022). Argentina se comprometió en su Segunda Contribución Determinada a Nivel Nacional (NDC, por su sigla en inglés) a una meta absoluta e incondicional, que consiste en no exceder la emisión neta de 359 MtCO_{2e} en el año 2030. Esto implica una disminución total del 19% de las emisiones en comparación con el máximo histórico alcanzado en 2007 (MAyDS 2020). La transición energética es el camino hacia un nuevo modelo, con el fin de sustituir la energía proveniente de combustibles fósiles altamente contaminantes, como el carbón o el petróleo, por energías renovables rentables y amigables con el medioambiente (Demirbas 2009, Chen *et al.* 2019). A nivel mundial, se están introduciendo gradualmente tecnologías más sustentables para producir distintas fuentes de energía y productos químicos a partir de materias primas renovables, destacándose entre ellas la biomasa. En particular, las biorrefinerías son sistemas productivos orientados al aprovechamiento integral de la biomasa destinada a biocombustibles y co-productos de valor agregado, con el fin de hacer procesos redituables y ambientalmente amigables (MinCyT 2013). La optimización de estos procesos y la selección de biomasa adecuada, podría resultar en

estrategias sustentables para complementar la demanda global de energías renovables, la cual debería duplicarse hacia el año 2035 (World Energy Outlook 2023).

1.2. Biocombustibles

Dentro del ámbito de las energías renovables, se destacan los biocombustibles. En un sentido amplio, se pueden definir como aquellos combustibles que se obtienen por o a partir de organismos vivos renovables (Ruan *et al.* 2019). La biomasa, por su parte, es la materia orgánica de origen biológico obtenida directa o indirectamente por el proceso de fotosíntesis (Bonechi *et al.* 2017). Es una fuente de energía que proviene de materiales no fósiles, como pueden ser los cultivos energéticos, los desechos agrícolas y forestales y diferentes desechos animales (Ruan *et al.* 2019). La energía producida mediante el uso de biomasa recibe el nombre de bioenergía, y ésta puede emplearse para generar electricidad, para generar calor o para generar movimiento, entre otros, tanto en ámbitos domésticos, industriales o de transporte (Bonechi *et al.* 2017; Rojas-Flores *et al.* 2020). Los biocombustibles presentan una serie de beneficios, como incentivar la utilización de recursos energéticos locales (Russo *et al.* 2012), impulsar el desarrollo y la inversión agrícola (Pradhan *et al.* 2014), diversificar la oferta de combustibles (Pradhan *et al.* 2014), reducir la dependencia energética de las importaciones (Russo *et al.* 2012; Alaswad *et al.* 2015), crear empleos (Pradhan *et al.* 2014; Alaswad *et al.* 2015) y promover el desarrollo económico rural. A pesar de las ventajas de los biocombustibles, su uso aún no está tan extendido, en parte porque siguen compitiendo con los combustibles convencionales que se encuentran en el mercado, y porque aún falta generar más conocimiento frente a la gran diversidad de potenciales fuentes de biomasa (Ambaye *et al.* 2021). De acuerdo con el estado de comercialización de las tecnologías de biocombustibles, estos pueden ser clasificados en biocombustibles convencionales y biocombustibles avanzados o alternativos (Ruan *et al.* 2019) (Fig. 1.2).



1. Biomasa-a-líquidos; 2. Proceso Fischer-Tropsch; 3. Dimetil éter.

Figura 1.2. Biocombustibles clasificados de acuerdo al estado de comercialización de sus tecnologías. Modificado de Ruan *et al.* (2019).

Además, según las fuentes de materia prima, los biocombustibles se categorizan en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación (Saladini *et al.* 2016, Nanda *et al.* 2018). De todos ellos, los biocombustibles de primera generación son los que principalmente se comercializan en los mercados internacionales. Los biocombustibles de primera generación se producen a partir de cultivos alimentarios, utilizando almidones, azúcares y aceites vegetales comestibles, como el maíz, aceite de palma, entre otros (Saladini *et al.* 2016; Puricelli *et al.* 2021). Aunque las tecnologías de producción de este tipo de biocombustibles están muy desarrolladas, el uso de cultivos alimentarios y forrajeros para la producción de energía genera una competencia de “alimentos vs. energía” que podría aumentar los precios de los alimentos y disminuir su disponibilidad (Puricelli *et al.* 2021). Además, se debe tener en cuenta que, en el futuro, los efectos del cambio climático podrían reducir los rendimientos de los cultivos alimentarios (Nanda *et al.* 2018; Puricelli *et al.* 2021).

Los biocombustibles de segunda generación se producen a partir de biomasa no alimentaria, como, por ejemplo, biomasa lignocelulósica proveniente de cultivos agrícolas y forestales, incluidos residuos agrícolas y de procesamiento de alimentos (Saladini *et al.* 2016). Aunque evitan la competencia alimento-combustible, estos combustibles requieren pasos adicionales para su producción, como procesos de conversión BtL (biomasa a líquidos), procesos catalíticos (por ejemplo, reacciones de Fischer-Tropsch) y rutas bioquímicas (por ejemplo, conversión de polisacáridos en monosacáridos) (Ganguly *et al.* 2021), lo que conlleva costos operativos más elevados (Nanda *et al.* 2018, Puricelli *et al.* 2021). Por último, los biocombustibles de tercera generación se producen a partir de biomasa algal, en particular de microalgas y de otros microorganismos (Leong *et al.* 2018; Puricelli *et al.* 2021) y su implementación está en una etapa de investigación y desarrollo (I&D) (Saladini *et al.* 2016; Ruan *et al.* 2019). En particular, algunas especies microalgales presentan un gran potencial debido a su elevada tasa de crecimiento, capacidad de acumular aceites o almidones adecuados para la producción de biodiésel y etanol, respectivamente y a su condición de no competir por alimento ni agua para consumo humano. En particular, esta última característica se asocia con la tolerancia de algunas microalgas de crecer en aguas marinas y/o residuales. Sin embargo, a pesar de las ventajas expuestas, los biocombustibles de primera generación son los únicos que se producen a escala industrial y se comercializan a nivel global (Hirani *et al.* 2018), mientras que los de segunda generación, por ej. provenientes de aceites reciclados, se comercializan a pequeña escala (Foteines *et al.* 2020; Van Grinsven *et al.* 2020).

1.3. Biodiésel

Dentro de los biocombustibles líquidos, el biodiésel se define como el éster monoalquílico de cadena larga de triglicéridos (TAG) obtenido por la transesterificación de un alcohol y de TAG (Fig. 1.3) derivados de recursos renovables (Knothe 2005), tales como aceite vegetal puro, grasa animal, sebo, aceite vegetal no comestible y aceite de cocina usado (Gebremariam & Marchetti 2018). Este biocombustible es adecuado para su uso en motores tipo diésel (Knothe 2005). Además, de esta reacción se obtiene glicerol que puede ser

usado para la industria química, textil, alimenticia, productos de cuidado personal y aplicaciones terapéuticas, entre otros (Monteiro *et al.* 2018). Nuestro país tiene como fuente principal de biodiésel comercial al aceite de soja (Hilbert & Galligani 2014) y es el sexto productor de biodiésel a nivel mundial con una producción de 1.792 millones de litros promedio anuales entre 2020 y 2022 (OCDE-FAO 2023). Su precio puro se sitúa en U\$D 1,24 L⁻¹ (Departamento de energía de Estados Unidos 2024), y su comercialización se basa en *blends* (Hilbert & Galligani 2014), es decir, mezclas con diésel de petróleo, las cuales deben contener al menos un 5% de biodiésel (B5) en Argentina (Ley 27640/2021, Marco regulatorio de biocombustibles, Art. 8., Argentina, 2021). La soja posee ciertas limitaciones como materia prima para biodiésel, dado que requiere de tierras de cultivo con irrigación elevada y se relaciona con cambios en el uso de la tierra que generan problemas ambientales (Correa *et al.* 2019; Gohin 2019; Gas & Gundimeda 2022). Considerando las limitaciones que implica el uso del aceite de soja para biodiésel, la obtención de nuevas fuentes de materias primas resulta indispensable para asegurar una diversificación de la matriz energética, con el fin de reducir la competencia “alimento vs. energía” y lograr una mayor sustentabilidad en la provisión de biocombustibles.

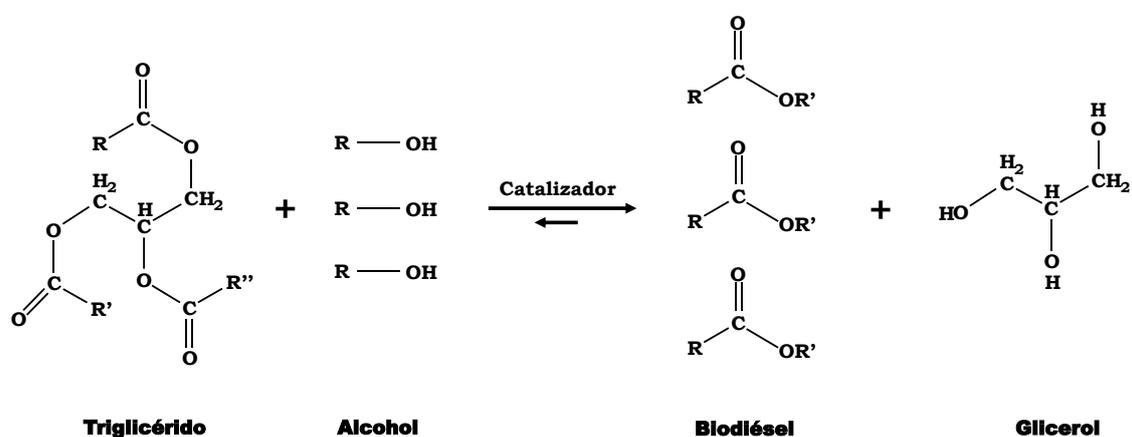


Figura 1.3 Producción de biodiésel a partir de una reacción de transesterificación.

1.4. Cultivos de microalgas con fines bioenergéticos

Las microalgas han despertado especial interés como materia prima para la producción de biodiésel de tercera generación a nivel mundial debido a las siguientes características: 1) son organismos microscópicos (2-200 μm) que

poseen un crecimiento exponencial que les permite, en términos de horas, duplicar su biomasa; 2) pueden producir biomasa por fotosíntesis a partir de recursos simples (agua, luz y nutrientes); 3) algunas especies, llamadas oleaginosas, pueden acumular contenidos de TAG de hasta un 40% de su peso seco; 4) pueden ser cultivadas en aguas salobres o marinas, sobre tierras no cultivables; 5) no compiten con la producción de alimentos, forrajes y otros productos derivados de la agricultura; 6) son excelentes captadoras de CO₂, el cual puede provenir de la atmósfera, de gases industriales o de carbonatos solubles; 7) en relación a las emisiones de GEI, el ciclo de vida de la producción de biomasa microalgal presenta un valor de emisión de CO₂ de -183 KgCO₂/MJ, siendo el más negativo respecto a los otros bioenergéticos; 8) no requieren del uso de herbicidas o pesticidas para su cultivo; 9) pueden crecer en aguas residuales, usando los nutrientes para su crecimiento y consecuentemente provocando un efecto de biorremediación; y 10) su composición de aceites puede ser regulada variando las condiciones ambientales o las unidades de cultivo (Brennan & Owende 2010; Huntley *et al.* 2015; Sanchez-Rizza *et al.* 2017; Zuccaro *et al.* 2020).

Si bien la producción de biodiésel a partir de aceites microalgales es técnicamente factible (Hannon *et al.* 2010; Rogers *et al.* 2014; Hegel *et al.* 2017; Popovich *et al.* 2019), su implementación a escala comercial sigue siendo costosa (Norsker *et al.* 2011 Casanova *et al.* 2022) (Fig. 1.2.). Actualmente, los mayores esfuerzos de investigación están enfocados en: la selección de especies robustas para el desarrollo de cultivos masivos; el tipo y gasto energético de los reactores; el uso de medios de cultivo económicos; la ubicación, condiciones climáticas y topografía del lugar de emplazamiento, los métodos de cosecha (Acién Fernández *et al.* 2019) y la y la ingeniería genética de microalgas para mejorar su producción de TAG (Fayyas *et al.* 2020). En Argentina, las investigaciones en este campo aún se encuentran en una etapa de I&D (Damiani *et al.* 2010;2014; Popovich *et al.* 2012a; 2012b; 2019;2020; Bongiovani *et al.* 2013; 2019; Barnech Bielsa *et al.* 2016; Martín *et al.* 2016; 2018; Hegel *et al.* 2019) y requieren de respaldo institucional y económico para pasar a una etapa demostrativa. En nuestro país, la Ley 26190, promueve el interés nacional por la generación de energía eléctrica a partir del uso de fuentes

de energía renovables, incluyendo entre ellas a la energía de biomasa. Por lo tanto, la posibilidad de subsidios o precios diferenciales para el combustible microalgal podría representar una estrategia para aumentar su rentabilidad.

Con respecto al tipo de reactores, las microalgas pueden ser cultivadas en sistemas cerrados o sistemas abiertos a cielo abierto (Zuccaro *et al.* 2020). Los primeros, denominados fotobiorreactores (FBR), se pueden clasificar en tubulares, columnares y planos. Estos sistemas permiten producir biomasa bajo condiciones ambientales controladas (Chanquia *et al.* 2021) y también permiten evitar problemas de contaminación (Chang *et al.* 2017). Sin embargo, el funcionamiento de estos equipos requiere de costos operativos elevados debido al mantenimiento de la iluminación, temperatura, circulación y homogeneización del cultivo. Por su parte, los sistemas abiertos aprovechan la luz solar y están ampliamente expuestos al medio ambiente, siendo afectados por diferentes variables climáticas como la luz, la temperatura, las precipitaciones, entre otras. Dentro de estos sistemas, las piletas de tipo *raceway* son ampliamente usadas por su fácil construcción y sistemas de circulación con paletas (Zuccaro *et al.* 2020). Este tipo de piletas demanda una baja inversión inicial en comparación con los sistemas cerrados, dado que presentan una baja profundidad (entre 30 y 40 cm) y se pueden construir de hormigón o tierra compactada cubierta por membrana (Chisti *et al.* 2016). Su instalación no requiere el uso de tierras cultivables, pero sí del uso de agua, siendo en general el agua de mar o agua residual el medio seleccionado para cultivos masivos (Herrera *et al.* 2020). La productividad de biomasa de estos sistemas, es en general menor que la de los FBR, sin embargo, son adecuados para biorrefinerías destinadas a la obtención de aceites para biocombustible a escala industrial. Alguno de los factores que afectan la productividad de estos sistemas, se relacionan con las condiciones climáticas y estacionales del lugar (Ishika *et al.* 2018; Echenique-Subiabre *et al.* 2023). Por otro lado, la productividad de la biomasa en estos reactores abiertos también puede verse influenciada por la competencia frente a organismos contaminantes, como hongos, bacterias, virus, rotíferos, y copépodos, entre otros (Zuccaro *et al.* 2020). El uso de agua de mar o salobre con salinidades elevadas es una estrategia para disminuir la contaminación, dado que el desarrollo de competidores es menos probable (Bartley *et al.* 2013). Por esta

razón, uno de los primeros pasos para el éxito de un cultivo bioenergético a cielo abierto es la selección de especies microalgales nativas y euritolerantes, con el propósito de que estén adaptadas a las condiciones climáticas del lugar y que presenten un amplio rango de tolerancia a la temperatura y la salinidad (Ishika *et al.* 2017; Borowitzka & Vonshark 2017).

1.5. Biorrefinerías

El concepto de biorrefinería es similar al de las tradicionales refinerías de petróleo, pero en este caso, la principal materia prima no es el petróleo crudo, sino que es la biomasa, es decir, cualquier materia orgánica obtenida de organismos vivos o recientemente vivos, que puede utilizarse con fines industriales (Espinoza Pérez *et al.* 2017). En consecuencia, dependiendo de la materia prima utilizada, existen numerosas posibilidades de conversión de la misma, lo que multiplica los posibles tipos de biorrefinerías que se pueden desarrollar (Espinoza Pérez *et al.* 2017).

En 1998, el programa *Aquatic Species Program* (Departamento de Energía de los Estados Unidos) reconoció a las microalgas como una fuente potencial de aceites para biocombustibles (Sheehan *et al.* 1998) y desde entonces se han logrado grandes avances en esta disciplina, como la optimización del cultivo de varias especies y su producción lipídica, mejora de tecnologías de cultivo, eficiencia ambiental, y modelado bioeconómico (Borowitzka and Moheimani 2013; Moshood *et al.* 2021; Chhandama *et al.* 2021; Marques Casanova *et al.* 2023; Liu *et al.* 2024). Sin embargo, la mayoría de los antecedentes han sido basados en cultivos a escala de laboratorio o a supuestos provenientes de modelos matemáticos (Jorquera *et al.* 2010; Gallagher 2011; Ación Fernández *et al.* 2019). Si bien todas las microalgas son capaces de producir lípidos, la cantidad y calidad lipídica varía con las especies y cepas utilizadas, como también de las condiciones ambientales y estrategias de cultivo (Hu *et al.* 2008, Morales *et al.* 2021; Khoo *et al.* 2023). Las especies microalgales oleaginosas, son aquellas capaces de sintetizar y acumular altos contenidos de lípidos, particularmente lípidos neutros, entre los cuales se destacan los TAG, considerados la materia prima ideal para la producción de biodiésel (Hu *et al.* 2008). Estas especies, en general, acumulan lípidos como una estrategia de

reserva de energía bajo condiciones desfavorables para el crecimiento, tales como deficiencia de nutrientes, cambios de intensidad de luz, temperatura, salinidad, envejecimiento, entre otras (Morales *et al.* 2021). Por lo tanto, otro desafío para lograr cultivos bioenergéticos con altos contenidos de TAG, es importante seleccionar especies oleaginosas y además dilucidar qué factores son estresores para su crecimiento (Morales *et al.* 2021; Yang *et al.* 2023).

Otro aspecto a tener en cuenta al momento de diseñar una biorrefinería para biodiésel es el tipo de co-productos que pueden obtenerse en forma simultánea con la producción de los aceites (Wang *et al.* 2022). Estos co-productos pueden recuperarse luego del proceso de extracción lipídica (Fig. 1.4) (Sarma *et al.* 2021). Las microalgas pueden producir ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6, vitaminas, aminoácidos, esteroides o pigmentos antioxidantes (Chew *et al.* 2017; Gifubi *et al.* 2018; Koutra *et al.* 2020), con importantes aplicaciones en las industrias nutracéutica, cosmética, agrícola y alimentaria. Sin embargo, la síntesis de todas estas biomoléculas no es aleatoria, sino que requiere de una selección adecuada de las especies microalgales, de un conocimiento profundo de su biología y fisiología, y de un análisis riguroso de las estrategias de cultivo.

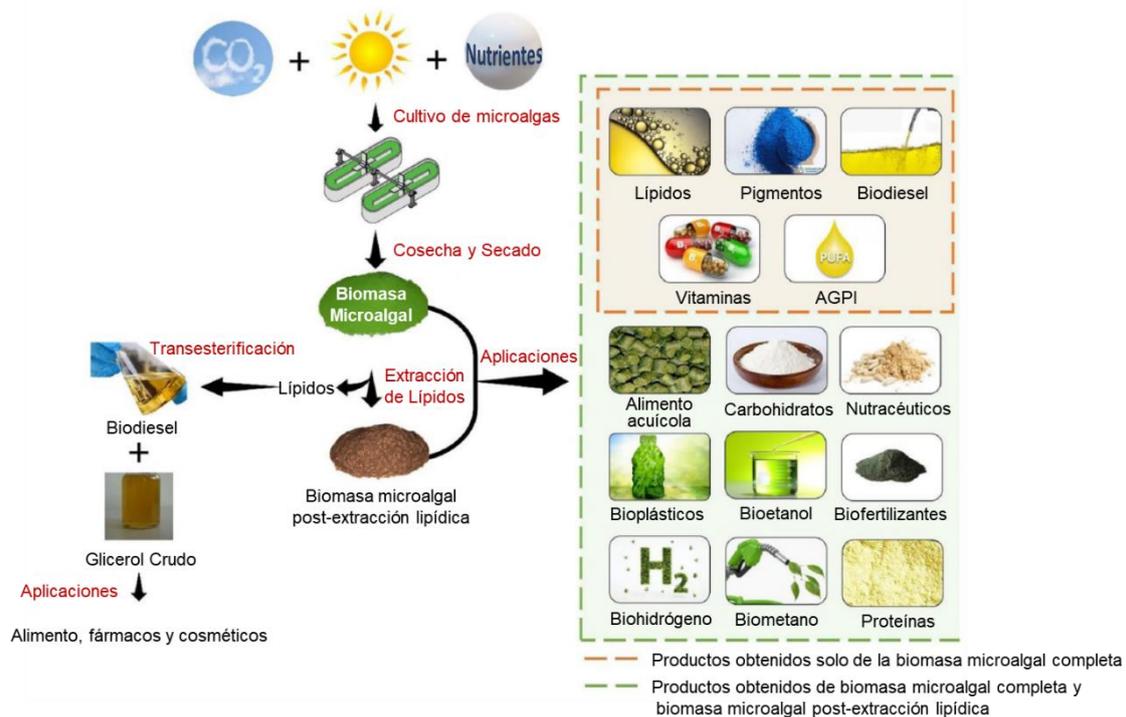


Figura 1.4. Representación esquemática de varios productos derivados de biomasa de microalgas o biomasa de microalgas luego de extraer sus lípidos.

El proceso de escalado de cultivos microalgales con fines comerciales se encuentra bien desarrollado para la obtención de productos de alto valor agregado, como el cultivo de *Spirulina* como fuente de proteínas en Estados Unidos (Shimamatsu 2013) y Sur de África (Grobbelaar 2009) y el cultivo de *Dunaliella salina*, como fuente de carotenos en Australia (Borowitzka 2013) e Israel (Ben-Amotz 2004). Por su parte, si bien el proceso de escalado para la obtención industrial de aceites para biodiésel, ha sido emprendido por algunas empresas, como por ejemplo Sapphire Energy Inc. en los Estados Unidos (White & Ryan 2015), la descripción detallada de los procesos de escalado se mantiene bajo resguardo, lo cual dificulta reproducir las experiencias o adaptarlas a nuevas instalaciones o regiones geográficas (Borowitzka & Vonshak 2017).

Bajo este escenario, es claro que para un escalado a nivel industrial se requiere de un gran conocimiento y dominio de múltiples factores, que abarcan aspectos inherentes al cultivo, tanto a escala de laboratorio como a campo (White & Ryan 2015; Borowitzka & Vonshak 2017), como son: a) tipo de especie microalgal a usar, b) su grado de tolerancia ambiental y c) la capacidad de competencia frente a organismos extraños. También es importante dilucidar los

factores extrínsecos que afectan al cultivo como son: 1) la variación ambiental (temperatura; radiación solar; precipitación; entre otros), 2) los aspectos de funcionamiento de los reactores (uso de fotobiorreactores o de piletas tipo *raceway*, sistema de suministro de CO₂, mezcla, consumo de energía, etc) (Borowitzka & Vonshak 2017) y 3) el sistema de cosecha (White & Ryan 2015). Desde hace algunas décadas, el número de trabajos científicos relacionados con el desarrollo de cultivos microalgales con fines bioenergéticos ha crecido exponencialmente, en particular bajo condiciones controladas (Chisti *et al.* 2016; Choudhary *et al.* 2022; Marques Casanova *et al.* 2023). Sin embargo, son escasos los estudios de cultivos bioenergéticos microalgales a cielo abierto bajo un concepto de biorrefinería (Bhattacharya & Goswami *et al.* 2020; Okeke *et al.* 2022; Mehariya *et al.* 2023).

Dentro de la gran diversidad de microalgas, las diatomeas son organismos unicelulares pertenecientes a la división Ochrophyta y clase Bacillariophyceae (Cavalier-Smith 1986; Adl *et al.* 2005), que ocupan una posición clave como productores primarios en los ecosistemas marinos del planeta (Serôdio & Lavaud 2022). Además, tienen la capacidad de sintetizar naturalmente lípidos neutros, en particular TAG, como sustancia de reserva en gotas lipídicas citoplasmáticas (Leyland *et al.* 2020). Estas características las transforman en excelentes candidatas para el desarrollo de cultivos bioenergéticos orientados a la producción de biodiésel. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones en este campo se basan en la selección de microalgas verdes o de la división Chlorophyta, siendo muy pocos los trabajos científicos orientados al uso de diatomeas. Además, las diatomeas pueden producir metabolitos de gran impacto comercial como: a) ácidos grasos esenciales poliinsaturados de cadena larga (AGPI o PUFA por su sigla en inglés) de la serie ω -3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y de la serie ω -6, como el ácido araquidónico (ARA) Tyagi *et al.* 2024), b) polisacáridos, como la crisolaminarina y sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Barnech Bielsa *et al.* 2016; Popovich *et al.* 2020), c) pigmentos antioxidantes, como la fucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina (Popovich *et al.* 2020; Yang *et al.* 2020), d) ácidos grasos monoinsaturados (AGM o MUFA), como el ácido palmitoleico de la serie ω -7 (C:16-1), el cual ha sido considerado óptimo para la producción de biodiésel de

buena calidad (Knothe 2008; Hildebrand *et al.* 2014; Saranya & Ramachandra 2020) y e) sílice amorfa hidratada nanoporoso ($\text{SiO}_2 [n \cdot \text{H}_2\text{O}]$), el cual forma parte de las paredes celulares o frústulos de las diatomeas (Mitchell & Voelcker 2009; Mal *et al.* 2021; Sardo *et al.* 2021). A pesar de la gran potencialidad que presentan los metabolitos provenientes de este grupo de microalgas, su aplicación dependerá de las condiciones de cultivo usadas. Bajo este contexto, una biorrefinería a base de diatomeas podría representar una fuente novedosa y renovable de TAG para la producción de biodiésel en forma simultánea con la producción de sílice amorfa proveniente de sus paredes celulares o frústulos. Con respecto a este último punto, la nanotecnología de diatomeas se ha transformado en una disciplina de gran interés en áreas de la biología, bioquímica, biotecnología, física, química, ciencia de los materiales e ingeniería (Gordon *et al.* 2009), debido a las diferentes aplicaciones que se le pueden dar a sus frústulos. Por ejemplo, en soportes catalíticos, dispositivos ópticos, microsensores, filtros y aplicaciones biomédicas como transportadores de drogas (Sardo *et al.* 2021). Si bien los frústulos han atraído un gran interés a nivel mundial en las últimas décadas (Townley 2011; Korsunsky *et al.* 2020; Tramontano *et al.* 2020; Yang *et al.* 2023), su potencial aplicación aún requiere de pruebas experimentales. Esto se debe a la gran variedad en las formas, subestructuras y propiedades físico-químicas de los frústulos. Además, no existen hasta el momento, estudios relacionados con cultivos de diatomeas en *raceways* a cielo abierto orientados a la obtención simultánea de aceite para biodiésel y sílice amorfa nanoporosa.

1.6. Selección de la diatomea nativa *Halamphora coffeaeformis* para el desarrollo de cultivos bioenergéticos a cielo abierto

Como se ha mencionado, en Argentina, el campo relacionado con el uso de microalgas para desarrollos bioenergéticos aún se encuentra en una etapa de investigación I&D. En particular, el grupo de investigación del Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas (LEBBA), perteneciente al CERZOS (CONICET-UNS), en donde se desarrolló este trabajo de Tesis, ha puesto a punto procesos de cultivo y producción de biodiésel a partir de aceites de especies microalgales nativas y provenientes de ceparios internacionales,

bajo condiciones controladas (Damiani *et al.* 2010; Leonardi *et al.* 2011; Popovich *et al.* 2012a y b; Baldisserotto *et al.* 2016; Damiani *et al.* 2014; Barnech Bielsa *et al.* 2016; Martín *et al.* 2016; 2018; 2020; Bongiovani *et al.* 2019; Popovich *et al.* 2019). Si bien estos resultados han sido necesarios para la bioprospección de las especies y diseños de escalado, no han podido aportar información sobre las desviaciones que pueden sufrir los procesos de producción de biomasa y lípidos bajo condiciones naturales a cielo abierto.

De acuerdo a la información obtenida en el LEBBA y considerando que las diatomeas son el grupo de microalgas dominantes en el estuario de Bahía Blanca (Popovich *et al.* 2008; Popovich & Marcovecchio 2008; Guinder *et al.* 2010), en este trabajo de Tesis se ha seleccionado a la diatomea bentónica *Halamphora coffeaeformis* para realizar cultivos a escala piloto a cielo abierto. Esta especie fue aislada del estuario mencionado y estudiada en FBR y pileta tipo *raceway*, bajo condiciones controladas de laboratorio (Martín *et al.* 2016, 2018). La selección se basó en que es una especie nativa, adaptada a las condiciones locales, es robusta, crece en agua de mar y además produce altas concentraciones de TAG bajo condiciones desfavorables (34% respecto a la biomasa seca libre de cenizas) (Martín *et al.* 2016). Además, estudios realizados en el LEBBA indican que el biodiésel producido por métodos supercríticos a partir de aceites de *H. coffeaeformis* (Hegel *et al.* 2019), cumple con las normas de calidad impuestas por los estándares comerciales, alentando la optimización de cultivos masivos de esta especie a cielo abierto. Adicionalmente, *H. coffeaeformis* presenta un frústulo compuesto por sílice amorfa con potenciales usos industriales que no han sido evaluados hasta la actualidad. Es importante destacar, que los cultivos de esta cepa nativa se llevarán a cabo con agua de mar proveniente del estuario de Bahía Blanca, por lo que su cultivo no compite con agua dulce, un recurso preciado para consumo humano.

1.7. Objetivo general

Esta Tesis tiene como objetivo general realizar un estudio integral de las variables biológicas y ambientales que afectan la producción de biomasa y lípidos de la diatomea marina *H. coffeaeformis* en fotobiorreactores y piletas tipo *raceway* a cielo abierto, con el fin de lograr un escalamiento piloto demostrativo,

estandarizado y reproducible bajo un concepto de biorrefinería. Dichos cultivos serán orientados a la producción de aceites óptimos para biodiésel y de sílice amorfa como un co-producto de valor agregado.

1.8. Objetivos específicos

- 1 - Determinar el rango de tolerancia y los valores óptimos de temperatura y salinidad a escala de laboratorio.
- 2 - Definir las condiciones ambientales y el diseño de cultivo en fotobiorreactores, que inducen y optimizan la producción de biomasa para la obtención de inóculos funcionales a piletas de 250L.
- 3 - Definir las condiciones ambientales y el diseño de cultivo en piletas tipo *raceways* de 250 L, que inducen y optimizan la producción de biomasa rica en triglicéridos (TAG) aptos para biodiésel.
- 4 - Seleccionar un estimador rápido y preciso para la determinación del período de cosecha.
- 5 - Determinar y evaluar la cantidad y calidad de lípidos totales, fracciones lipídicas (neutros y polares) y perfil de ácidos grasos de cada fracción, a través de métodos usados a escala de laboratorio y a través del método de Soxhlet, con el fin de aplicar un método usado a nivel industrial.
- 6 - Determinar las propiedades del biodiésel a partir del perfil de ácidos grasos obtenidos.
- 7 - Realizar un seguimiento ultraestructural de la acumulación de TAG en cultivos a cielo abierto para detectar el estado fisiológico de la célula y la localización y desarrollo de puntos de acumulación de lípidos neutros (PALN), como plastoglóbulos y gotas lipídicas citoplasmáticas.
- 8 - Analizar la composición elemental, condición estructural y funcionalidad de la superficie de las paredes celulares silíceas con el fin de evaluar su posible rol como material en aplicaciones biomédicas.

1.9. Hipótesis

- 1 - *H. coffeaeformis* es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas y salinidades.

- 2 - La biomasa obtenida en FBRs columnares (25L) bajo condiciones favorables de crecimiento, se presenta como un inóculo adecuado a los requerimientos volumétricos de piletas de 250 L.
- 3 - El agua de mar enriquecida con biofertilizantes y silicatos es un medio sustentable para piletas de 250L.
- 4 - Considerando que *H. coffeaeformis* es una diatomea que crece a bajas intensidades de luz, la temperatura representa el factor ambiental más crítico para su crecimiento.
- 5 - La especie tiene la capacidad de acumular TAG en respuesta a un agotamiento natural de los nutrientes disueltos.
- 6 - El monitoreo de la cinética de los TAG con técnicas espectrofluorométricas con Rojo Nilo permite establecer el tiempo de acumulación y optimiza la determinación del tiempo de cosecha.
- 7 - Los hábitos bentónicos de la especie y su capacidad de autoflocular y formar *biofilms* sobre el fondo de la pileta, facilitan la cosecha y reducen su costo a mayores volúmenes.
- 8 - La calidad de los aceites varía de acuerdo a la estación del año en la cual se realiza el cultivo.
- 9 - La calidad del biodiésel de cultivos a cielo abierto cumple con las normas de los estándares comerciales.
- 10 - Los estudios ultraestructurales permiten detectar el estado fisiológico de las células, así como también la presencia de puntos de acumulación de lípidos neutros (PALN), como plastoglobulos y gotas lipídicas citoplasmáticas, aportando conocimiento al análisis integral de la cinética de TAG y al momento apropiado para la realización de la cosecha en cultivos bioenergéticos de diatomeas.
- 11 - Las paredes celulares silíceas pueden recuperarse íntegramente luego de la extracción de aceites y representan un residuo de valor agregado con potenciales aplicaciones industriales.

Capítulo 2 – Materiales y Métodos comunes en esta Tesis

En este capítulo se describe la metodología común a diferentes secciones de la Tesis

2.1. Especie seleccionada y condiciones de mantenimiento

La especie seleccionada para desarrollar esta Tesis fue la diatomea oleaginosa marina *Halamphora coffeaeformis* (C. Agardh) Lekov. Esta especie fue aislada del estuario de Bahía Blanca (38° 45' S, 62° 22' O) por la Dra. Cecilia Popovich en abril del 2010, quien la identificó morfológicamente hasta el nivel de especie (Martín *et al.* 2016). Por su parte, Sala *et al.* (2020) realizaron una caracterización molecular y toxicológica de la cepa. Cultivos clonales¹ y no axénicos de *H. coffeaeformis* se mantienen en cámaras de cultivo, bajo condiciones controladas (15 °C ± 1 °C, 21 μmol fotones.m².s⁻¹ de intensidad de luz y un fotoperíodo de 12:12 horas de luz:oscuridad), en el Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas (LEBBA), CERZOS-CONICET, Bahía Blanca, Argentina. Los cultivos *stock* destinados a esta Tesis se mantuvieron en forma líquida en tubos de vidrio estéril con tapa rosca, con 10 mL de medio de cultivo f/2 (McLachland 1973), preparado con agua de mar estéril del estuario de Bahía Blanca (EBB), a 33 ‰, la salinidad típica del estuario (Popovich & Marcovecchio 2008). Los cultivos *stock* fueron agitados esporádicamente en forma manual para propiciar el contacto de las células con el medio nutritivo. Los repiques se realizaron semanalmente para evitar el agotamiento de los nutrientes y la proliferación bacteriana. Si bien no se usaron cultivos axénicos, siempre se trabajó bajo una campana adaptada, en condiciones de asepsia y con material esterilizado. La luz fue proporcionada por lámparas LED de color blanco frío. Se utilizó un radiómetro modelo 192SB de LI-COR para medir la radiación fotosintéticamente activa (PAR). Para la selección del fotoperíodo se consideró que en la región de Bahía Blanca (38°43'0"S 62°16'0"W), hay 9:25 horas de luz

¹ Los cultivos clonales de microalgas son poblaciones genéticamente idénticas derivadas de una única célula.

solar y 14:35 horas de oscuridad en el solsticio de invierno y 14:50 horas de luz solar y 9:10 horas de oscuridad en el solsticio de verano. De acuerdo a esta información se seleccionó un fotoperíodo promedio de 12h:12h luz:oscuridad para el presente estudio.

2.2. Acondicionamiento del material de vidrio

El acondicionamiento del material de vidrio utilizado para la preparación del medio de cultivo, el mantenimiento de los cultivos *stock* y la realización de los ensayos, fue de la siguiente manera:

- Lavado: El material fue lavado con cepillo y detergente no iónico diluido al 1% (v/v) y enjuagado con agua corriente. Para un segundo lavado se utilizó solución de HCl diluido al 10 % (v/v) y se enjuagó con agua destilada, varias veces.
- Secado: el material acondicionado se colocó en estufa a 60°C.
- Esterilizado: Se realizó por medio de calor húmedo mediante un autoclave a 120°C y 1 atm de presión, durante 20 minutos.

2.3. Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo usado para mantenimiento de cultivos *stock* y ensayos de crecimiento fue el medio convencional f/2 (McLachland 1973). Además, se analizó un medio de cultivo no convencional, con el fin de realizar cultivos de la especie a mayor escala de una manera más económica. Este medio fue preparado con agua de mar de Bahía Blanca, enriquecida con un biofertilizante líquido marca Bayfolan® 11-8-6 (N-P-K) (Bayer CropScience) y llamado en esta Tesis, medio de cultivo BAY.

2.3.1. Filtración y esterilización del agua de mar

Para la preparación de los medios f/2 y Bay se utilizó agua de mar colectada de la zona interna del Canal Principal del estuario de Bahía Blanca, mediante embarcación, por personal del Club de Pesca de General Daniel Cerri, Bahía Blanca. El agua fue transportada al CERZOS y almacenada en una cámara fría (4°C) durante un mínimo de 2 meses, para lograr su envejecimiento. Luego, el

agua fue filtrada por un sistema de filtros en cadena, con porosidad decreciente hasta 1 μm y almacenada en una cámara fría. Antes de iniciar cada ensayo, se filtró un volumen determinado de agua de mar, previamente filtrada a 1 μm , a través de un filtro de nitrato de celulosa de 0,45 μm de poro (Gamafil SA), con el objetivo de eliminar el material más fino. El agua filtrada se colocó en botellas de vidrio, bidones de vidrio o Erlenmeyers, previamente acondicionados como se especifica en la Sección 2.2 y se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión y 120°C durante 15 minutos.

2.3.2. Preparación del medio de cultivo f/2

El medio de cultivo f/2 se preparó a partir de agua de mar filtrada y estéril, a la que se incorporó distintos macro y micronutrientes, vitaminas y buffer Tris de acuerdo con McLachlan (1973). Por cada litro de agua de mar, los nutrientes se agregaron por filtración empleando filtros estériles de acetato de celulosa Whatman de 0,2 μm de poro, de acuerdo con las concentraciones detalladas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Medio de cultivo f/2. Composición y concentración final de los componentes del medio.

Nutrientes	Solución Madre	Volumen Incorporado <i>ml de solución madre</i> <i>L de agua de mar</i>	Concentración Final	Concentración Final
Macronutrientes				
NaNO ₃	75 g.L dH ₂ O ⁻¹	→ 1	75 mg.L H ₂ O ⁻¹	882,456 μM
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	5 g.L dH ₂ O ⁻¹	→ 1	5 mg.L H ₂ O ⁻¹	36,229 μM
NaSiO ₃ •9H ₂ O	30 g.L dH ₂ O ⁻¹	→ 1	30 mg.L H ₂ O ⁻¹	105,56 μM
Solución de Metales Traza (Micronutrientes):				
CuSO ₄ •5H ₂ O	(9,8 g.L dH ₂ O ⁻¹)	1	0,01 mg.L H ₂ O ⁻¹	0,04 μM
ZnSO ₄ •7H ₂ O	(22 g.L dH ₂ O ⁻¹)		0,022 mg.L H ₂ O ⁻¹	0,08 μM
CoCl ₂ •6H ₂ O	(10 g.L dH ₂ O ⁻¹)		0,01 mg.L H ₂ O ⁻¹	0,04 μM
MnCl ₂ •4H ₂ O	(180 g.L dH ₂ O ⁻¹)		0,18 mg.L H ₂ O ⁻¹	0,9 μM
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	(6,3 g.L dH ₂ O ⁻¹)		0,006 mg.L H ₂ O ⁻¹	0,03 μM
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	5 g.L dH ₂ O ⁻¹		5 mg.L H ₂ O ⁻¹	11,7 μM
Solución de Vitaminas:				
B12	(1 g.L dH ₂ O ⁻¹)	0,5	0,5 $\mu\text{g.L H}_2\text{O}^{-1}$	
Biotina	(0,1 g.L dH ₂ O ⁻¹)		0,5 $\mu\text{g.L H}_2\text{O}^{-1}$	
Tiamina HCl (B1-HCl)	(250 g.L dH ₂ O ⁻¹)		0,1 $\mu\text{g.L H}_2\text{O}^{-1}$	
TRIS	250 g.L dH ₂ O ⁻¹	→ 5	250 mg.L H ₂ O ⁻¹	

2.3.3. Preparación del medio de cultivo BAY

El medio de cultivo BAY se preparó a partir de agua de mar filtrada y estéril, a la que se le incorporó por filtración (Filtros estériles Whatman de 0,2 µm de poro) 0,28 ml de biofertilizante líquido Bayfolan® 11-8-6 (N-P-K) (Bayer CropScience) y metasilicato de sodio (NaSiO₃), de acuerdo con las concentraciones necesarias para cada objetivo específico (ver Capítulos 3 y 4).

2.4. Determinación de la densidad celular y de la velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento de *H. coffeaeformis* se determinó a partir de datos de densidad celular a lo largo del tiempo (Guillard 1973). Los recuentos celulares se realizaron diariamente por duplicado con una cámara tipo Sedgwick-Rafter (volumen: 1mL) a partir de alícuotas de 1mL por duplicado. Para el cálculo de la velocidad de crecimiento (k) (divisiones por día; $\text{div} \cdot \text{d}^{-1}$) se seleccionaron las densidades celulares ($N = \text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$) correspondientes a la fase de crecimiento exponencial. Estas densidades, transformadas logarítmicamente ($Y = \log N$), se trataron por el método de mínimos cuadrados con el fin de hallar la regresión de Y en función del tiempo (t), siendo la pendiente de la recta la constante de crecimiento (K_{10}). A partir de este último valor, se calculó la velocidad de crecimiento (k) como:

$$k (\text{divisiones} \cdot \text{día}^{-1}) = 3,322 \times K_{10} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

en donde el valor 3,322 representa el factor de conversión de \log_{10} a \log_2 .

Los cálculos se realizaron utilizando Microsoft Excel 2019.

2.5. Determinación del peso seco y del peso seco libre se cenizas

2.5.1. Determinación del peso seco

La biomasa microalgal fue estimada a partir del peso seco (PS). Para ello se filtraron muestras de entre 10 y 20 mL por duplicado, a través de filtros de fibra de vidrio previamente secados en estufa a 60°C por 2h y pesados (Whatman

GF/F) (Fig. 2.1), mediante el uso de una bomba de vacío (Marca: Czerwent). Los filtros con el material retenido fueron lavados con 10 mL de agua destilada para eliminar las sales. Luego se secaron en estufa a 60 °C durante 24 horas, se enfriaron en un desecador y finalmente se pesaron. El proceso de secado se repitió hasta alcanzar un peso constante y se dividió por el volumen de la muestra (Peso seco [PS]: g.L⁻¹). Para las mediciones se usó una balanza analítica a la cuarta cifra decimal (Marca: Kern).



Figura 2.1. Filtros conteniendo células retenidas luego del proceso de filtración al vacío.

2.5.2. Determinación del peso seco libre se cenizas

Se centrifugaron muestras de cultivo (10 minutos a 3600 g), se descartó el sobrenadante y se obtuvieron los pellets de biomasa. Los pellets se lavaron con un *buffer* de NaCl al 0,9 % (pH 7) y se centrifugaron durante 10 minutos a 800 g a 10 °C. Se descartó el sobrenadante y se conservaron las muestras de biomasa. Las muestras de biomasa fueron secadas a 100°C hasta llegar a valores de peso constante. Fueron enfriadas en un desecador y pesadas para obtener el peso seco (PS). A continuación, las muestras se quemaron en un horno de mufla a 450 °C durante 8 horas, se enfriaron en un desecador y se pesaron. La diferencia entre el PS de las muestras y el peso de las muestras calcinadas es conocido

como el peso seco libre de cenizas (PSLC). Los pesajes fueron realizados en balanza analítica a la cuarta cifra decimal (Marca: Kern).

2.6. Determinación de la cinética de fluorescencia de la clorofila-a y Rojo Nilo

2.6.1. Detección de la intensidad de fluorescencia de la clorofila-a

La cinética de la autofluorescencia de la clorofila-a (IF-Cl_a) se utilizó como un indicador del crecimiento celular y estado fisiológico del cultivo. Para ello, se tomaron diariamente muestras de 5 mL por duplicado de cultivos homogeneizados. La muestra se sonicó en un ultrasonido Branson 5 durante 3 segundos, con el fin de disgregar cúmulos de células. La IF-Cl_a se midió con un espectrofluorómetro (Shimadzu RF-5301PC) y se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.). La longitud de onda de excitación se fijó en 430 nm y la longitud de onda de emisión se escaneó de 600 a 750 nm (modo espectro con rendijas de excitación y emisión fijadas en 5 nm). Se seleccionó la longitud de onda de emisión máxima en 680 ± 5 nm.

2.6.2. Detección de la intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo

El Rojo Nilo (RN) es un fluoróforo usado para detectar lípidos neutros (LN). Así, en esta Tesis, la cinética de la intensidad de fluorescencia del RN fue usada como un indicador de la acumulación de LN en cultivos de *H. coffeaeformis*. Para ello, se tomaron muestras de cultivo de 5 mL por duplicado, en forma diaria, a las cuales se les agregó 5 μ L de RN [(9-dietilamino-5H-benzo (α) fenoxazina-5-ona] en acetona (1 mg.mL^{-1}). Las muestras se sonicaron en un ultrasonido Branson 5 durante 3 segundos, con el fin de disgregar cúmulos de células. Después de 5 minutos, se midió la intensidad de fluorescencia del RN (IF-RN) utilizando un espectrofluorómetro (RF-5301PC Shimadzu), con una longitud de onda de excitación de 480 nm. Los picos de fluorescencia se detectaron en el espectro de emisión entre 450 y 750 nm. El pico principal se detectó a 577 ± 5 nm, que corresponde al espectro de emisión de lípidos neutros (Mendoza-

Guzmán *et al.* 2008). La IF-RN se midió en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.).

2.6.3. Relación entre el Rojo Nilo y la clorofila-a

La cinética de la relación entre la IF-RN y la IF-Cla (IF-RN:IF-Cla) fue usada como un indicador del desbalance entre la acumulación de LN y el crecimiento de acuerdo con Bongiovani *et al.* (2013). En particular, valores de IF-RN:IF-Cla ≥ 40 fueron considerados como característicos de una etapa en donde la acumulación de LN superó significativamente a la etapa de crecimiento y consecuentemente, fue usado como un criterio para determinar el período de cosecha.

2.7. Extracción de lípidos totales, fraccionamiento y caracterización del perfil de ácidos grasos

El análisis lipídico abarcó tres etapas: 1) la extracción de los lípidos totales (LT); 2) el fraccionamiento de los LT en lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL); y 3) la metilación y caracterización del perfil de los ácidos grasos en la fracción neutra y polar (sumatoria de GL y FL).

2.7.1. Extracción de lípidos totales

La extracción de LT se llevó a cabo siguiendo el protocolo modificado de Folch (1957), asistido por ultrasonido de acuerdo con Popovich *et al.* (2012). La biomasa cosechada, fue lavada con una solución buffer de NaCl al 0,9% y liofilizada durante 48 horas a una temperatura de entre -40 y -50°C y una presión de 0,0097 mm Hg con un liofilizador Rificor modelo L-A-B3-C. Muestras de aproximadamente 200 mg de biomasa liofilizada se colocaron en tubos de centrífuga de vidrio (Fig. 2.2 A) con 4 mL de cloroformo:metanol (2:1, v:v) (Fig. 2.2 B), se agitaron en un vórtex por unos segundos (Fig. 2.2 C) y se sonicaron utilizando un baño de ultrasonidos (Brandsonic 220) durante 15 minutos a temperatura ambiente (Fig. 2.2 D). Luego, el material se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos (centrífuga Rolco 2070) (Fig. 2.2 E). El sobrenadante, compuesto por solventes y lípidos (Fig. 2.2 J-L), fue separado del pellet (Fig. 2.2 J-M), filtrado (Fig. 2.2 F) y colocado en una ampolla de decantación (Fig. 2.2 F-H). Estos pasos

se repitieron 4 veces hasta que el pellet mostró una apariencia blanquecina (Fig. 2.2 M). Al extracto total se le agregaron 4 mL de NaCl 0,9%, y se lo agitó para la obtención de un sistema bifásico (Fig. 2.2 I). El sistema se mantuvo en reposo 30 minutos. Luego se descartó la fase superior, se volvieron a agregar 4 mL de NaCl 0,9% y se volvió a agitar para formar nuevamente un sistema bifásico. El sistema se mantuvo en reposo durante un mínimo de dos horas. La fase superior fue descartada nuevamente, y la fracción inferior fue recuperada en viales acondicionados. Luego se utilizó Na_2SO_4 anhidro para retener el contenido acuoso que pudiera haber quedado en la fracción inferior. La fracción inferior fue filtrada nuevamente, para eliminar el Na_2SO_4 . y almacenada en frascos color caramelo (Fig. 2.2 N). Por último, las muestras fueron secadas bajo corriente de N_2 (Fig. 2.2 Ñ y O). El contenido lipídico se determinó gravimétricamente y las muestras fueron selladas en los frascos con *parafilm* y almacenadas a -18°C .

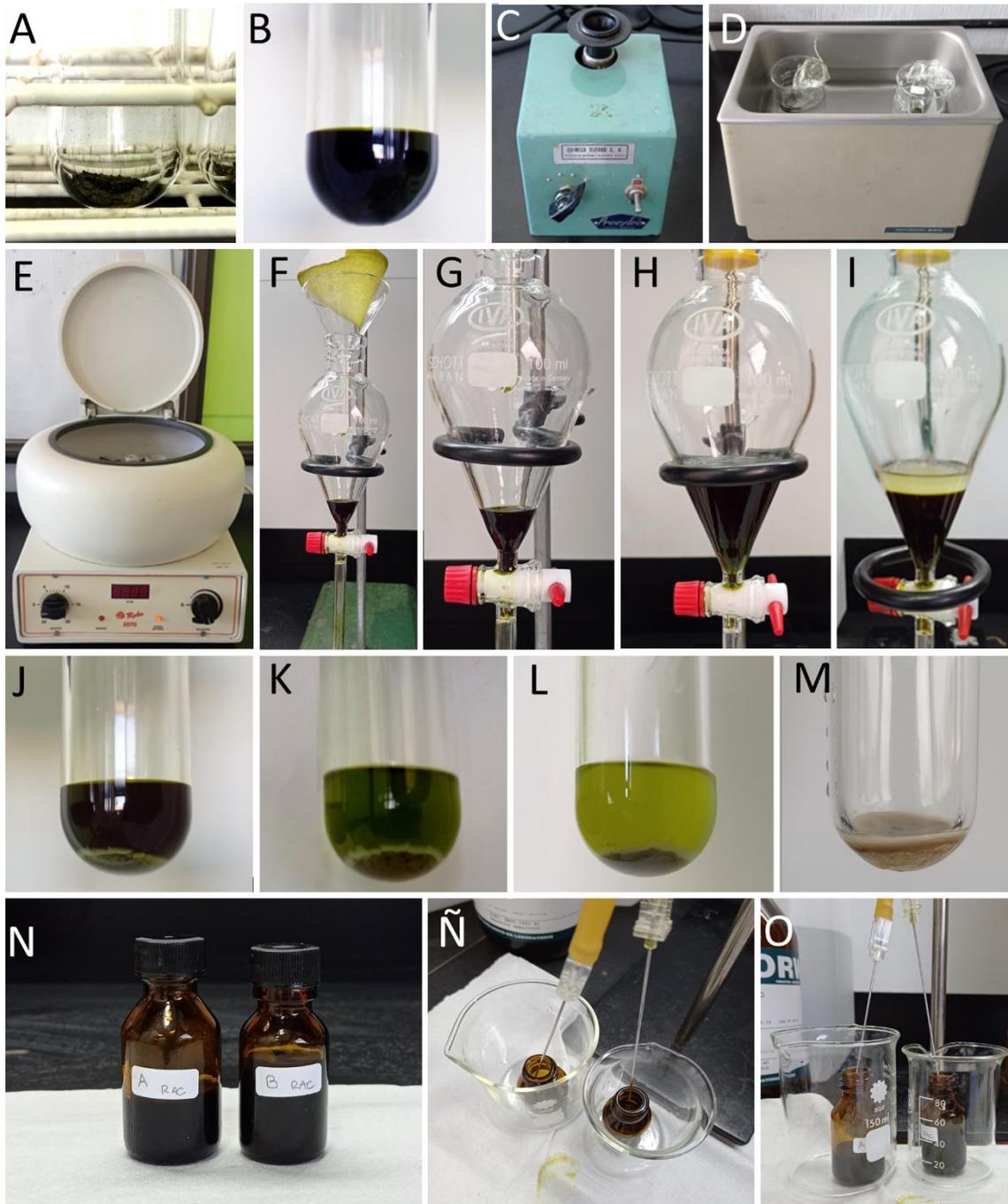


Figura 2.2. Extracción de lípidos totales por el método de Folch (1957), asistido con ultrasonido. **A.** Biomasa liofilizada. **B.** Biomasa suspendida en cloroformo:metanol. **C.** Vórtex. **D.** Sonicado de la muestra. **E.** Centrifugado de la muestra. **F.** Filtrado de la muestra y colocado en ampolla de decantación. **G.** Primer filtrado en ampolla de decantación. **H.** Cuarto filtrado en ampolla de decantación. **I.** Formación de fases lipídica e hídrica con buffer de NaCl (0,9%). **J-L** Sobrenadante y pellet luego de: **J.** la primera; **K.** la segunda y **L.** la cuarta centrifugación. **M.** Pellet residual. **N.** Fracción inferior lipídica almacenada en frascos color caramelo. **Ñ y O.** Secado de muestras con nitrógeno.

2.7.2. Fraccionamiento

El fraccionamiento de los LT en lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) se realizó por duplicado utilizando cartuchos de sílica Sep-Pack (SP) de 1000 mg (J. T. Baker Inc., Phillipsburg, N.J.), de acuerdo a Popovich *et al.* (2012). Después de acondicionar los cartuchos de sílica con 30 mL de cloroformo (Fig. 2.3 A), se disolvieron aproximadamente 20 mg de LT en 1 mL de cloroformo (Fig. 2.3 B) y se cargaron en el cartucho (Fig. 2.3 C). Para la recuperación de los LN, GL y FL, se realizaron las siguientes eluciones de manera secuencial: (a) 15 mL de una solución de cloroformo/ácido acético (9:1, v/v) (Fig 2.3 D); (b) 20 mL de una solución de acetona/metanol (9:1, v/v) (Fig 2.3 E) y (c) 20 mL de metanol (Fig 2.3 F). Las fracciones, de LN (Fig. 2.3 G), GL (Fig. 2.3 H) y FL (Fig. 2.3 I), se recogieron, disueltas en sus respectivos solventes, en viales cónicos previamente pesados (Fig 2.3 G -I) y se evaporaron hasta sequedad bajo un flujo de nitrógeno. Por último, los viales fueron pesados nuevamente con balanza analítica (Marca: Kern) a la cuarta cifra decimal. De acuerdo con Hegel *et al.* (2019), los TAG son la principal fuente de ácidos grasos en los lípidos neutros de la cepa estudiada.

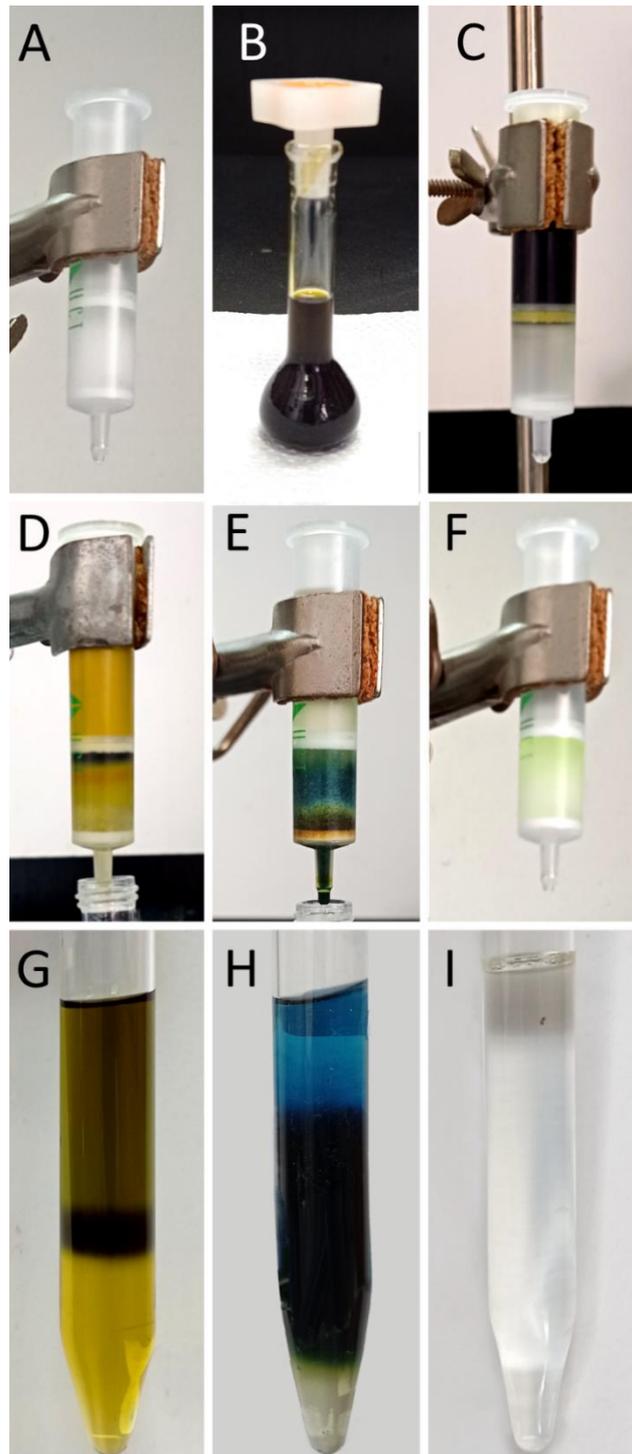


Figura 2.3. Fraccionamiento de lípidos totales en lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos **A.** Acondicionamiento de cartucho de sílica con cloroformo. **B.** Solución de muestra de LT en cloroformo **C.** Carga de muestra en cartucho de sílica. **D.** Elución de LN con una solución de cloroformo/ácido acético. **E.** Elución de GL con una solución de acetona/metanol. **F.** Elución de FL con metanol. **G.** Recuperación de LN en una solución de cloroformo/ácido acético. **H.** Recuperación de GL en una solución de acetona/metanol. **I.** Recuperación de FL en metanol.

2.7.3. Determinación del perfil de ácidos grasos

Los extractos lipídicos obtenidos del fraccionamiento (LN y Lípidos polares [LP: suma de GL y FL]) fueron transmetilados, de acuerdo al protocolo descrito por Morrison & Smith (1964). Como resultado se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAGs o FAME, por sus siglas en inglés: Fatty Acid Methyl Esters) que posteriormente fueron analizados por cromatografía gaseosa. A cada uno de los viales que contenían las fracciones lipídicas (LN y LP), se les agregó 2 mL de una solución de KOH:metanol (10 % p/v) y se agitó vigorosamente en un vórtex por 1 minuto. Los viales fueron purgados con un flujo de nitrógeno, y llevados a un baño de agua a 80°C durante 45 minutos. Luego de enfriar a temperatura ambiente, se agregó a cada uno de los frascos 2 mL de éter de petróleo, se agitó en un vórtex. La fase superior se descartó mediante el empleo de pipeta Pasteur y la fase inferior se recuperó. Este procedimiento se repitió dos veces. Se colocaron los frascos en un baño frío y se agregó 0,5 mL de HCl concentrado y 2 mL de éter de petróleo a cada uno de los extractos, se agitó vigorosamente en vórtex durante 1 minuto y se recuperaron los ácidos grasos de la fase superior. Este procedimiento se repitió dos veces. Los extractos de éter de cada fracción se secaron con un flujo de nitrógeno. Se agregó en cada frasco 1.5 mL de una solución de trifluoruro de boro (BF₃, Sigma Aldrich) disuelto en metanol al 10% v/v, se agitó vigorosamente en un vórtex por 1 minuto y se llevó a corriente de nitrógeno durante un minuto aproximadamente para purgar el aire. Los frascos se llevaron a un baño de agua a 80 °C durante 30 minutos. Luego de enfriar los frascos a temperatura ambiente, se agregó en cada uno 2 mL de éter de petróleo, se agitaron con vórtex y con pipeta Pasteur, se recuperó la fase superior conteniendo los ésteres metilados. Los FAME fueron separados en tubos de ensayo acondicionados. Este procedimiento se repitió dos veces. Cuando los extractos no fueron transparentes, se agregó Na₂SO₄ anhidro y se filtró para eliminar residuos de agua. Por último, se evaporó hasta sequedad con un flujo de nitrógeno. Finalmente, se agregó hexano (grado de cromatografía) hasta un volumen acorde a la concentración de FAME.

Los FAME se analizaron con un cromatógrafo de gases HP Agilent 4890D, equipado con un detector de ionización de llama a una temperatura de 260 °C,

un inyector de división/división de flujo (175 °C) y una columna capilar SP–2560 (100 m, 0,25 mm y 0,2 µm; Supelco Inc., Bellefonte, PA). El gas portador fue hidrógeno de alta pureza a 18 cm/s. El horno GC se mantuvo inicialmente a 140 °C durante 5 min. Luego, la temperatura se incrementó a 4 °C/min hasta 240 °C y se mantuvo isoterma durante 15 min. El límite de detección del método cromatográfico se estableció en 0,01 %. Se utilizó el software HP 3398A GC Chemstation (Hewlett Packard 1998) para el análisis cromatográfico. La identificación de los FAME se realizó mediante comparación con material estándar certificado, Supelco FAME 10 mix 37 (Bellefonte, USA), de acuerdo con el Método Oficial AOCS Ce 1b-89 (Popovich *et al.* 2012a). Se realizaron dos réplicas de cada análisis de FAME. Todos los solventes utilizados fueron de grado analítico.

Capítulo 3 – Evaluación del efecto de la temperatura, la salinidad y la relación Si:N sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos neutros en *Halamphora coffeaeformis*

3.1. Introducción

La generación de energías renovables, ecológicas y rentables es un aspecto prioritario dentro de los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, adoptada por Naciones Unidas en 2015 a escala global como también por la Comisión Nacional Interinstitucional de Implementación y Seguimiento de los ODS (https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe_pais_baja.pdf), implementada por la República Argentina (Decreto No. 499-2017 de Argentina). En el caso particular del biodiésel, los aceites comerciales usados para su producción compiten con industrias alimentarias, por lo que las empresas bioenergéticas trabajan en la selección de aceites alternativos que sean sustentables y permitan reducir las emisiones de CO₂ y SO_x (Hsieh & Felby 2017; Zhou *et al.* 2020). Como se ha comentado, algunas especies de microalgas oleaginosas parecen ser una fuente prometedora de aceites para biodiésel, debido a sus altas tasas fotosintéticas y sus altos contenidos de lípidos neutros, en particular triglicéridos (TAG), necesarios para la producción de este biocombustible (Hu *et al.* 2008; Chandama *et al.* 2021; Andeden *et al.* 2021). Sin embargo, la producción de biomasa microalgal aún requiere de estrategias sustentables para lograr procesos rentables a escala industrial. Por ejemplo, los cultivos de microalgas en agua de mar (Arora *et al.* 2019) o efluentes residuales, se presentan como posibles alternativas para reducir los costos y huellas hídricas, al no competir con agua para consumo humano. El uso de biofertilizantes, para aportar macro y micronutrientes al cultivo, es otra estrategia para promover la producción de biomasa de una manera sostenible (Koley *et al.* 2019; Fernández-Linares *et al.* 2019). Por su parte, los cultivos bioenergéticos a base de microalgas bajo un contexto de biorrefinerías, aseguran la obtención de co-productos o residuos de valor agregado, que aumentan la rentabilidad del proceso.

Las diatomeas son microalgas fotosintéticas unicelulares de gran interés debido a su capacidad de almacenar naturalmente altos contenidos de TAG (Levitan *et al.* 2014). Además, existe una gran diversidad de diatomeas marinas y algunas especies son tolerantes a las aguas residuales (Datta *et al.* 2019). Es importante también destacar, que el biodiésel analizado a partir de aceites de diatomeas, ha mostrado propiedades que cumplen con los estándares internacionales de calidad (ASTM D6751-08 y EN 14214) (Jayakumar *et al.* 2021; Hegel *et al.* 2019). Sin embargo, para que estas ventajas puedan ser canalizadas a nivel comercial, aun se requieren estudios relacionados con la selección de especies de diatomeas oleaginosas y su grado de tolerancia a las condiciones ambientales. Esta información es necesaria para diseñar estrategias de cultivos masivos a cielo abierto, para responder a las condiciones climáticas del sitio de emplazamiento y dar el salto de escala necesario para un nivel comercial (Correa *et al.* 2019).

Durante décadas, las diatomeas han sido cultivadas en sistemas de cultivo a cielo abierto con fines alimenticios para acuicultura, debido a su riqueza en ácidos grasos esenciales omega 3 y 6 (Hildebrand *et al.* 2014). Sin embargo, el estado de arte de cultivos de diatomeas con fines bioenergéticos no es tan bien conocido (Matsumoto *et al.* 2017; Kannan & Venkat 2018; Indrayani *et al.* 2019) o bien, las empresas que los desarrollan se encuentran bajo compromisos de confidencialidad. Para lograr los rendimientos de aceites necesarios para la transesterificación, se debe lograr una optimización de la producción de biomasa y de TAG. Sin embargo, estos procesos no ocurren en forma simultánea, dado que los factores que promueven el crecimiento difieren de aquellos que estimulan la producción de TAG. En diatomeas, los TAG representan sustancias de reserva que se acumulan en el citoplasma a medida que las condiciones desfavorables aumentan. Por lo tanto, para lograr un adecuado rendimiento de biomasa rica en TAG, es necesario conocer qué factores estimulan cada proceso y cuál es el grado de tolerancia de la especie seleccionada (Suparmaiam *et al.* 2023)

Algunos de los principales factores ambientales que afectan la producción de biomasa en diatomeas son: la luz, temperatura, salinidad y disponibilidad de nitrógeno (N), fósforo (P) y silicatos (Si) (Yu *et al.* 2018; Borowitzka 2013; Borowitzka 2016). En particular, los silicatos están involucrados en la formación

de las paredes celulares o frústulos de las diatomeas (Korsunsky *et al.* 2020). Una adecuada disponibilidad de nutrientes, indicada por una relación de Si:N:P de 16:16:1 de acuerdo con Redfield (1958) y Brzezinski (1985) (Xu *et al.* 2009), en combinación con una adecuada intensidad de luz y temperatura, influye en la velocidad de crecimiento y producción de biomasa (Suparmaiam *et al.* 2023). Por su parte, la salinidad afecta los procesos de regulación osmótica y homeostasis de las células (Steele *et al.* 2014; Bussard *et al.* 2016). Por el contrario, el déficit de nutrientes, indicado por concentraciones de N <1,6 μ M, P <1,2 μ M y Si <3,9 μ M. de acuerdo a Sarthou *et al.* (2005), y de salinidades sub-óptimas (Ishika *et al.* 2018; Indrayani *et al.* 2019), pueden actuar como estresores, estimulando la producción de TAG ricos en ácidos grasos saturados (AGS) y monoinsaturados (AGMI) (Popovich *et al.* 2012a; Martín *et al.* 2016; Barnech Bielsa *et al.* 2016). Las fases de crecimiento también pueden influir en la calidad y cantidad de lípidos en diatomeas; por ejemplo, la producción de lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) suele asociarse con la fase exponencial de crecimiento, cuando la disponibilidad de nutrientes y de luz es adecuada (Artamonova *et al.* 2017); mientras que los TAG suelen acumularse durante la fase estacionaria, en respuesta a la deficiencia nutricional y/o envejecimiento celular (Popovich *et al.* 2012a; Zulu *et al.* 2018). Además, se debe considerar que la velocidad de crecimiento y la acumulación lipídica varían a nivel específico y de cepas (Singh *et al.* 2016).

Una adecuada productividad de lípidos ricos en TAG es un requisito necesario para lograr buenos rendimientos en la producción de biodiésel (Griffiths & Harrison *et al.* 2009; Doan *et al.* 2011), dado que los TAG son los únicos fácilmente convertibles a biodiésel (Nascimento *et al.* 2012). Esta productividad lipídica se logra con una combinación adecuada entre la productividad de biomasa y el contenido de lípidos que posee esa biomasa (Doan *et al.* 2011). Es importante que los lípidos utilizados como materia prima tengan un porcentaje bajo de lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos), dado que éstos reducen el rendimiento en la formación de ésteres de ácidos grasos durante la transesterificación (Iyer 2016; Morales *et al.* 2021). Además, la calidad del biodiésel es un reflejo del perfil de ácidos grasos encontrados en los TAG (Knothe *et al.* 2008; Hoekman *et al.* 2012; Talebi *et al.* 2013). Los AGMI y los

AGS son los más deseables para la producción de biodiésel, dado que garantizan una mejor calidad debido a que optimizan propiedades como el número de cetano, la viscosidad cinemática y el valor calorífico superior, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son los menos deseables, dado que disminuyen la estabilidad oxidativa de este biocombustible (Hoekman *et al.* 2012; Stansell *et al.* 2011). Así, un conocimiento profundo de cómo los factores ambientales afectan el crecimiento, cantidad y calidad de los lípidos en una especie seleccionada, es esencial para diseñar las estrategias de sus cultivos a cielo abierto y para evaluar el potencial de esta cepa como materia prima para la producción de aceites para biodiésel.

Para el desarrollo de cultivos bioenergético a base de agua de mar, el uso de especies euritolerantes, capaces de crecer y sobrevivir dentro de amplios rangos ambientales, en particular de salinidad, es importante a la hora de una bioprospección. La diatomea estuarina y bentónica *H. coffeaeformis*, aislada del estuario de Bahía Blanca, en la costa sudoeste de la costa bonaerense, ha sido previamente cultivada en piletas tipo *raceway* bajo condiciones controladas (*indoor*), con un medio de cultivo convencional (f/2), con el fin de evaluar su potencial para producir lípidos para biodiésel (Martín *et al.* 2016; 2018). Estos estudios han demostrado la capacidad de la especie para acumular LN en la fase estacionaria tardía en forma natural. Además, Hegel *et al.* (2019) informaron sobre la producción de biodiésel a partir de esta misma cepa argentina, mediante extracción con etanol y posterior transesterificación supercrítica con rendimientos de ésteres de ácidos grasos de un 80% con respecto a los LN, elevado número de cetano (>54), alto poder calorífico (40 Mj/kg) y con un punto nube relativamente bajo (-4,6 °C). Estos avances son un estímulo para la continuidad de los estudios con miras a estandarizar cultivos de la especie a cielo abierto (*outdoor*). Bajo este escenario, en este capítulo se analizará el rango de tolerancia de *H. coffeaeformis* a la temperatura y salinidad; y el efecto que tiene la salinidad en la cantidad y calidad lipídica de la especie, con especial énfasis en la acumulación de TAG. El rango de tolerancia de una especie microalgal, es un intervalo referido a distintas condiciones ambientales, dentro del cual la población puede sobrevivir y reproducirse (Begon *et al.* 2006). Dentro de este intervalo, se encuentran las condiciones óptimas que maximizan la velocidad de

crecimiento (k). Esta variable se utiliza convencionalmente para establecer los rangos ambientales de una especie, dado que k generalmente disminuye a cero en los límites superiores e inferiores del intervalo. También se analizarán distintas concentraciones de silicatos junto con el biofertilizante Bayfolan®, con el fin de evaluar su efecto sobre el crecimiento y acumulación de lípidos neutros en la especie estudiada. Trabajos previos han demostrado que el uso de este biofertilizante con una relación Si:N en la proporción 1:1 no fue efectivo para estimular la producción de lípidos neutros en *H. coffeaeformis* (Popovich *et al.* 2020).

De acuerdo con este escenario, el objetivo general del presente capítulo fue evaluar el efecto de las condiciones de salinidad, temperatura y relación Si:N sobre el crecimiento, cantidad y calidad de lípidos en cultivos de *H. coffeaeformis*, bajo condiciones controladas de laboratorio, con el fin de sentar las bases para el escalado y desarrollo de cultivos de la especie a cielo abierto.

Los objetivos del presente capítulo fueron: 1) Evaluar el efecto de la salinidad y la temperatura sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos neutros en cultivos de *H. coffeaeformis* a escala de laboratorio. 2) Analizar el efecto de la salinidad sobre el contenido de lípidos totales, fracciones y clases lipídicas, y perfil de ácidos grasos. 3) Determinar el efecto de la salinidad y la relación Si:N sobre el crecimiento y acumulación de LN, utilizando un medio de cultivo alternativo y más económico. Los rangos experimentales de temperatura fueron seleccionados de acuerdo con las variaciones promedio de temperatura del clima de la región de Bahía Blanca y la salinidad fue ajustada de acuerdo a rangos de salinidad típicos del estuario de Bahía Blanca, en donde la especie fue aislada.

Resumen: Se realizaron cultivos de *H. coffeaeformis* a escala de laboratorio, con el fin de evaluar los efectos de la temperatura, la salinidad y la relación Si:N sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos neutros de esta especie. Se realizaron muestreos diarios para determinar la densidad celular, la velocidad de crecimiento (k), la cinética de la clorofila-a y la acumulación de los lípidos neutros *in vivo*. Además, se evaluó el efecto de la salinidad sobre la cantidad y calidad de los lípidos. Las hipótesis de trabajo consideradas en este capítulo fueron que: *el estudio de la temperatura y la salinidad permiten determinar condiciones*

óptimas para el crecimiento de la especie; la salinidad es un estresor que afecta la acumulación, cantidad y calidad de los lípidos neutros; la relación Si:N afecta el crecimiento y acumulación de lípidos neutros.

Parte de los resultados que componen el siguiente capítulo fueron publicados en:

-Navarro, F.E., Damiani, M.C., Leonardi, P.I., Popovich C.A. Temperature and salinity effect on tolerance and lipid accumulation in *Halamphora coffeaeformis*: an approach for outdoor bioenergy cultures. *Bioenerg. Res.* 15, 1545–1554 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10349-2>

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento (k) de *H. coffeaeformis* se seleccionaron las siguientes temperaturas: 5 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C y 30 °C [± 0.5 °C]. El rango de temperatura fue seleccionado de acuerdo a la variabilidad térmica de la región de Bahía Blanca entre 2009 y 2019. El conjunto de datos de temperatura utilizado se recopiló de la Estación Meteorológica ubicada en el campus del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (<https://meteobahia.com.ar>, CERZOS-CONICET).

Previamente al inicio de cada ensayo, se adaptaron los cultivos a las diferentes temperaturas. Para ello, cultivos *stock* fueron separados, transferidos a tubos de ensayo con medio f/2 y sometidos a las distintas temperaturas durante 2 o 3 generaciones. Una vez alcanzado el período de adaptación, se inició el escalado para la realización de los ensayos. Los ensayos se realizaron en Erlenmeyers estériles de 250 mL y con 150 mL de medio f/2 con una salinidad de 33‰ (Fig. 3.1). La densidad inicial fue $10\text{-}20 \times 10^3$ células mL⁻¹ y las condiciones ambientales fueron: 40 $\mu\text{mol-fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de PAR y un fotoperíodo de 12 h:12 h luz:oscuridad, en una cámara de cultivo. Los cultivos fueron mezclados manualmente dos veces al día. Todos los tratamientos se llevaron a cabo de forma independiente y por duplicado. La duración de los cultivos fue de 7 días, tiempo suficiente para estimar la velocidad de crecimiento de la especie. La determinación de la densidad celular y de la velocidad de crecimiento se realizó de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.4 del Capítulo 2.

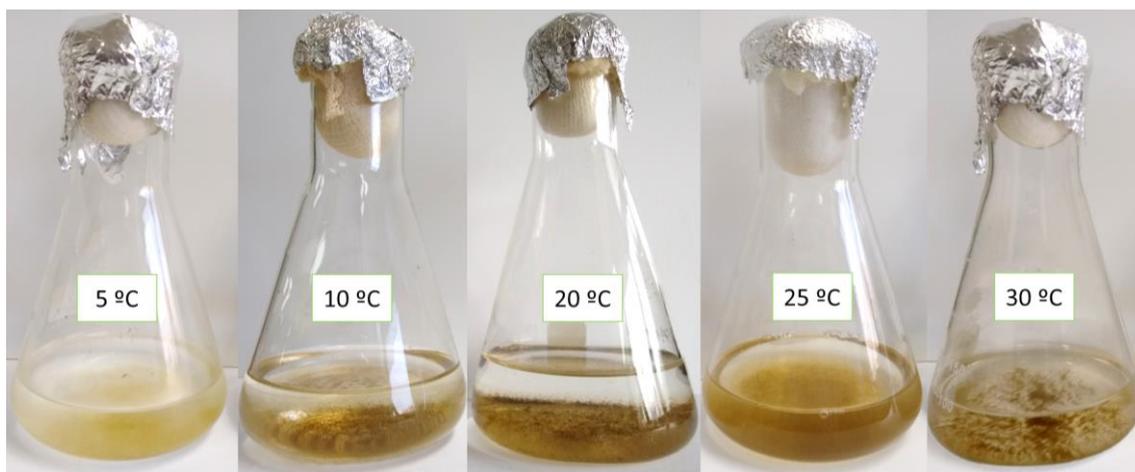


Figura 3.1. Cultivos de *H. coffeaeformis* llevados a cabo en Erlenmeyers de 250 mL y con 150 mL de medio f/2 a una salinidad de 33 ‰ y a diferentes temperaturas (5 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C y 30 °C).

3.2.2. Efecto de la salinidad sobre la velocidad de crecimiento

Para evaluar el efecto de la salinidad sobre la velocidad de crecimiento (k) de *H. coffeaeformis* se seleccionaron las siguientes salinidades: 0‰, 5‰, 20‰, 25‰, 35‰, 45‰, 60‰ y 95‰. Este rango de salinidades fue seleccionado con el fin de cubrir un amplio espectro de variación salina. Las diferentes salinidades se lograron mediante la adición de agua destilada o NaCl a agua de mar envejecida del EBB, con el fin de disminuir o aumentar la salinidad típica (33‰). Los cultivos fueron adaptados a las diferentes salinidades previamente al inicio de los ensayos. Para ello, cultivos *stock* fueron separados y transferidos a tubos de ensayo con medio f/2 a diferentes salinidades durante 2 o 3 generaciones. Los ensayos se realizaron en Erlenmeyers estériles de 250 mL y con 150 mL de medio f/2 con las salinidades correspondientes (Fig. 3.2). La densidad inicial fue $10\text{-}20 \times 10^3$ células mL^{-1} y las condiciones ambientales fueron: $40 \mu\text{mol-fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR y un fotoperíodo de 12 h:12 h luz:oscuridad., en una cámara de cultivo. Los cultivos fueron mezclados manualmente dos veces al día. Todos los tratamientos se llevaron a cabo de forma independiente y por duplicado. La duración de los cultivos fue de 7 días, tiempo suficiente para estimar la velocidad de crecimiento de la especie. La determinación de la densidad celular y de la velocidad de crecimiento se realizó de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.4 del Capítulo 2.



Figura 3.2. Cultivos de *H. coffeaeformis* llevados a cabo en Erlenmeyers de 250 mL y con 150 mL de medio f/2 a 20 °C y a diferentes salinidades (0‰, 5‰, 20‰, 25‰, 35‰, 45‰, 60‰ y 95‰).

3.2.3. Efecto de la salinidad sobre la acumulación, cantidad y calidad lipídica de la especie

Se evaluó el efecto de la salinidad sobre: a) la acumulación de lípidos neutros (cinética del Rojo Nilo), b) el contenido de lípidos totales y c) la calidad de los lípidos en la biomasa obtenida de *H. coffeaeformis*, a 33‰ (como control), 20 ‰ y 45‰ (como tratamientos). El valor de salinidad del control se seleccionó de acuerdo a la salinidad típica del EBB. Los valores de salinidad de los tratamientos se seleccionaron como posibles variaciones ocurridas durante el transcurso de un cultivo a cielo abierto iniciado con agua de mar a 33‰, como consecuencia de eventos de precipitación o procesos de evaporación, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo en botellones transparentes de 5 L (altura 20 cm, diámetro 18 cm) con 4 L de medio f/2 para producir suficiente biomasa para el análisis lipídico (Fig. 3.3). Los cultivos se realizaron a 20 °C \pm 0,5 °C, 60 $\mu\text{mol-fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 12 h:12 h luz:oscuridad y bajo aireación continua en una cámara de crecimiento. Para estos experimentos, se seleccionó una temperatura de 20 °C, temperatura a la cual la especie presentó su mayor valor promedio de *k*. Los cultivos se llevaron a cabo durante 17 días para alcanzar una fase estacionaria tardía y una adecuada producción de lípidos.

La cinética de la intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo (RN) se realizó de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.6.2. del Capítulo 2.

La extracción de lípidos totales para el fraccionamiento de lípidos, el fraccionamiento de lípidos en lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos

(FL) y la determinación de ésteres metílicos y el análisis del perfil de ácidos grasos se realizó por duplicado de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.7 del Capítulo 2.



Figura 3.3. Cultivos *indoor* de *H. coffeaeformis* en bidones con aireación continua, 20°C \pm 0,5 °C, intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol-fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 12 h:12 h luz:oscuridad y sometidos a una salinidad de 20 ‰, 33 ‰ y 45 ‰.

3.2.4. Efecto de diferentes combinaciones de salinidad y relaciones Si:N sobre la velocidad de crecimiento y la acumulación de TAG

Los experimentos se realizaron por duplicado en Erlenmeyers de 500 mL con 200 mL de medio BAY, con el fin de determinar la combinación óptima de salinidad y nutrientes (Si y N), necesaria para el desarrollo de cada etapa de un cultivo bioenergético, como es la producción de inóculos y la producción masiva de biomasa rica en LN. Así, se testearon dos salinidades: a) una salinidad óptima para el crecimiento (20‰) y b) una salinidad promedio de un ambiente marino, como el EBB (33‰), recomendada para dar inicio a cultivos masivos *outdoor*. Además, para cada salinidad, se testearon dos relaciones Si:N con el fin de

evaluar su rol sobre el crecimiento y acumulación de LN de la especie. Las siguientes concentraciones de silicatos se testearon: 144 μM y 576 μM , para obtener relaciones Si:N de 0,125 y 0,5, respectivamente. Por lo tanto, las combinaciones (C) probadas fueron: C1 (20‰ y 0,125 Si:N); C2 (20‰ y 0,5 Si:N); C3 (33‰ y 0,125 Si:N); y C4 (33‰ y 0,5 Si:N). Los cultivos se ubicaron en cámaras de cultivo a 20 °C, 21 $\mu\text{mol-fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 12 h:12 h luz:oscuridad. Se evaluaron la velocidad de crecimiento, la cinética de clorofila-a (IF-Cla) y la acumulación de TAG (cinética de Rojo Nilo, IF-RN). Los experimentos se llevaron a cabo durante 9 días. La determinación de la velocidad de crecimiento se realizó de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.4 del Capítulo 2. La cinética de clorofila-a (IF-Cla), la cinética de la intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo (RN) y la relación entre el Rojo Nilo y la clorofila-a (IF-RN:IF-Cla) se determinaron de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.6 del Capítulo 2.

3.2.5. Análisis Estadístico

Los resultados del estudio fueron analizados utilizando análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba DMS. Se utilizó el software Infostat.3 (Balzarini *et al.* 2008). En todas las pruebas, el nivel de significancia fue $\alpha = 0,05$.

3.3. Resultados

3.3.1. Efecto de la temperatura y la salinidad sobre la velocidad de crecimiento de *H. coffeaeformis*

Las curvas de crecimiento de *H. coffeaeformis* a diferentes temperaturas se muestran en la Fig. 3.4 A. La especie creció desde 5 °C hasta 30 °C y alcanzó los valores máximos de densidad celular (DC) el día 3 a 20 °C y 25 °C, mientras que mostró los valores más bajos de DC a 5 °C. La velocidad de crecimiento de *H. coffeaeformis* (k , div. día⁻¹) varió significativamente con la temperatura ($F = 9,47$; $p < 0,05$) (Fig. 3.4 B), siendo 20 °C la temperatura óptima en donde se alcanzó un k_{max} de 1,47 div.día⁻¹. Los valores más bajos de k se obtuvieron a 5 °C y 10 °C ($p > 0,05$; DMS = 0,51 div.d⁻¹). Considerando el comportamiento de k frente a la temperatura, se usaron funciones cuadráticas negativas, con el fin de

ajustar los datos y así poder explicar el comportamiento de este parámetro en función de temperaturas $> 20^{\circ}\text{C}$ (Ecuación 3.1) y $< 20^{\circ}\text{C}$ (Ecuación 3.2):

$$k (\geq 20^{\circ}\text{C}) = -0,0012x^2 + 0,1008x - 0,0475; \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

$$k (\leq 20^{\circ}\text{C}) = -0,0078x^2 + 0,3404x - 2,2027 \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Los valores de k aumentaron significativamente con temperaturas de 5°C a 20°C - 25°C y luego mostraron una disminución con temperaturas mayores, alcanzando un k igual a 0 div.día^{-1} a $35,7^{\circ}\text{C}$ (de acuerdo con la Ecuación 3.2.).

Las curvas de crecimiento de *H. coffeaeformis* a diferentes salinidades y a una temperatura constante de 20°C (la temperatura óptima) se muestran en la Fig. 3.4 C. La especie fue cultivada desde 5‰ hasta 95‰ , alcanzando las DC máximas a 20‰ . La especie no creció a 0‰ . En la Fig. 3.4 D se muestra la relación entre k y la salinidad. La velocidad de crecimiento mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 56,51$; $p < 0,01$), siendo su valor máximo a 20‰ ($k = 1,35 \text{ div.d}^{-1}$) ($p < 0,05$; $\text{DMS} = 0,18 \text{ div.d}^{-1}$). Además, k a $20\text{‰} > k$ $25\text{‰} = k$ $35\text{‰} > k$ $5\text{‰} = k$ $45\text{‰} = k$ $60\text{‰} = k$ 95‰ . De acuerdo con estos valores, se usó una función cuadrática negativa para explicar el comportamiento de k desde 0‰ hasta 20‰ :

$$k = -0,003x^2 + 0,1283x + 2 * 10^{-15} \quad (\text{Ecuación 3.3.})$$

y una ecuación logarítmica negativa desde 20‰ hasta 95‰ :

$$k = -0,418 \ln(x) + 2,5253 \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

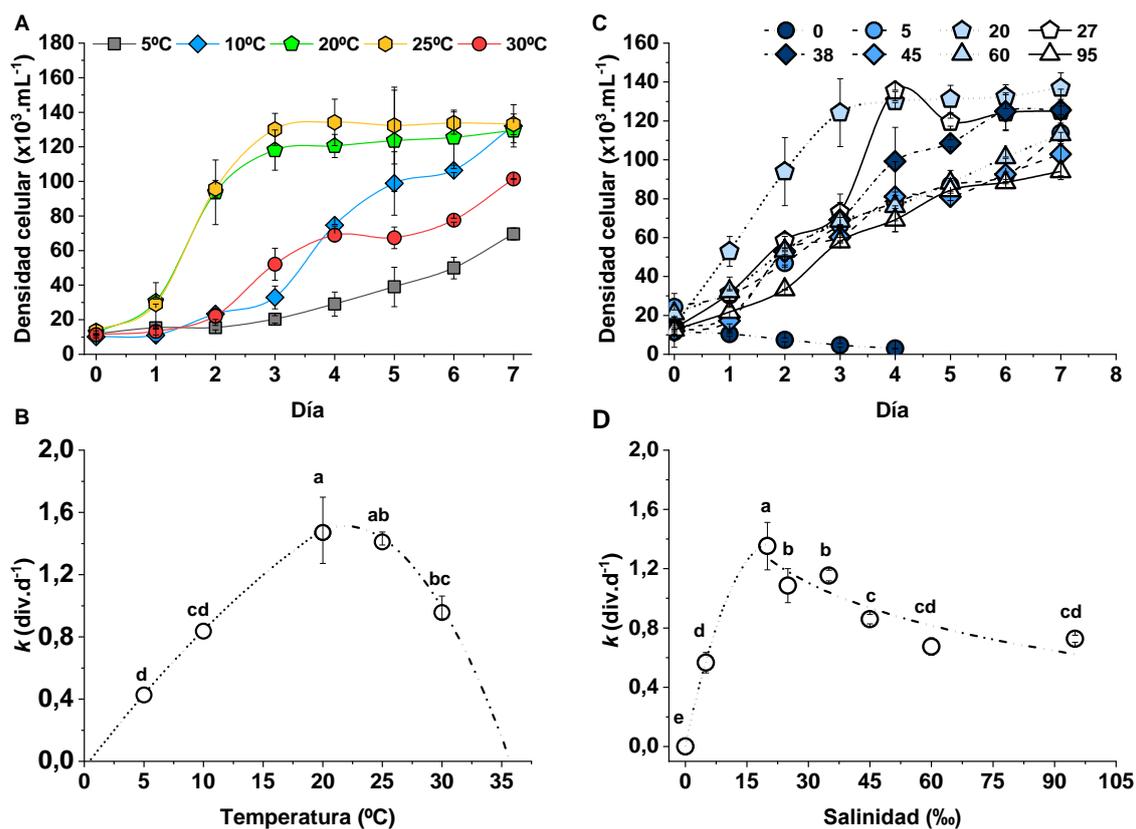


Figura 3.4. Efecto de la temperatura y salinidad sobre la velocidad de crecimiento de *H. coffeaformis*. **A:** Curvas de crecimiento a diferentes temperaturas; **B:** Velocidad de crecimiento (k) a diferentes temperaturas; **C:** Curvas de crecimiento a diferentes salinidades; **D:** Velocidad de crecimiento (k) a diferentes salinidades. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar de dos réplicas. Los valores de k con una letra común no son significativamente diferentes (DMS, $p > 0.05$).

Las Ecuaciones 3.1 y 3.2 fueron usadas para estimar cómo la temperatura de la ciudad de Bahía Blanca podría afectar la velocidad de crecimiento de cultivos de *H. coffeaformis* creciendo bajo condiciones naturales, considerando que ningún otro factor ambiental limita el crecimiento. Las temperaturas para este análisis correspondieron a los promedios mensuales de Bahía Blanca de 2009 a 2019, obtenidos de la estación meteorológica del CERZOS-CONICET (<https://meteobahia.com.ar> CERZOS-CONICET) (Fig. 3.5). De acuerdo con este análisis, los valores de k de noviembre a marzo (primavera a verano) serían el doble ($1,4 \text{ div.día}^{-1}$ a $1,5 \text{ div.día}^{-1}$) que los de junio y julio (otoño a invierno) ($0,68 \text{ div.día}^{-1}$ a $0,75 \text{ div.día}^{-1}$). Además, de mayo a septiembre, k sería inferior a 1 div.d^{-1} (Fig. 3.5). Esta información fue usada para determinar la época del año más

adecuada para realizar los cultivos de *H. coffeaeformis* en piletas a cielo abierto (ver Capítulo 4).

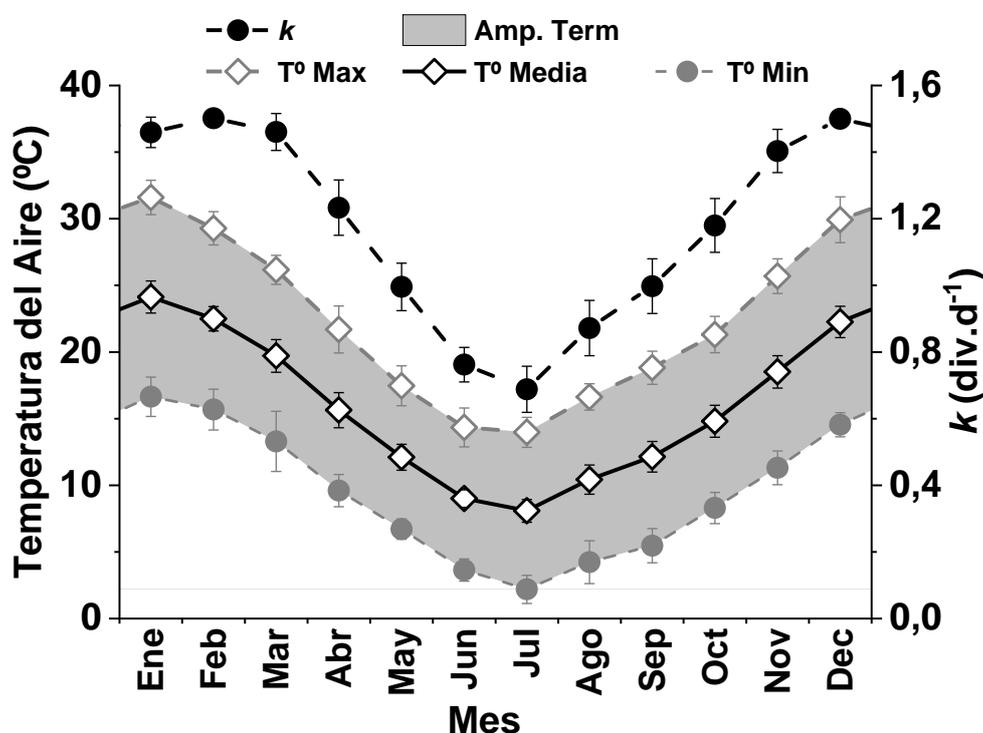


Figura 3.5. Temperatura media mensual del aire en Bahía Blanca de 2009 a 2019 ([https:// meteobahia.com.ar](https://meteobahia.com.ar) CERZOS-CONICET) y k estimado (div.día⁻¹) de *H. coffeaeformis* según las Ecuaciones (3.1) y (3.2). Los datos de temperatura del aire se expresan como el promedio \pm desviación estándar de $n = 10$.

3.3.2. Efecto de la salinidad sobre la acumulación de lípidos neutros y la cantidad y calidad lipídica de *H. coffeaeformis*

El contenido de los lípidos totales (LT) no difirió significativamente ($p > 0,05$) con las diferentes salinidades, aunque se observó una tendencia creciente a mayores salinidades. Los valores de LT fueron de $26,58 \pm 1,99\%$ del peso seco libre de cenizas (PSLC) a 20‰, $27,91 \pm 0,49\%$ PSLC a 33‰ (control) y $31,22 \pm 1,72\%$ PSLC a 45 ‰ Sin embargo, la cinética de los lípidos neutros (LN) de *H. coffeaeformis* expresada como intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo (IF-RN) se vio afectada por los valores de salinidad (Fig. 3.6 A). La IF-RN a 45‰ presentó valores significativamente más altos que aquellos a 20‰ y 33‰ desde el día 11 ($F = 38,01$; $p < 0,01$); siendo las IF-RN a 20‰ las más bajas ($F = 40,19$; $p < 0,01$)

(DMS = 220,44; $p < 0,05$), lo que indica una acumulación más alta y más rápida de LN a 45‰. Además, la salinidad afectó el contenido de lípidos neutros [LN] ($F = 25,29$; $p < 0,05$). Los valores de LN a 45‰ (~85,5 %LT) fueron significativamente mayores que los obtenidos a 20‰ (76,8 %LT), pero no mostraron diferencias significativas con el control de 33‰ (83,28 %LT) ($p < 0,05$). Por su parte, si bien el contenido de lípidos polares (glicolípidos [GL] y fosfolípidos [FL]) no presentaron diferencias significativas con la salinidad ($p > 0,05$), el porcentaje de FL a 45‰ fue menor (2,5 %LT) que a 20‰ (5 %LT) y 33‰ (2,95 %LT) (Fig. 3.6 B).

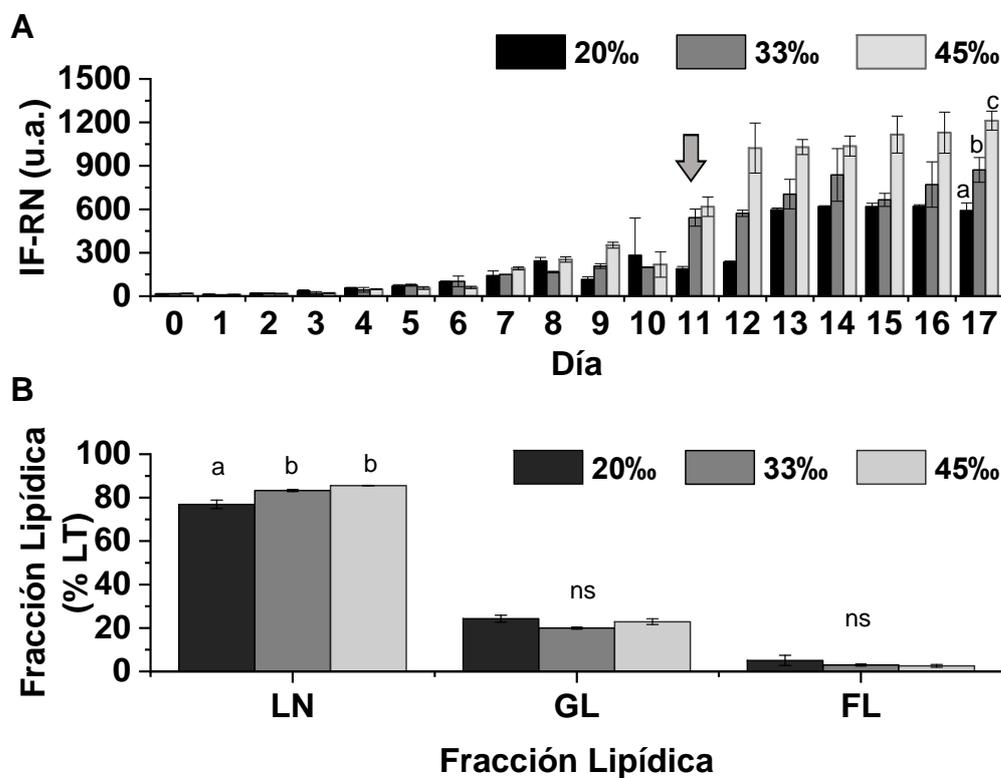


Figura 3.6. Cultivos de *H. coffeaeformis* creciendo a 20‰, 33‰ y 45‰. **A.** Cinética de la intensidad de fluorescencia del RN expresada en unidades arbitrarias (u.a.). **B.** Fracciones de lípidos (% de Lípidos Totales) (LN, lípidos neutros; GL, glicolípidos; y FL, fosfolípidos). La flecha indica el comienzo de la acumulación de LN a 45‰. Los experimentos se realizaron a 20 °C; fotoperíodo de 12 h:12 h luz:oscuridad; 21 $\mu\text{mol-fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar de dos réplicas. (DMS, ns; $p > 0,05$; los valores con una letra diferente son significativamente diferentes, $p < 0,05$).

Las distintas clases de ácidos grasos (saturados [AGS], monoinsaturados [AGMI] y poliinsaturados [AGPI]) y los principales ácidos grasos (> 1% del total de ác. grasos) correspondientes a los LN de *H. coffeaeformis* a 20‰, 33‰ y 45‰ se muestran en la Fig. 3.7. Las clases dominantes fueron los AGS y AGMI, independientemente de las salinidades. El porcentaje de AGS a 20‰ fue significativamente más alto que a 33‰ y a 45‰ (39,4%, 34,3% y 34,5%, respectivamente), debido a un mayor contenido de ácido palmítico (C16: 0) ($p < 0,01$), mientras que los AGMI a 33‰ (43,5%) y a 45‰ (43,7%) fueron significativamente más altos que a 20‰ (41,2%), principalmente debido a valores más altos de ácido palmitoleico (C16:1 ω -7). Por su parte, los AGPI fueron la clase más reducida, independientemente de la salinidad, siendo el ácido eicosapentaenoico o EPA (C20:5 ω 3) el más abundante ($p < 0,01$).

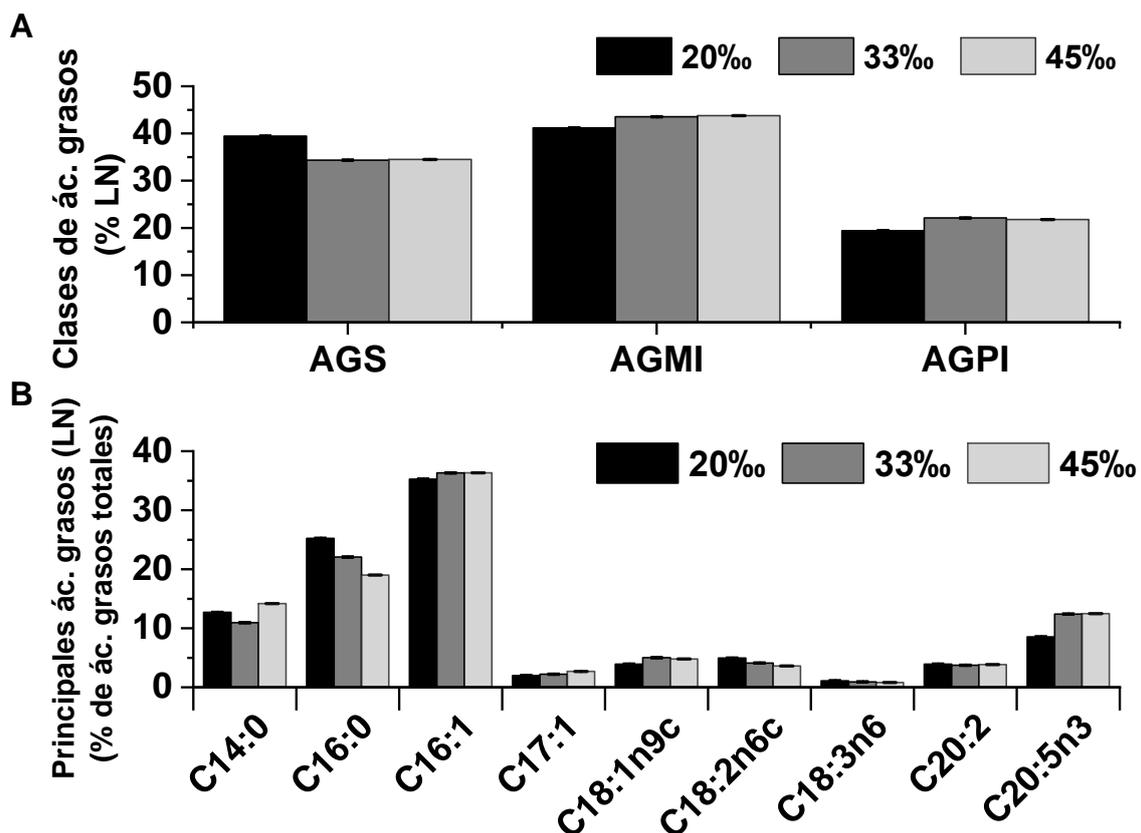


Figura 3.7. Cultivos de *H. coffeaeformis* creciendo a 20‰, 33‰ y 45‰. a) Clases de ácidos grasos (% de LN) (AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados). b) Principales ácidos grasos de los LN (> 1% del total de ácidos grasos). Los experimentos se realizaron a 20 °C; 12 h:12 h luz:oscuridad y 21 $\mu\text{mol-fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar de dos réplicas. (DMS, ns; $p > 0,05$; los valores con una letra diferente son significativamente diferentes, $p < 0,05$).

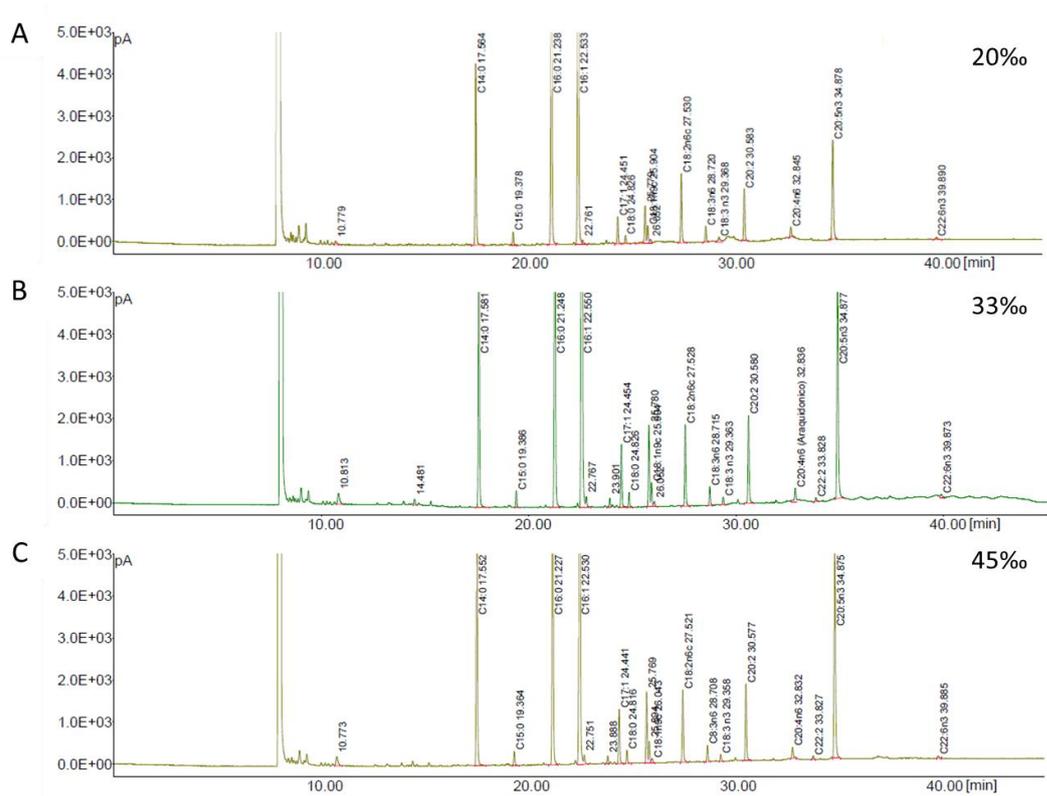


Figura 3.8. Perfil de FAME de los LN de *H. coffeaeformis* cultivada a diferentes salinidades (**A:** 20‰, **B:** 33‰ y **C:** 45‰), por cromatografía gaseosa.

3.3.3. Efecto de diferentes combinaciones de salinidad y relación Si:N sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos neutros de *H. coffeaeformis*

La velocidad de crecimiento (k) y la relación IF-RN:IF-Cla de cultivos de *H. coffeaeformis* creciendo en un medio BAY bajo diferentes salinidades y relaciones Si:N [C1 (20‰ y 0,125 Si:N); C2 (20‰ y 0,5 Si:N); C3 (33‰ y 0,125 Si:N); y C4 (33‰ y 0,5 Si:N)] se muestran en la Fig. 3.9. Se detectaron diferencias significativas para k ($F = 14,95$; $p = 0,012$), y no se encontró interacción entre la salinidad y las relaciones Si:N ($F = 0,08$; $p = 0,786$) (Fig. 3.9 A). Independientemente de las relaciones Si:N, las células adaptadas a 20‰, (C1 = 0,125 relación Si:N y C2 = 0,5 relación Si:N), mostraron un k significativamente mayor ($p < 0,05$) que las adaptadas a 33‰, (C3 = 0,125 relación Si:N y C4 = 0,5 relación Si:N) ($k_{C1} = 1,43 \text{ div.d}^{-1}$; $k_{C2} = 1,63 \text{ div.d}^{-1}$; $k_{C3} = 1,10 \text{ div.día}^{-1}$; $k_{C4} = 1,34 \text{ div.d}^{-1}$). Además, C1 y C3 mostraron los valores de IF-RN:IF-Cla más bajos y más altos, respectivamente (Fig. 3.9 B). Por lo tanto, las células cultivadas a 20‰ y 0,5 Si:N mostraron la velocidad de crecimiento más alta; mientras que las células cultivadas a 33‰ y 0,125 Si:N presentaron la acumulación de TAG más alta.

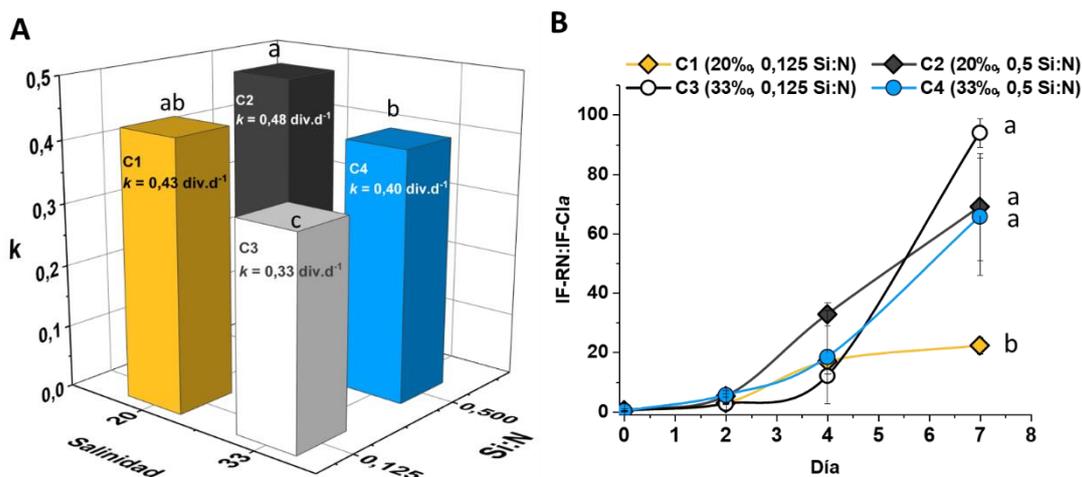


Figura 3.9. Cultivos de *H. coffeaeformis* creciendo bajo diferentes combinaciones de salinidades y relaciones Si:N, en un medio con Bayfolan a 20 °C, ciclo de luz:oscuridad de 12 h:12 h y 21 $\mu\text{mol-fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$. C1 (20‰ y 0,125 Si:N); C2 (20‰ y 0,5 Si:N); C3 (33‰ y 0,125 Si:N) y C4 (33‰ y 0,5 Si:N). **(A)** Velocidad de crecimiento (k). **(B)** Relación IF-RN:IF-Cla. Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar de dos réplicas \pm desviación estándar (DE). Las letras corresponden al análisis DMS, dos o más puntos con letras diferentes son significativamente diferentes.

3.4. Discusión

La comercialización de aceites microalgales para producir biodiésel, requiere de cultivos a gran escala, en donde se obtenga una importante producción de biomasa enriquecida en TAG. Sin embargo, esto requiere de estrategias para hacer el proceso rentable. Algunas alternativas para disminuir los costos de producción de biomasa a escala masiva, consiste en usar reactores a cielo abierto con insumos sustentables. La especie seleccionada en este estudio, fue aislada del estuario de Bahía Blanca, por lo que se espera que el uso de agua de mar pueda sustentar el escalado de los cultivos. Además, el suplemento de biofertilizantes y silicatos, es una alternativa al uso de drogas comerciales. Sin embargo, el punto más importante, es determinar las condiciones que estimulan el crecimiento y la acumulación de TAG, necesarios para la producción de biodiésel. El crecimiento, se ve favorecido por condiciones favorables de concentración de nutrientes, temperatura y salinidad; mientras, que la acumulación lipídica responde a factores de estrés, como déficit de nutrientes, salinidades sub-óptimas, estado de envejecimiento celular, entre otros (D'Ippolito

et al. 2015; Indrayani *et al.* 2019). Considerando que la etapa de producción masiva de biomasa y lípidos neutros se debe realizar a cielo abierto, la identificación de estresores que favorezcan la acumulación lipídica es importante para evaluar el potencial de los cultivos bioenergéticos. El diseño del reactor (volumen, sistema de mezcla, profundidad, etc) y el clima del lugar también son importantes (Kumar *et al.* 2015). Así, un conocimiento integral de todos estos factores es necesario para lograr la viabilidad comercial de una biorrefinería de diatomeas destinada a la producción de biodiésel.

La temperatura es uno de los principales factores ambientales que modula el crecimiento y el metabolismo de las microalgas (Yu *et al.* 2018), y su variación afecta la producción y la composición de la biomasa en cultivos a cielo abierto (Borowitzka 2013). En la presente Tesis, *H. coffeaeformis* creció en un amplio rango de temperaturas (5 °C a 30 °C) y mostró una velocidad de crecimiento óptima entre 20 °C y 25 °C. Un comportamiento similar ha sido observado en otras especies de diatomeas como *Chaetoceros pseudocurvisetus*, *C. cf. wighamii*, *Skeletonema costatum* y *S. hantschii* (Suzuki & Takahashi 1995; de Castro Araujo & Tavano García 2005). En el presente estudio, la velocidad de crecimiento de *H. coffeaeformis* se describió mediante dos ecuaciones cuadráticas negativas, una de 5 °C a 20 °C y la otra de 20 °C a 30 °C, con valores positivos de k hasta 35,7 °C. Esta información permite caracterizar el comportamiento euritérmico de la especie, y también puede ser útil para predecir su crecimiento en cultivos en piletas a cielo abierto, donde la variación de la temperatura es significativa. Las variaciones térmicas en sistemas tipo *raceway* suelen seguir las variaciones térmicas del aire, en particular debido a su baja profundidad (de 18 cm a 30 cm de profundidad, aproximadamente). Por lo tanto, teniendo en cuenta sólo la temperatura promedio del aire, el crecimiento de la especie estudiada en piletas a cielo abierto se maximizaría en los meses más cálidos en zonas templadas. Los valores de k de noviembre a marzo (primavera a verano) deberían duplicar los de junio y julio (otoño a invierno). Además, de mayo a septiembre, el k debería ser menor que 1 div. día^{-1} , lo que indica que la población de esta especie requeriría más de 24 horas para dividirse (Fig. 3.5). El aumento de la productividad de biomasa es uno de los factores más importantes que contribuyen a mejorar la rentabilidad del proceso de producción (Cruce *et al.*

2021). Por lo tanto, la alternancia de cultivos de *H. coffeaeformis* con cultivos de especies que crezcan mejor a temperaturas más bajas, podría ser una buena estrategia para garantizar la continuidad de la producción anual de biomasa en ambientes templados. Por ejemplo, la diatomea cosmopolita *Skeletonema costatum*, cuya composición lipídica es adecuada para la producción de biodiésel (Popovich *et al.* 2012a), se ha asociado con eventos de floraciones invernales (Guinder *et al.* 2021) y, por lo tanto, podría ser cultivada durante los meses fríos.

Respecto a la salinidad, *H. coffeaeformis* creció en un amplio rango de salinidades desde 5‰ hasta 95‰, presentando una velocidad de crecimiento óptima a 20‰. La velocidad de crecimiento en función de la salinidad mostró una ecuación cuadrática negativa de 0‰ a 20‰; y una ecuación logarítmica negativa de 20‰ a 95‰. Esta información permite caracterizar el comportamiento eurialino de la especie, y también puede ser útil para predecir su crecimiento en cultivos en piletas a cielo abierto, donde la variación de salinidad es significativa debido a eventos de precipitación y procesos de evaporación (Ishika *et al.* 2018). Ishika *et al.* (2018) evaluaron el efecto del aumento de la salinidad en diferentes especies de microalgas. Por ejemplo, *Amphora* sp. mostró un aumento gradual en la productividad de biomasa hasta su salinidad óptima a 85‰. La Eustigmatophyta marina *Nannochloropsis oculata* mostró una disminución en su velocidad de crecimiento cuando la salinidad aumentó de 35‰ a 45‰ (Gu *et al.* 2012). Estas respuestas diferentes indican que la salinidad es específica de la especie y de la cepa (Kirst 1990; Shikata *et al.* 2008). En un cultivo híbrido, consistente en una primera etapa de producción de inóculos y una segunda etapa de producción masiva de biomasa, la salinidad debe ser tomada en cuenta ya que es un factor que afecta el crecimiento de la cepa estudiada. En la etapa de producción de inóculos, en donde se requieren condiciones favorables para maximizar el crecimiento celular, una salinidad de 20‰ permitiría maximizar el k de *H. coffeaeformis*. Por otra parte, en la etapa de producción masiva de biomasa a cielo abierto con agua de mar, salinidades cercanas o superiores a 40‰ deberían propiciar condiciones de estrés, disminuyendo el crecimiento.

En particular, el estrés salino juega un rol importante en la acumulación de lípidos neutros en diatomeas (Zulu *et al.* 2018, Ishika *et al.* 2018). *Halimnobia coffeaeformis* mostró una tendencia a aumentar la acumulación de LN en células

adaptadas a 45‰ en comparación con aquellas adaptadas a 20‰. Esta respuesta es similar a la de otras especies oleaginosas como *Nannochloropsis salina* (Bartley *et al.* 2013), *N. oculata* (Gu *et al.* 2012), *Amphora* sp. y *Navicula* sp. (Ishika *et al.* 2018). Cabe destacar que en *H. coffeaeformis*, una salinidad de 20‰ optimizó el crecimiento y no estimuló la acumulación de LN; mientras que una salinidad de 45‰ provocó una disminución en la velocidad de crecimiento y una estimulación en la acumulación de LN. Esta compensación (*trade-off*) entre el crecimiento y la acumulación de LN frente a cambios de salinidad es una estrategia propicia para el desarrollo de cultivos bioenergéticos en la especie estudiada. Por otro lado, el contenido de lípidos totales de la biomasa cosechada a 20‰, fue similar al obtenido a 45 ‰; sin embargo, la acumulación de LN fue más lenta y el porcentaje de LN fue menor que a 33 y 45‰. Es importante destacar, que la acumulación de LN en *H. coffeaeformis* ocurrió en fase estacionaria, independientemente de la salinidad, al igual que en otras especies de diatomeas (Popovich *et al.* 2012a; Hildebrand *et al.* 2014). Sin embargo, en la especie estudiada, un valor de salinidad de 45‰ tuvo un efecto sinérgico, adelantando el inicio del período de acumulación. Así un escenario, caracterizado por un incremento de la salinidad del medio, permitiría acortar el tiempo de cosecha en cultivos bioenergéticos de la especie a cielo abierto. Además, el contenido de fosfolípidos de *H. coffeaeformis* disminuyó con el aumento de la salinidad. Esta característica favorece una buena calidad de biodiésel, el cual debe presentar valores de fosfolípidos inferiores a 10 mg L⁻¹ (EN 14214) (Griffiths *et al.* 2011).

En cultivos en piletas a cielo abierto, basados en agua de mar, pueden ocurrir variaciones importantes en la salinidad debido a cambios en el volumen del cultivo a través de procesos de precipitación y/o evaporación. De acuerdo con estos conceptos, en el presente trabajo se estimó la altura de la columna de agua y el nivel de salinidad que potencialmente podría alcanzar una pileta a cielo abierto bajo condiciones hipotéticas. Esta información puede ser útil para predecir las variaciones en la productividad de LN en cultivos bioenergéticos de *H. coffeaeformis*. En cultivos tipo *batch*, la cantidad de sal (CS) es constante e igual al producto entre la salinidad (S) (‰ = g. L⁻¹) y el volumen del cultivo (V). Así:

$$CS = S_i \cdot V_i \quad (\text{Ecuación.3.5.})$$

y

$$CS = S_x \cdot V_x \quad (\text{Ecuación.3.6.})$$

donde CS es la cantidad de sal; S_i es la salinidad inicial del medio de cultivo; V_i es el volumen inicial del cultivo; S_x es la salinidad del medio de cultivo en el tiempo x; y V_x es el volumen del cultivo en el tiempo x.

en consecuencia,

$$S_i \cdot V_i = S_x \cdot V_x \quad (\text{Ecuación.3.7.})$$

El volumen del cultivo está definido por la altura (h) de la columna de agua, que es variable, y el área de la pileta (A), que es constante. De acuerdo con las ecuaciones (5 a 7), se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$(h_i \cdot A) \cdot S_i = (h_x \cdot A) \cdot S_x \quad (\text{Ecuación.3.8.})$$

$$h_i \cdot S_i = h_x \cdot S_x \quad (\text{Ecuación.3.9.})$$

$$(h_i \cdot S_i) \cdot S_x^{-1} = h_x \quad (\text{Ecuación.3.10.})$$

$$(h_i \cdot S_i) \cdot h_x^{-1} = S_x \quad (\text{Ecuación.3.11.})$$

donde h_i es la altura del cultivo inicial; A es el área de la pileta; S_i es la salinidad inicial; h_x es la altura del cultivo en el tiempo x y S_x es la salinidad en el tiempo x. Por lo tanto, la altura del cultivo en el tiempo x se puede calcular utilizando la ecuación (3.10), independientemente del área de la pileta (A). De la misma manera, la salinidad del medio de cultivo en el tiempo x se puede calcular según la Ec. (3.11.). Por ejemplo, en una pileta a cielo abierto con una altura de cultivo inicial de 20 cm y una salinidad inicial de 33 ‰, tendría que llover 130 mm en poco tiempo para que la salinidad alcance el 20 ‰. Este valor de salinidad

provoca un incremento en el crecimiento de *H. coffeaeformis* y consecuentemente, un retraso en la acumulación de LN. Esta situación debería considerarse en regiones en donde este tipo de régimen pluvial es frecuente. Por otro lado, los procesos de evaporación podrían ser de particular importancia durante períodos cálidos y ventosos (Hisatake *et al.* 1993). Por ejemplo, en una pileta a cielo abierto con una altura de cultivo inicial de 20 cm y una salinidad inicial de 33‰, tendrían que evaporarse 53 mm de agua en un corto tiempo para que la salinidad alcance 45‰. Este escenario favorecería la acumulación de LN en cultivos de *H. coffeaeformis*. En la región de Bahía Blanca, las temperaturas máximas pueden alcanzar más de 40 °C; hay vientos frecuentes con una velocidad promedio de 16,2 km.h⁻¹ y valores máximos de 92 km.h⁻¹, la humedad promedio es de 44,7% y las precipitaciones son típicas de un clima semiárido, con una media anual de 563 mm ([https:// meteobahia.com.ar](https://meteobahia.com.ar) CERZOS-CONICET). Por lo tanto, debido al clima de la región, el aumento de salinidad, debería ser un fenómeno relativamente frecuente en cultivos a cielo abierto sustentados por agua de mar, representado así una estrategia para inducir la producción de lípidos neutros para biodiésel en la especie estudiada.

Las clases de lípidos y la composición de ácidos grasos de *H. coffeaeformis* también se vieron afectadas por la salinidad. Knothe (2005) menciona que el perfil de ésteres de ácidos grasos del biodiésel es relativamente consistente con el perfil de ácidos grasos del aceite con el que fue producido. Este autor ha indicado que aceites con una proporción dominante de AGMI, seguido por AGS y en menor medida por AGPI, son adecuados para obtener una buena calidad de biodiésel. En este trabajo, la calidad de los lípidos de *H. coffeaeformis* presentó diferencias asociadas con la salinidad. Por ej, la cantidad de AGMI aumentó significativamente a 45‰, debido al incremento del ácido palmitoleico (C16: 1 ω-7 = 36,4% de los ácidos grasos totales). El éster metílico de este ácido, el palmitoleato metílico, es de interés para la producción de biodiésel, dado que brinda ventajas relacionadas con su viscosidad cinemática, especialmente en motores sometidos a bajas temperaturas. Este éster metílico tiene un punto de fusión de -33,9 °C, que es 13,3 °C más bajo que el del metil oleato, un éster metílico derivado del ácido oleico y que es común en el aceite de soja (Knothe 2008; 2010). Además, el ácido palmitoleico no es muy abundante en plantas

superiores, como la colza o la soja (<1% de los ácidos grasos totales), que son materias primas convencionales para biodiésel. Así, las altas salinidades representan un doble beneficio en los cultivos de *H. coffeaeformis*, ya que mejoran la cantidad y calidad de los ácidos grasos.

Los resultados de este estudio mostraron que la salinidad es un factor clave que puede modular el crecimiento y la acumulación de TAG en *H. coffeaeformis*. Otro factor que afecta estas variables en las diatomeas es la disponibilidad de silicatos (Martin-Jézéquel *et al.* 2000). El Si es un elemento esencial para el crecimiento de las diatomeas, dado que forma parte de su pared celular o frústulo, y limitaciones en este elemento afectan su crecimiento y estimulan la acumulación de TAG (Martin-Jézéquel *et al.* 2000; Hildebrand *et al.* 2014). En este estudio, el uso de agua de mar a 20‰ enriquecida con Bayfoland con una buena disponibilidad de Si y N (Si:N de 0,5) permitió obtener la máxima velocidad de crecimiento, los valores más altos de IF-Cla y los valores más bajos de IF-RN:IF-Cla. Esta mejora en el crecimiento y *performance* del cultivo es relevante para optimizar la producción de inóculos de esta especie, necesarios para el escalado a cultivos a cielo abierto. Por otro lado, el uso de agua de mar a 33‰, enriquecida con Bayfoland con una relación Si:N de 0,125, permitió obtener los valores más altos de IF-RN:IF-Cla en el día 7. Así, esta combinación fue considerada una buena estrategia para comenzar un cultivo *outdoor* de *H. coffeaeformis* tendiente a la producción de lípidos neutros. Se espera que el aumento de la salinidad por eventos de evaporación, combinado con una disminución en la concentración de Si, incremente el rendimiento de LN, necesario para la producción de biodiésel en la especie estudiada.

3.5. Conclusiones

Los océanos comprenden más del 70% de la superficie de la Tierra y el agua dulce es un recurso valioso que debe ser cuidado para el desarrollo de la humanidad. Por lo tanto, los entornos costeros, estuarinos y de marisma se presentan como posibles lugares para instalar biorrefinerías de microalgas marinas a gran escala para la producción de biodiésel. En este contexto, los resultados obtenidos en este capítulo proporcionan información de base para el desarrollo de cultivos bioenergéticos de *H. coffeaeformis*. Así, para optimizar la

producción de inóculos se sugiere utilizar fotobioreactores a una temperatura de 20 °C, una salinidad de 20‰ y una relación Si:N de 0,5; mientras que para inducir la acumulación de TAG en un tiempo más corto en piletas a cielo abierto, se sugiere iniciar los cultivos a 33‰ de salinidad (una salinidad típica del agua de mar) y una relación Si:N de 0,125. Durante el transcurso del cultivo se espera que la disminución de la salinidad, inducida por precipitaciones, incremente el crecimiento de la especie y retrase la acumulación de lípidos neutros, mientras que los aumentos de salinidad, inducidos por la evaporación, representen estresores del crecimiento. En particular, valores de salinidad superiores a 45‰ podrían ser útiles como señales de "alarma" para detectar períodos de acumulación de lípidos neutros a lo largo del tiempo. Además, como *H. coffeaeformis* tiene la capacidad de autoflocular y formar *biofilms*, una reducción en la altura de la columna de agua causada por evaporación no sería un impedimento para su supervivencia y por otra parte, el costo de la cosecha se reduciría sustancialmente. Bajo este contexto, la información obtenida en este capítulo resulta de utilidad para el diseño de cultivos a cielo abierto, necesarios para validar el comportamiento de la especie bajo condiciones naturales.

Capítulo 4 – Cultivo de *Halamphora coffeaeformis* a cielo abierto en pileta tipo *raceway*

4.1. Introducción

Países como Austria, Francia, Alemania, Italia, Malasia, España, Suecia y Estados Unidos son pioneros en la prueba, producción y uso de biodiésel en automóviles (Wiesenthal *et al.* 2009). En 2020, Estados Unidos se posicionó como el principal productor de biocombustibles a nivel mundial, registrando una producción aproximada al equivalente de 600.000 barriles de petróleo por día (Ya-wen 2021).

La producción de biomasa microalgal a escala comercial es uno de los principales desafíos para el desarrollo de cultivos bioenergéticos destinados a la producción de aceites para biodiésel (Abomohra *et al.* 2016). Las piletas de tipo *raceway* son una buena alternativa para la producción masiva de microalgas (Borowitzka 2016), dado que presentan costos operativos y de inversión relativamente bajos. Además, pueden construirse en terrenos no cultivables, predios industriales y plantas de tratamiento de aguas residuales (Borowitzka & Moheimani 2013). Suelen ser construidas de hormigón, cemento, fibra de vidrio o membranas de PVC impermeables y con una altura de hasta 40 cm (Rayen *et al.* 2019), que contiene cultivos de 20 a 30 cm de profundidad (Borowitzka 2016). Típicamente poseen un sistema de agitación compuesto por una rueda de paletas que mezcla el cultivo, aunque también pueden contar con aireadores, hélices o bombas, entre otros (Borowitzka & Moheimani 2012). Existen empresas que han logrado modelos de negocios exitosos utilizando microalgas cultivadas en agua de mar. Por ejemplo, Cyanotech®, es una empresa líder en Hawaii, Estados Unidos, que desde 1983 realiza cultivos masivos de microalgas con fines comerciales para industrias nutracéuticas y alimenticias (<https://www.cyanotech.com>). Actualmente poseen 39 hectáreas donde se encuentra el área de cultivo, las instalaciones de procesamiento, una planta de extracción en el lugar y edificios de oficinas y de investigación (Fig. 4.1 A y B).

Sus cultivos, realizados con agua de mar que bombean desde la costa, se basan en las microalgas *Spirulina* sp. y *Haematococcus pluvialis* (Fig. 4.1 C y D), de las que obtienen sus productos, Hawaiian *Spirulina*® y BioAstin® Hawaiian Astaxanthin (Fig. 4.1 E). Además, utilizan un sistema fotovoltaico de 684 KW para alimentar los motores de las piletas y así reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. Cyanotech® ha logrado ser líder mundial en cultivo de microalgas, siendo Hawaiian *Spirulina*® y BioAstin® los productos más vendidos para sus categorías en Estados Unidos (<https://www.cyanotech.com/our-history/>).

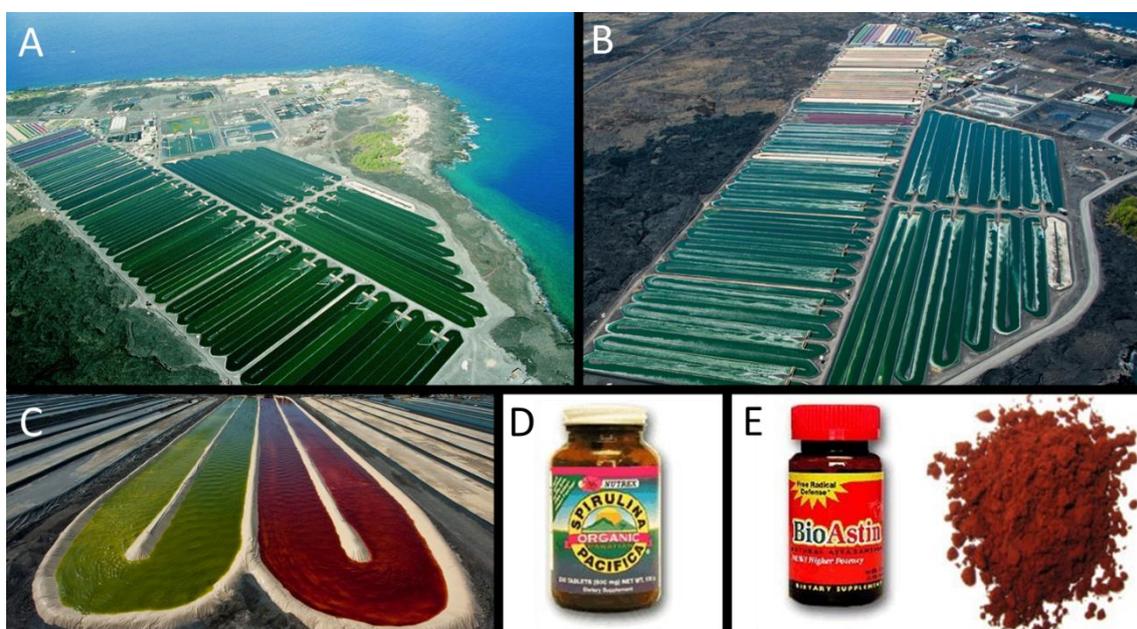


Figura 4.1. A y B) Instalaciones de Cyanotech®. C) Cultivos de espirulina y *Haematococcus pluvialis* en piletas tipo raceway. D) Hawaiian *Spirulina*® E) Astaxantina BioAstin®.

Sin embargo, los cultivos bioenergéticos de microalgas no han alcanzado una producción a gran escala debido a diversas barreras, como: métodos de cultivo no optimizados, baja tasa de retorno energético, altos costos de capital, y competencia con otros *commodities* (Beal *et al.* 2015). En los últimos años este tipo de análisis ha derivado en la necesidad de (I&D) con el fin de determinar la factibilidad de radicar biorrefinerías de biomasa microalgal para cubrir la brecha de rentabilidad y encontrar soluciones creativas para promover su sustentabilidad ambiental. Grandes compañías petroleras, como ExxonMobil, Chevron y Shell, asociadas con empresas de tecnología de algas han invertido

y realizado esfuerzos para la comercialización de biocombustibles basados en microalgas, pero solo han llegado a escala piloto (Singh & Gonzales-Calienes 2021). A pesar de consistir en mercados diferentes, empresas como Cyanotech® demuestran que el desarrollo de cultivos masivos en ambientes costeros es posible, por lo que sus avances en el estado de arte pueden inspirar el desarrollo de cultivos bioenergéticos, a pesar de que la escala en este último caso sea necesariamente mayor para cubrir la rentabilidad del proceso.

Bajo este contexto, una vez seleccionada la especie oleaginosa y evaluado su comportamiento a escala de laboratorio (ver Capítulo 3 de esta), el siguiente desafío es conocer su capacidad de escalado y su comportamiento bajo condiciones naturales. Para ello es importante considerar que los cultivos microalgales a cielo abierto en piletas tipo *raceway* están directamente afectados por el clima de la región y la disponibilidad de agua adecuada para el crecimiento de la especie (Borowitzka 2016). En estos sistemas abiertos, las condiciones físico-químicas del cultivo se encuentran fuertemente afectadas por las variaciones de temperatura y humedad del aire, velocidad del viento, régimen de precipitación, entre otras. En particular, dichos factores pueden modificar significativamente la temperatura, el pH, la salinidad y la solubilidad de los nutrientes del cultivo; como también la altura de la columna de agua, afectando directamente el crecimiento y metabolismo microalgal (Zhuang *et al.* 2018). Algunos estudios realizados con cultivos de diatomeas a cielo abierto con fines bioenergéticos, como por ejemplo con *Fistulifera solaris* y *Mayamaea* sp. en Kitakyushu, Japón (Matsumoto *et al.* 2017) y *Amphora* sp. en Perth, Australia (Indrayani *et al.* 2019), han demostrado que la acumulación de lípidos neutros es susceptible a la cepa seleccionada, ubicación geográfica, condiciones climáticas, escala del cultivo, producción del inóculo y momento de la cosecha, entre otros factores. Así un conocimiento integral de todos estos factores es necesario para definir el potencial uso de una microalga oleaginosa para el desarrollo de cultivos bioenergéticos.

Como se ha demostrado en el presente estudio, *H. coffeaeformis* es una cepa euritolerante, que puede crecer bajo un amplio rango de temperaturas (5 °C a 30 °C) y salinidades (5 ‰ a 95 ‰) (ver Capítulo 3 de esta Tesis). Los límites máximos de tolerancia de la cepa a escala de laboratorio fueron 35 °C y al menos

95 ‰ de salinidad. Además, se determinó que valores de salinidad superiores a 45 ‰ son particularmente interesantes como estresores para la producción de lípidos neutros. Esta cepa creciendo en piletas *raceways indoor* y con medio convencional f/2 alcanzó contenidos de lípidos totales de hasta el 54,4 % de peso seco libre de cenizas (AFDW), y contenidos de lípidos neutros de hasta 34 % AFDW (Martín *et al.* 2016; 2018). Bajo este contexto, en este capítulo se presenta por primera vez un estudio integral del cultivo de *H. coffeaeformis* a cielo abierto en piletas de tipo *raceways* con agua proveniente del estuario de Bahía Blanca. Ante la insuficiencia de información de procesos de este tipo a escala industrial, es necesario comenzar en planos menores al procurar evaluar la factibilidad operativa y técnica para luego poder abordar el plano económico.

Los objetivos de este capítulo fueron: 1) Evaluar el crecimiento, la acumulación de TAG, el contenido de lípidos totales, de fracciones lipídicas y de clases de ácidos grasos de la cepa argentina *H. coffeaeformis* en piletas *raceways* a cielo abierto, utilizando agua de mar del estuario de Bahía Blanca enriquecida con un biofertilizante de marca reconocida; 2) Evaluar la relación de las variables fisicoquímicas y ambientales con las variables biológicas de los cultivos; 3) Determinar y evaluar la calidad de lípidos totales, fracciones lipídicas (neutros y polares) y perfil de ácidos grasos, a través de métodos usados a escala de laboratorio y cantidad de lípidos totales a través del método de Soxhlet, con el fin de aplicar un método usado a nivel industrial; 4) Estimar las propiedades del biodiésel a partir de los perfiles de ácidos grasos obtenidos.

Resumen: Se realizaron cultivos de *H. coffeaeformis* en piletas tipo *raceway* a cielo abierto. La especie se cultivó en agua de mar enriquecida con biofertilizante Bayfolan® (Bayer CropScience) con la adición de silicatos. Se seleccionó el biofertilizante como un medio de cultivo económicamente viable a gran escala. Los experimentos se llevaron a cabo en verano y primavera, cuando las temperaturas medias de la región presentaban valores entre 14 °C y 24 °C; la velocidad del viento era de aproximadamente 22 km h⁻¹; y había entre 12,0 y 14,9 horas de luz diurna (<https://meteobahia.com.ar> CERZOS-CONICET). Además, se compara el rendimiento y la calidad del aceite de cultivos de *H. coffeaeformis* con los aceites usados para producir biodiésel comercial, como la

soja. Esta instancia resulta de gran utilidad fáctica al momento de extrapolar los rendimientos hacia escalas mayores.

Las **hipótesis de trabajo** consideradas en este capítulo fueron que: *El cultivo estacional a cielo abierto de *H. coffeaeformis* en piletas tipo raceway utilizando agua de mar enriquecida con biofertilizante Bayfolan® con la adición de silicatos promoverá un crecimiento adecuado y una acumulación significativa de TAG, lo que lo convierte en una fuente prometedora para la producción de aceites para biodiésel; Las variables fisicoquímicas y ambientales, influirán significativamente en el crecimiento y la acumulación de lípidos en los cultivos de *H. coffeaeformis* en piletas tipo raceway a cielo abierto; Las propiedades de biodiésel estimadas a partir del perfil de ácidos grasos de *H. coffeaeformis* será comparable o superior a las estimadas a partir del aceite de soja.*

Parte de los resultados que componen el siguiente capítulo fueron publicados en:

- Navarro FE, Leonardi PI, Damiani MC, Martín LA, Martínez AM, Popovich C.A. (2023) Outdoor culture of *Halimnobia coffeaeformis* in the semi-arid Pampa of Argentina: A comprehensive analysis of triacylglycerol production for biodiesel. *Algal Research*, 74: 103170. (2023)

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Clima del área de estudio

Se realizó un estudio del clima de Bahía Blanca (38° 43' 0 " S 62° 16' 0" O) desde el año 2010 hasta el año 2021 para seleccionar las estaciones del año más adecuadas para el desarrollo de cultivos a cielo abierto de *Halimnobia coffeaeformis*. El conjunto de datos utilizados (temperatura del aire, radiación fotosintéticamente activa [PAR], precipitaciones y velocidad del viento) fue obtenido de la base de datos de la Estación Meteorológica ubicada en el campus del CERZOS (CCT-CONICET Bahía Blanca) (<https://meteobahia.com.ar> CERZOS-CONICET).

4.2.2. Producción de inóculo

Halamphora coffeaeformis fue cultivada de manera exponencial en un fotobiorreactor cilíndrico de vidrio de borosilicato de 25 L (FBR) (Marca FIGMAY S.R.L., Córdoba, Argentina) con el objetivo de obtener 12 L de inóculos para piletas tipo *raceway* con 158 L de medio de cultivo (Fig 4.2). El FBR está construido de vidrio borosilicato, tiene una altura de 70 cm, un diámetro interno de 25 cm y un diámetro externo de 26 cm (Fig. 4.2 A). En su parte superior posee una tapa bridada con 5 bocas roscadas y una central por donde pasa el eje de un agitador que permite la mezcla del cultivo. Las velocidades de agitación van desde 10 a 90 rpm. Posee robinetes para venteo de oxígeno, doble entrada para aire y CO₂ en forma simultánea, válvulas de descarga, termómetro electrónico y tablero electrónico de comando. Además, posee cuatro paneles LED blancos dispuestos verticalmente alrededor del biorreactor (Fig. 4.2 A). El fotobiorreactor está situado en una cámara de cultivo con temperatura controlada, la que fue verificada diariamente mediante un termómetro de máximos y mínimos. Considerando las condiciones que maximizan el crecimiento de la cepa (ver Sección 2.3.2 del Capítulo 2), se utilizó el medio BAY con una salinidad de 20‰ y con una relación Si:N Redfield/Brzezinski no limitante de 0,5 (Sarhou *et al.* 2005). La producción del inóculo se llevó a cabo en el FBR durante 4 días a 20°C ± 2°C (Fig. 4.2 B y C). La iluminación consistió en paneles LED blancos alrededor del FBR, con un PAR de 100 μmol fotones.m⁻²s⁻¹ y un fotoperíodo de 12:12 h de luz:oscuridad (Fig. 4.2 C). El cultivo se mantuvo bajo agitación continua mediante un sistema de paletas centrales (Fig. 4.2 C) y, mediante el uso de un mezclador de aire y CO₂, se suministró aire con un 1 % de CO₂ (v/v) cada 3 segundos durante 2 h por día (Fig. 4.2 D). Este tiempo fue seleccionado para evitar disminuciones excesivas del pH del medio. El cultivo se cosechó en fase de crecimiento exponencial para obtener células fotosintéticamente activas. Pasado 4 días, el volumen total del FBR fue cosechado y utilizado como inóculo para los cultivos a cielo abierto.



Figura 4.2. Preparación de inóculos de *H. coffeaeformis* en fotobiorreactor cilíndrico. **A)** Fotobiorreactor cilíndrico de 25 L Figmay. **B)** Inicio del inóculo en fotobiorreactor. **C)** Crecimiento de inóculo en fotobiorreactor. **D)** Sistema de inyección de aire con un 1 % de CO₂ (v/v).

4.2.3. Cultivos a cielo abierto en piletas tipo *raceway*

Los estudios de laboratorio indicaron que *H. coffeaeformis* puede crecer bien ($\geq 0,8 \text{ div.d}^{-1}$) entre 10 °C y 30 °C (ver Capítulo 3). Por lo tanto, en base a una evaluación del clima durante 12 años en la región (<https://meteobahia.com.ar> CERZOS-CONICET), se realizaron dos experimentos de cultivo a cielo abierto

de la siguiente manera: a) el primer cultivo se llevó a cabo a finales del verano de 2021 (cultivo de verano), y b) el segundo cultivo se realizó a finales de la primavera de 2021 (cultivo de primavera). Se utilizaron piletas tipo *raceway* de PVC de aproximadamente 0,96 m² (1,6 m de longitud y 0,6 m de ancho) y 0,3 m de altura. Las piletas fueron ubicadas en una parcela dentro del campus del CERZOS en el CCT-CONICET. Los cultivos se llevaron a cabo con agua de mar con una salinidad de 33 ‰, enriquecida con biofertilizante Bayfolan® 11-8-6 (N-P-K) (Bayer CropScience) con la adición de Na₂SiO₃ en una relación 0,125 Si:N. Los estudios realizados en el Capítulo 3 de esta Tesis, demostraron que bajo estas condiciones los cultivos de *H. coffeaeformis* presentan una importante acumulación de TAG en pocos días.

A esta escala de cultivo, el agua de mar envejecida y filtrada (1 µm Milliporo) fue clorada (1,1 mL de hipoclorito de sodio al 5 % por litro de agua) y se dejó reposar por un día, luego se sometió a un corto período de aireación y por último se neutralizó el hipoclorito de sodio con 0,15 g de tiosulfato de sodio Na₂S₂O₃ por litro de agua. Una vez neutralizado el hipoclorito de sodio, se incorporó el Bayfolan® y Na₂SiO₃ (Fig. 4.3 A). Luego se incorporó el inóculo (Fig. 4.3 B). La agitación fue producida por una rueda de paletas de PVC unida a un eje rotativo accionado por un motor eléctrico (37 W, 12 V y 5 A). Para obtener una turbulencia adicional, diariamente se burbujeó aire comprimido enriquecido con CO₂ al 1 % (v/v) durante 2 horas, a través de un tubo de plástico perforado pegado al fondo de la pileta. Los valores de pH de los cultivos oscilaron entre 7,8 y 10,1. Los *raceways* comenzaron con una profundidad de cultivo de 0,2 m equivalente a un volumen de cultivo de 170 L, incluidos los 12 L de inóculo. El muestreo para analizar las condiciones fisicoquímicas, densidad celular, peso seco, cinéticas de clorofila, RN y nutrientes, se realizó en forma diaria a partir de una muestra de 500 mL tomada con una probeta de plástico (Fig. 4.3 C). A partir de esta muestra homogeneizada mediante un agitador (Marca: Precytec) se tomaron submuestras para las distintas variables (Fig. 4.3 D).

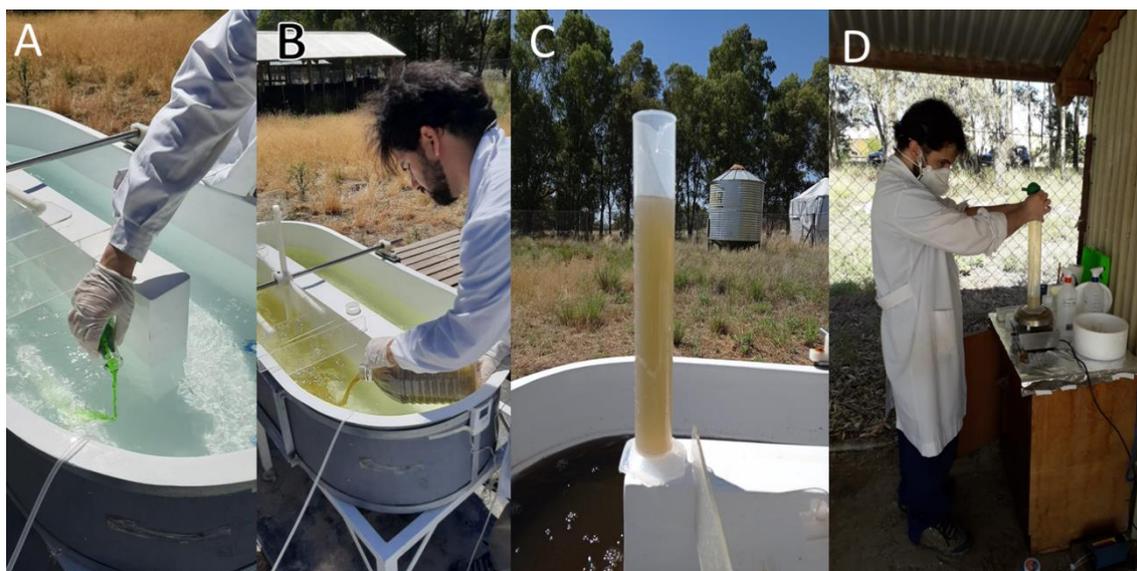


Figura 4.3. Inicio del cultivo de *H. coffeaeformis* a cielo abierto en pileta tipo raceway. **A)** agregado del Bayfolan® y silicatos al agua de mar acondicionada; **B)** Incorporación del inóculo, **C)** Muestra representativa de 500 mL; **D)** Submuestreos a partir de la muestra homogeneizada con un agitador e imán.

La duración de los ensayos se determinó de acuerdo al momento de máxima producción de LN, a partir del cual se realizó la cosecha. Para fijar un criterio de máxima acumulación, se consideró una relación entre la intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo (IF-RN) y la intensidad de fluorescencia de clorofila-a (IF-Cla) mayor o igual a 40 ($IF-RN:IF-Cla \geq 40$), de acuerdo a Bongiovani *et al.* (2013) (ver Sección 4.2.4). Este valor se utilizó como un indicador del desequilibrio a favor de la acumulación de lípidos neutros, lo que indicó el momento adecuado para la cosecha.

En la Fig. 4.4 se muestra la progresión de un cultivo a cielo abierto tipo *batch* de *H. coffeaeformis* en piletas tipo *raceway*, desde su inicio (Fig. 4.4 A) hasta el momento de la cosecha (Fig 4.4 D). Para proceder a la cosecha (Fig. 4.5), se detuvieron las paletas y la aireación, y luego de un período de una hora, las células de *H. coffeaeformis* autoflocularon formando un *biofilm* en el fondo de la pileta (Fig. 4.5 A). El sobrenadante se retiró a través de una canilla, ubicada en un extremo de la pileta y se recuperó para su reciclaje (Fig. 4.5 B). Luego, el *biofilm* (Fig. 4.5 C) se cosechó raspando con una pala y recogiénolo en frascos de plástico (Fig. 4.5 D). La biomasa se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o se liofilizó, según el análisis a realizar *a posteriori*.

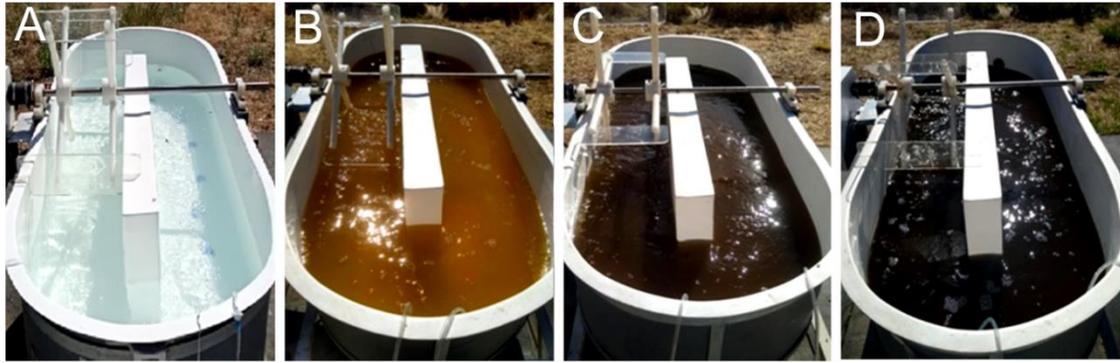


Figura 4.4. Progresión de un cultivo *batch* a cielo abierto de *H. coffeaeformis*, llevado a cabo en verano de 2021, desde el inicio hasta el momento de la cosecha. **A)** Pileta con agua de mar, sin el agregado del inóculo; **B)** Día 2 del cultivo; **C)** Día 8 del cultivo; **D)** Día 13 del cultivo (día de cosecha).



Figura 4.5. Cosecha de *H. coffeaeformis* en cultivo *batch* a cielo abierto, , llevado a cabo en verano de 2021. **A)** Autofloculación de células. **B)** Retiro y recuperación del sobrenadante. **C)** Biomasa húmeda sin sobrenadante. **D)** Cosecha de biomasa en frascos plásticos.

4.2.4. Determinación de la cinética de la intensidad de fluorescencia de la clorofila-a y el Rojo Nilo. Cálculo de la relación Rojo Nilo y clorofila-a

La cinética de la intensidad de fluorescencia de la clorofila-a (IF-Cl_a), del Rojo Nilo (IF-RN) y la relación de Rojo Nilo y clorofila-a (IF-RN:IF-Cl_a) se realizaron de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.6. del Capítulo 2.

4.2.5. Monitoreo de variables climáticas y fisicoquímicas

El análisis de las variables climáticas y fisicoquímicas se realizó a lo largo de los cultivos de verano y primavera (Fig. 4.6). Datos diarios de temperatura del aire (°C) y precipitación (mm) se obtuvieron de la Estación Meteorológica ubicada en el campus del CERZOS en el CCT-CONICET Bahía Blanca (<https://meteobahia.com.ar> CERZOS-CONICET). El PAR ($\mu\text{mol fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) se midió con un radiómetro modelo LI-192SB de LICOR (Fig. 4.6 A). La temperatura del agua (°C) y la salinidad (‰) se midieron con un sensor digital multiparamétrico CONSORT C562, el pH se midió con un sensor de pH (POCKET PRO pH TESTER, HACH) (FIG. 4.6 C) y la profundidad de la columna de agua (cm) se midió con una regla fija a la pared interna de la pileta.

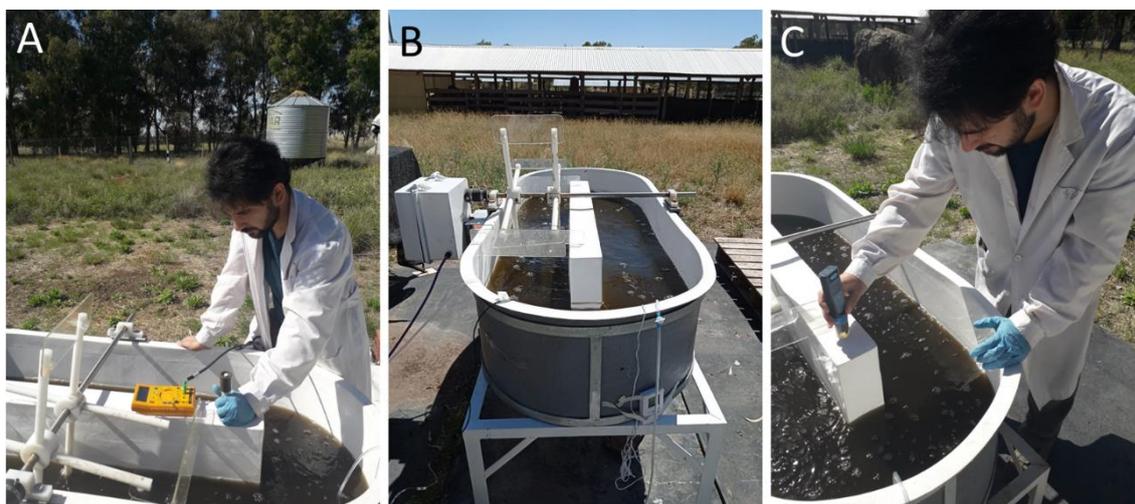


Figura 4.6. Medición de variables climáticas y fisicoquímicas de un cultivo *batch* a cielo abierto de *H. coffeaeformis*. **A)** Medición de PAR con un radiómetro modelo LI-192SB marca LICOR. **B)** Medición de temperatura del aire y temperatura del cultivo. **C)** Medición de pH con un sensor de pH POCKET PRO pH TESTER, HACH.

4.2.6. Determinación de la densidad celular y la velocidad de crecimiento

La densidad celular (DC: células mL^{-1}) y la velocidad de crecimiento (k) se determinaron de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.4 del Capítulo 2. Se requirió normalizar los valores de DC debido a los cambios en el volumen del

cultivo, provocado por la evaporación o las precipitaciones. Para normalizar los valores de DC, se multiplicaron por el volumen de la pileta en el momento del muestreo y se dividieron por el volumen inicial de la pileta (170 L), evitando así la sobreestimación o subestimación de la DC debido a los cambios de volumen.

4.2.7. Determinación del peso seco y la productividad de biomasa

2.1.1.1. Determinación del peso seco

El peso seco (PS: g.L⁻¹) se determinó de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.5 del Capítulo 2. De la misma manera que con la DC, los valores de PS fueron normalizados al volumen del cultivo. Para ello, los valores de PS se multiplicaron por el volumen de la pileta en el momento del muestreo y se dividieron por el volumen inicial (170 L).

2.1.1.2. Determinación de la productividad volumétrica y áreal

La productividad de biomasa (expresada en peso seco, PS) se estimó durante el período de crecimiento exponencial. Se determinaron la productividad volumétrica (PVB) y la productividad áreal (PAB), de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$PVB_{PS}(g.L^{-1}.día^{-1}) = \frac{PS_{FE}(g.L^{-1}) - PS_0(g.L^{-1})}{DFE(días)} \quad (\text{Ecuación 4.1.})$$

$$PAB_{PS}(kg.ha^{-1}.día^{-1}) = PVB_{PS}(g.L^{-1}.día^{-1}) \cdot VIC(L) \cdot \left(\frac{1}{area(m^2)}\right) \cdot \left(\frac{kg}{1.000g}\right) \cdot \left(\frac{10000m^2}{ha}\right) \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

En donde, PS₀ es el peso seco en el día 0; PS_{FE} es el peso seco en el último día de la fase de crecimiento exponencial; DFE es la duración de la fase de

crecimiento exponencial. PAB_{PS} es igual a PVB_{PS} multiplicado por el volumen inicial del cultivo (VIC), y dividido por el área del cultivo.

4.2.8. Determinación de la cinética de nutrientes disueltos

La concentración de los nutrientes inorgánicos disueltos del BAY (fosfato, amonio, nitrato y silicatos) se determinó diariamente. Para ello, se tomaron muestras de 20 mL, las cuales se filtraron a través de filtros Whatman GF/F. El filtrado se recuperó y conservó en un frasco plástico con tapa a rosca a -20°C hasta su análisis. Las concentraciones de los nutrientes disueltos: fosfato (PO_4^{3-}), amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) y silicatos (SiO_4^{4-}) se determinaron mediante ensayos colorimétricos de acuerdo con Strickland *et al.* (1972). Las absorbancias se midieron con un espectrofotómetro UV/Vis Varian Cary 60 (Agilent, USA) a 543 nm para NO_3^- , 630 nm para NH_4^+ , 885 nm para PO_4^{3-} , y 810 nm para SiO_4^{4-} . Las concentraciones de nutrientes disueltos se expresaron en μM .

4.2.9. Extracción de lípidos totales

Una vez que los cultivos alcanzaron o superaron un umbral de relación IF-RN: IF-Cla ≥ 40 , independientemente de la duración del experimento, los cultivos fueron cosechados y se tomaron muestras de 4L para determinar el contenido de lípidos totales (LT), las fracciones lipídicas y el perfil de ácidos grasos. Para ello, las muestras fueron centrifugadas (10 minutos a 3600 g), los pellets se lavaron con un *buffer* de NaCl al 0.9 % (pH 7) para eliminar las sales, se centrifugaron durante 10 minutos a 800 g a 10°C y se conservaron a -80°C hasta su análisis.

La extracción de LT se llevó a cabo en un equipo Soxhlet, con el fin de aplicar un método usado a nivel industrial. Para ello, muestras de 3 g de biomasa seca en estufa (48 horas a 60°C) fueron mortereadas y colocadas en un cartucho de celulosa. Éstos se colocaron en un equipo Soxhlet, al cual se le cargó etanol. La extracción se realizó durante 12 horas. Durante este período, se llevaron a cabo aproximadamente 24 ciclos de evaporación/condensación/percolación del solvente en la cámara de extracción (Fig. 4.7). Después de la extracción, el solvente se evaporó a presión reducida (rotoevaporador Büchi Rotavapor R-110)

y la fracción de lípidos se secó hasta obtener un peso constante en un horno a 60 °C. El contenido de lípidos se determinó gravimétricamente, expresado como un porcentaje del peso seco (% PS) y convertido a PSLC. Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

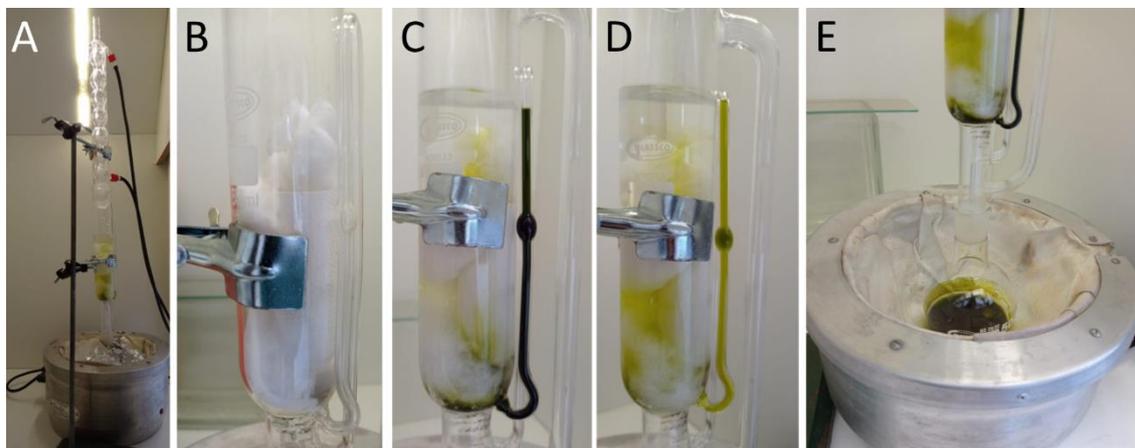


Figura 4.7. Extracción de lípidos totales por el método de Soxhlet. **A)** Equipo Soxhlet; **B)** Muestra de biomasa colocada en cartucho de celulosa; **C)** Percolación de etanol a través de la muestra de biomasa durante los primeros ciclos de extracción; **D)** Percolación de etanol a través de la muestra de biomasa durante los últimos ciclos de extracción; **E)** Recuperación de lípidos en balón de vidrio.

La productividad lipídica se calculó como la productividad volumétrica de lípidos totales (PV_{LT}) y la productividad areal de lípidos totales (PA_{TL}) de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$PV_{LT}(g.L^{-1}.día^{-1}) = \frac{BF-PSLC (g.L^{-1}) . LT (%PSLC)}{TALN (día)} \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

$$PA_{LT}(k.ha^{-1}.day^{-1}) = VP_{LT}(g.L^{-1}.day^{-1}) . ICV (L) . \left(\frac{1}{area m^2}\right) . \left(\frac{kg}{1.000 g}\right) . \left(\frac{10000 m^2}{ha}\right) \quad (\text{Ecuación 4.4.})$$

En donde, BF-PSLC es el peso seco final de la biomasa libre de cenizas y TALN es el tiempo de acumulación de lípidos neutros calculado a partir de la cinética del Rojo Nilo (Damiani *et al.* 2014). En resumen, el tiempo de acumulación de

LN es el período durante el cual las señales de RN comienzan a aumentar significativamente hasta la cosecha. PA_{TL} es igual a PV_{TL} multiplicado por el volumen inicial del cultivo (VIC), y dividido por el área del cultivo.

4.2.10. Fraccionamiento de lípidos

La extracción de lípidos totales para el fraccionamiento de lípidos y el fraccionamiento en lípidos neutros (LN), glicolípidos y fosfolípidos se realizó por duplicado de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.7 del Capítulo 2. Los glicolípidos y fosfolípidos de la fracción de lípidos polares (LP) se recogieron y pesaron juntos en el mismo vial.

4.2.11. Determinación del perfil de ácidos grasos

La determinación del perfil de ácidos grasos se realizó de acuerdo a la Sección 2.7.3 del Capítulo 2.

4.2.12. Calidad del biodiésel a partir de perfiles de ácidos grasos

A partir del perfil de ácidos grasos de la fracción neutra, se determinó la calidad del biodiésel que podría obtenerse por la transesterificación de estos ácidos grasos. Las propiedades estimadas fueron: el grado promedio de insaturación (GPI), el índice de yodo (IY, g I₂/100 g de EMAG), el número de cetano (NC), el punto nube (PN, °C), la gravedad específica (GE, Kg/L), la viscosidad cinemática (VC, 40 °C mm²/s) y el valor calorífico superior (VCS, MJ/kg) según Hoekman *et al.* (2012). El factor de saturación de cadena larga (FSCL) y el punto de obstrucción del filtro en frío (POFF, °C) se estimaron según Talebi *et al.* (2013).

Las ecuaciones respectivas fueron las siguientes:

$$GPI = \sum M Y_i$$

$$IY = 74,373 GPI + 12,71$$

$$NC = -6,6684 GPI + 62,876$$

$$PN = -13,356 GPI + 19,994$$

$$GE= 0,0055 \text{ GPI} + 0,8726$$

$$VC= -0,6316 \text{ GPI} + 5,2065$$

$$VCS= 1,7601 \text{ GPI} + 38,534$$

$$\text{FSCL} = (0,1 \times \text{C16:0} + 0,5 \times \text{C18:0} + 1 \times \text{C20:0}) + 1,5 \times (\text{C22:0} + 2 \times \text{C24:0}).$$

$$\text{POFF} = (3,1417 \times \text{FSCL}) - 16,477$$

En donde, Y_i es la fracción porcentual de cada componente de ácido graso (FA por sus siglas en inglés) y M es el número de enlaces carbono-carbono dobles en cada ácido graso.

4.2.13. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó un análisis de varianza simple (ANOVA) y la prueba DMS mediante el software Infostat.3. En todas las pruebas, el nivel de significancia fue $\alpha = 0,05$.

4.3. Resultados

4.3.1. Cinética de Cla y RN, velocidad de crecimiento y producción de biomasa

La evolución temporal del crecimiento y la acumulación de lípidos neutros (LN) de los cultivos *outdoor* de verano y primavera de *H. coffeaeformis* se muestra en la Fig. 4.8. La velocidad de crecimiento y la productividad de biomasa de la especie fueron similares en los dos experimentos, aunque la acumulación de LN comenzó antes en el cultivo de verano. Durante el verano, la IF-Cla (Fig.4.8 A) aumentó desde el día 0 hasta el día 10; mientras que la IF- RN aumentó significativamente desde el día 8 ($F = 19,69$; $p < 0,05$). Para determinar cuándo se produjo el desequilibrio a favor de la acumulación de TAG, se seleccionó el momento en el que la relación IF-RN:IF-Cla superó un umbral de 40. Así, la cosecha se realizó el día 13, cuando la relación IF-RN:IF-Cla alcanzó un valor de 60 (Fig. 4.8 A). El tiempo de acumulación de LN fue de 6 días (del día 8 al día

13). Durante el ensayo, la densidad celular de *H. coffeaeformis* (Fig. 4.8 B) mostró un crecimiento exponencial desde el día 0 hasta el día 3. La velocidad de crecimiento (k) fue de $1,39 \text{ div.día}^{-1}$. Las productividades volumétricas y áreales de biomasa al final de la fase de crecimiento exponencial fueron aproximadamente de $0,039 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ y $68,25 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{día}^{-1}$, respectivamente.

La duración del cultivo de primavera fue mayor que la del cultivo de verano. Esto se debió a que la acumulación de LN comenzó más tarde. Durante primavera, la IF-Cla (Fig. 4.8 C) aumentó hasta el día 3, permaneció en una fase estacionaria hasta el día 12 y luego disminuyó hasta el día 27. La IF-RN aumentó significativamente a partir del día 19 ($F = 19,97$; $p < 0,05$) y la relación IF-RN:IF-Cla solo superó el umbral de 40 el día 27, cuando se realizó la cosecha. Así, el tiempo de acumulación de LN fue de 9 días (del día 19 al día 27). Durante el ensayo, la densidad celular (Fig. 4.8 D) mostró una fase de crecimiento exponencial desde el día 0 hasta el día 4. El valor de k fue de $1,31 \text{ div.día}^{-1}$. Las productividades volumétricas y áreales de biomasa al final de la fase de crecimiento exponencial fueron aproximadamente de $0,031 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ y $54,25 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{día}^{-1}$, respectivamente. Ninguno de los dos cultivos presentó una fase de retardo (fase lag) ni una fase de declinación marcada de la densidad celular o el peso seco (Fig. 4.8 B y D). Ambas características representan una ventaja a nivel de producción de biomasa.

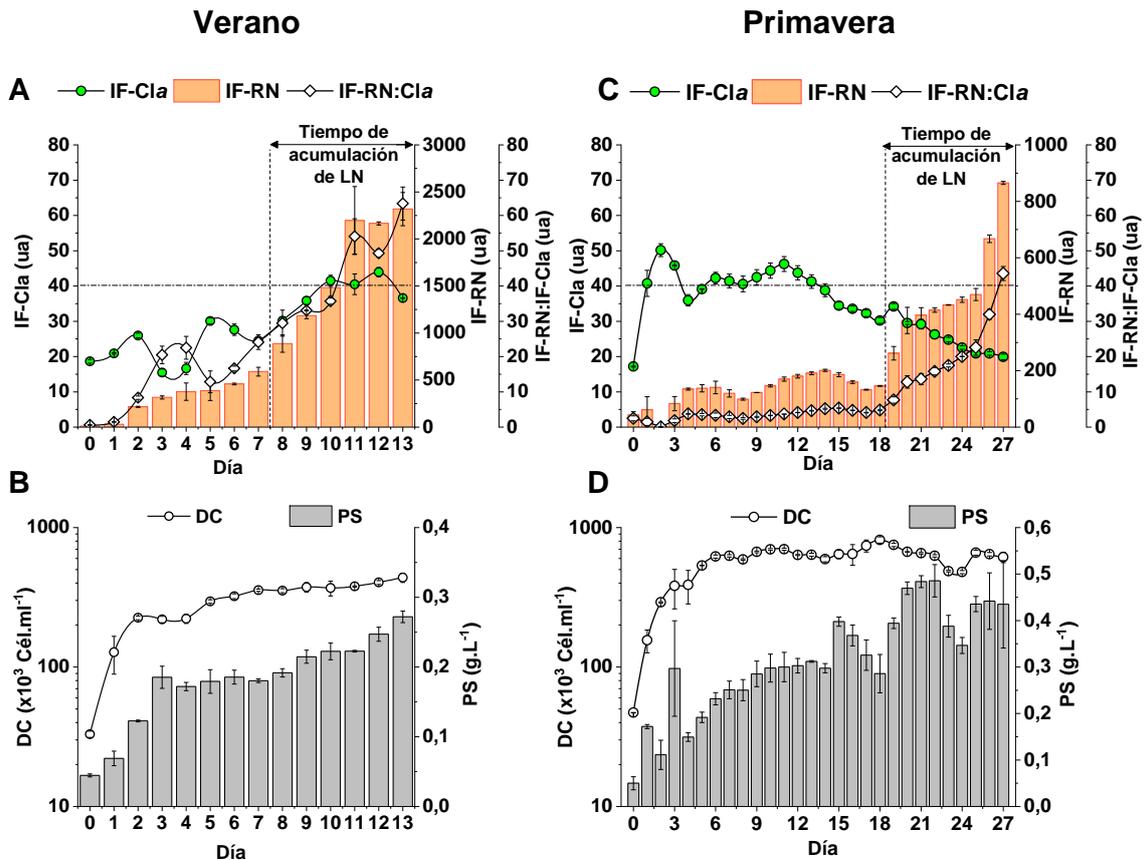


Figura 4.8. Crecimiento y acumulación de lípidos neutros de cultivos a cielo abierto de *H. coffeaeformis*: **(A y B)** Cultivo de verano, **(C y D)** Cultivo de primavera. **(A y C)** Cinética de la intensidad de fluorescencia de la clorofila-a (IF-Cla), intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo (IF-RN) y relación IF-RN:IF-Cla. La intensidad de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias (ua). **(B y D)** Cinética de la densidad celular (CD) y producción de biomasa (peso seco, PS). La línea vertical punteada en las Figs. A y B indica el inicio de la fase de acumulación de LN. La línea horizontal punteada en las Figs. A y B indica el umbral de 40 de la relación IF-RN:IF-Cla. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar de 2 réplicas ($n = 2$).

4.3.2. Clima y condiciones fisicoquímicas del cultivo durante los ensayos a cielo abierto

Las variables fisicoquímicas de los cultivos a cielo abierto de *H. coffeaeformis* en relación con el clima se muestran en la Fig. 4.9. El cultivo de verano, se caracterizó por temperaturas medias del agua que oscilaron entre 13,3 °C y 23,7 °C (Fig. 4.9 A), con valores máximos siempre por debajo del límite de tolerancia

de la especie (35,7 °C) (ver Capítulo 2). EL PAR diario medio (Fig. 4.9 A) presentó valores relativamente constantes ($\sim 1300 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) hasta el día 10, para luego disminuir a $161 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, reflejando días nublados. La salinidad (Fig. 4.9 B) aumentó progresivamente desde 32,1 ‰ hasta 48,2 ‰, indicando la disminución en la profundidad (de 19,2 cm a 13,4 cm) debido a la evaporación del agua. Además, los valores de salinidad no se vieron significativamente afectados por los niveles de precipitación. El cultivo de primavera, se caracterizó por temperaturas medias del agua (Fig. 4.9 C) entre 14,5 °C y 26,3 °C. Los valores máximos de temperatura del agua superaron a los valores de temperatura máxima del aire a partir del día 21. Estas temperaturas fueron más altas que el límite máximo de tolerancia de la especie (35,7 °C) (ver Capítulo 2;). El PAR diario medio (Fig. 4.9 C) presentó importantes variaciones a lo largo del ensayo, en correspondencia con días lluviosos. La salinidad (Fig. 4.9 D) aumentó desde 33,6 ‰ hasta 102,8 ‰, reflejando una disminución adicional en la profundidad (de 19,7 cm a 5,4 cm). Sin embargo, es importante destacar que durante los primeros 10 días del cultivo, la salinidad disminuyó desde 33 ‰ a 26,4 ‰ y el cultivo no mostró signos de estrés, compatibles con los valores de RN (Fig. 4.8 C). Además, los valores de salinidad fueron superiores a 40 ‰ recién a partir del día 14, alcanzando 102,8 ‰ en el día de la cosecha.

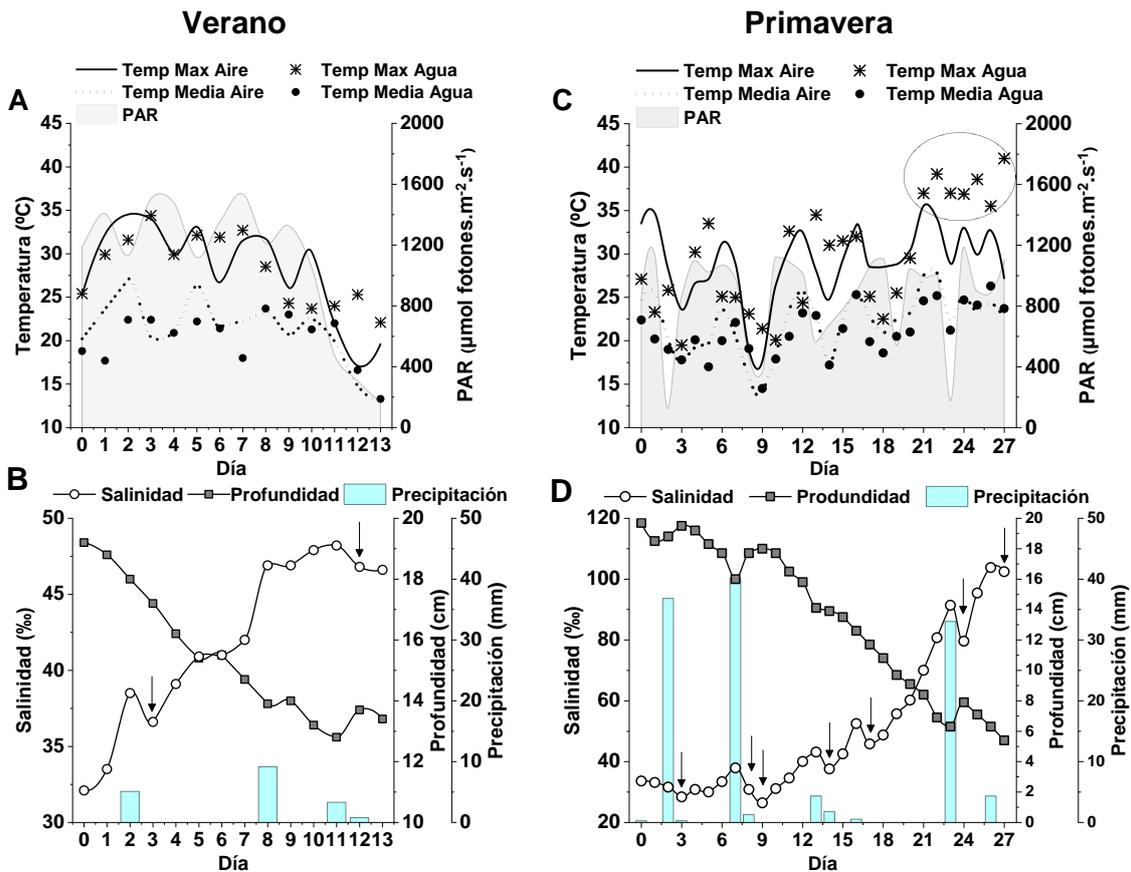


Figura 4.9. Clima y variables fisicoquímicas de los cultivos *outdoor* de *H. coffeaeformis*: (A y B) Cultivo de verano, (C y D) Cultivo de primavera. (A y C) Temperatura del aire (°C), temperatura del agua (°C) y PAR ($\mu\text{mol fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). (B y D) Salinidad (‰), profundidad (cm) y precipitación (mm). El círculo en la Figura C indica temperaturas del agua que exceden el límite de tolerancia máxima de la especie. Las flechas en las Figuras B y D indican disminución en los valores de salinidad después de eventos de precipitación.

4.3.3. Cinética de nutrientes inorgánicos disueltos

La cinética de los nutrientes inorgánicos disueltos de los cultivos de *H. coffeaeformis* se muestra en la Fig. 4.10. Es importante destacar que el medio BAY presenta dos especies de N, nitrato y amonio y una fuente de P como fosfato, mientras que la fuente de Si fue incorporada como silicatos. En el cultivo de verano, el nivel de NO_3^- (Fig. 4.10 A) disminuyó un 54 % a lo largo del experimento (de 469 μM a 214 μM). El nivel de NH_4^+ (Fig. 4.10 A) disminuyó un 97 % durante la fase de crecimiento exponencial (de 693 μM a 14 μM), y luego disminuyó gradualmente a 4 μM el día de la cosecha. Los niveles de fosfato y

silicato (Fig. 4.10 B) disminuyeron un 87 % (de 131 μM a 16,5 μM) y un 92 % (de 184 μM a 13 μM), respectivamente, durante la fase de crecimiento exponencial, y luego permanecieron relativamente constantes hasta el día de la cosecha.

En el cultivo de primavera, el nivel de NO_3^- (Fig 4.10 C) presentó valores relativamente estables hasta el día 18, para luego disminuir un 95 % (de 377 μM a 19 μM) hasta el día de la cosecha. El nivel de NH_4^+ (Fig. 4.10 C) disminuyó un 90 % (de 984 μM a 99 μM) hasta el día 18, y luego disminuyó a 14,8 μM el día de la cosecha. Los fosfatos y silicatos (Fig. 4.10 D) presentaron un comportamiento más variable, pero con una tendencia decreciente. El fosfato disminuyó un 89 % (de 129 a 14 μM) y los silicatos disminuyeron un 92 % (de 170 a 13 μM) durante los ensayos. En particular, las etapas de recuperación en el nivel de silicatos fueron coincidentes con días de intensa precipitación (Fig. 4.10 D) en donde la salinidad del cultivo disminuyó (Fig. 4.9 D). Cabe destacar que ninguno de los dos cultivos (verano y primavera) alcanzaron valores de nutrientes limitantes del crecimiento en comparación con las concentraciones promedio indicadas por Sarthou *et al.* (2005) para el crecimiento de diversas especies de diatomeas (Fig. 4.10).

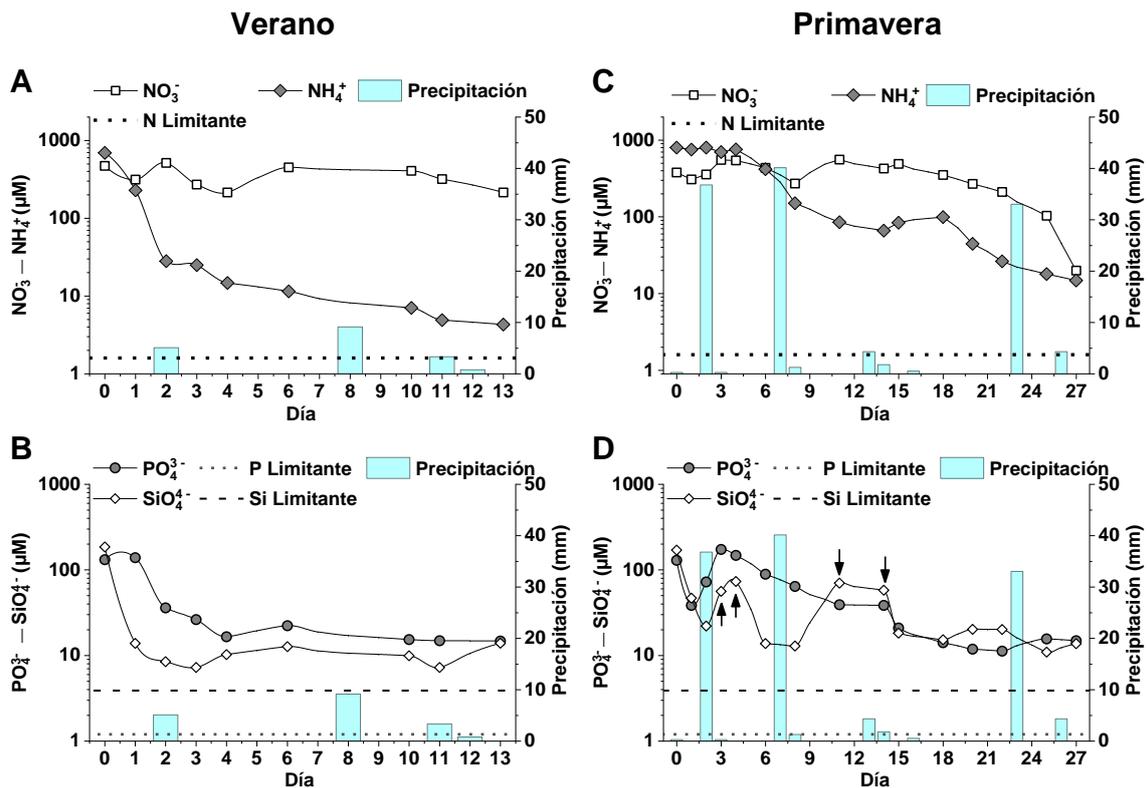


Figura 4.10. Cinética de nutrientes inorgánicos disueltos de cultivos a cielo abierto de *H. coffeaeformis*: **(A y B)** Cultivo de verano, **(C y D)** Cultivo de primavera. **(A y C)** Nitrato (μM) y amonio (μM) disueltos. **(B y D)** Fosfato (μM) y silicatos (μM) disueltos. Se muestran los valores promedio de limitación de nutrientes para el crecimiento de diatomeas ($\text{N} < 1,6 \pm 1,9 \mu\text{M}$; $\text{P} < 1,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$ y $\text{Si} < 3,9 \pm 5,0 \mu\text{M}$) de acuerdo con Sarthou *et al.* (2005) (líneas discontinuas). Las flechas en la Figura D indican la recuperación de los niveles de silicatos después de eventos de precipitación. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar de 2 réplicas ($n = 2$).

4.3.4. Cantidad y calidad de lípidos

Con el objetivo de conocer la cantidad de lípidos totales (LT) de las células al comienzo de los cultivos, se determinó el contenido lipídico de los inóculos incorporados a las piletas el día 0 del cultivo *outdoor*. La producción de inóculos para los cultivos de verano y primavera se realizó bajo las mismas condiciones controladas en fotobiorreactor, siendo el contenido de LT de $9,8 (\pm 0,1) \%$ de PSLC. Por su parte, el contenido de LT al final de los ensayos a cielo abierto, varió de acuerdo al escenario ambiental al que estuvieron sujetos los cultivos. Así, la biomasa cosechada en verano presentó un contenido de LT de $44,4 (\pm 0,004) \%$ PSLC en 14 días (4 veces superior al contenido de LT del inóculo);

mientras que la biomasa cosechada en primavera presentó un contenido de LT de $37,5 (\pm 0,015)$ % PSLC en 27 días (3,75 veces los LT del inóculo). Las productividades lipídica volumétricas fueron de $0,0153 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ en verano y $0,0148 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ en primavera; mientras que las productividades lipídicas áreales fueron de $26,05 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{día}^{-1}$ en verano y $25,22 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{día}^{-1}$ en primavera.

Con respecto a las fracciones lipídicas, los porcentajes de lípidos neutros [LN] y polares [LP] de la biomasa cosechada variaron significativamente con respecto a las fracciones lipídicas de los inóculos ($F = 18,11$; $p < 0,01$) (Fig. 4.11 A). Se observó un marcado aumento en la relación LN:LP en ambos cultivos; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre estaciones. Los valores obtenidos fueron: LN (cultivo de verano = 72,3 % de LT; cultivo de primavera = 65,8 % de LT) y LP (cultivo de verano = 27,6 % de LT; cultivo de primavera = 34,2 % de LT).

Con respecto al porcentaje de las clases de ácidos grasos presentes en los LN (Fig. 4.11 B), tanto la biomasa cosechada en verano como en primavera mostró un aumento significativo en el porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS) (Fig. 4.11 B) en comparación con los inóculos. Así los porcentajes de AGS de los cultivos de verano y primavera fueron de 31,36 % y 33,42 % de LN, respectivamente. Este aumento se debió al incremento del ácido mirístico (C14:0) (cultivo de primavera) y ácido palmítico (C16:0) (cultivos de verano y primavera) (Fig. 4.11 C). Por su parte, el cultivo de primavera presentó el mayor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) (47,85 % de LN), con un aumento del 26 % de LN respecto del inóculo (Fig. 4.11 B). Tanto los cultivos de verano como de primavera presentaron un aumento significativo del ácido palmitoleico (C16:1 ω -7), mientras que el ácido oleico (C18:1 ω -9c) fue el AGMI dominante en los inóculos (Fig. 4.11 C). Finalmente, los cultivos de verano y primavera mostraron una disminución significativa de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de los LN con respecto al inóculo (AGPI_{inóculo}: 34,5% AGPI_{Verano}: 28,2 %, AGPI_{Primavera} y 18,7% %) (Fig. 4.11 B), debido en particular a una disminución del ácido eicosapentaenoico (C20:5 ω -3, EPA) (Fig. 4.11 C).

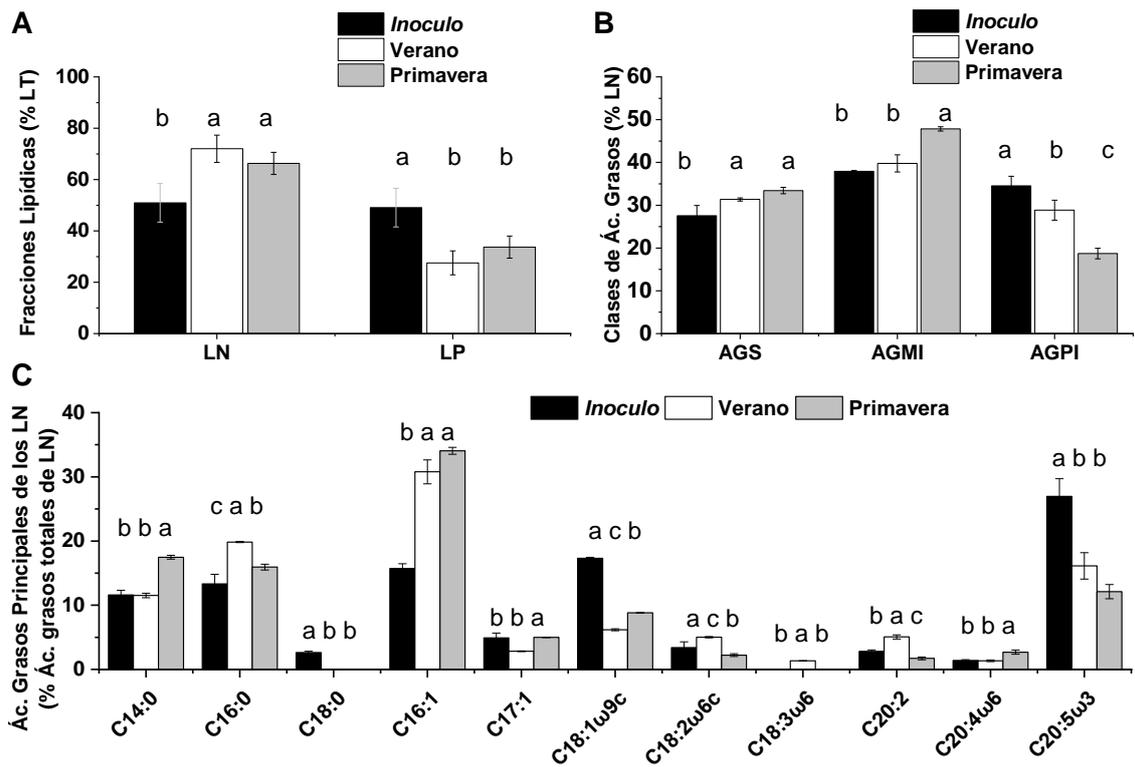


Figura 4.11. Fracciones lipídicas, clases de ácidos grasos y perfiles de ácidos grasos de los cultivos a cielo abierto de *H. coffeaeformis*. **(A)** Fracciones lipídicas (LN, lípidos neutros; LP, lípidos polares), expresadas como % de LT. Los datos representan un promedio \pm desviación estándar de 2 réplicas ($n = 2$). **(B)** Clases de ácidos grasos (AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; y AGPI, ácidos grasos poliinsaturados), expresadas como % de LN. **(C)** Perfil de los principales ácidos grasos, expresados como % del total de ácidos grasos de los LN. Los datos representan un promedio \pm desviación estándar de 4 réplicas ($n = 4$).

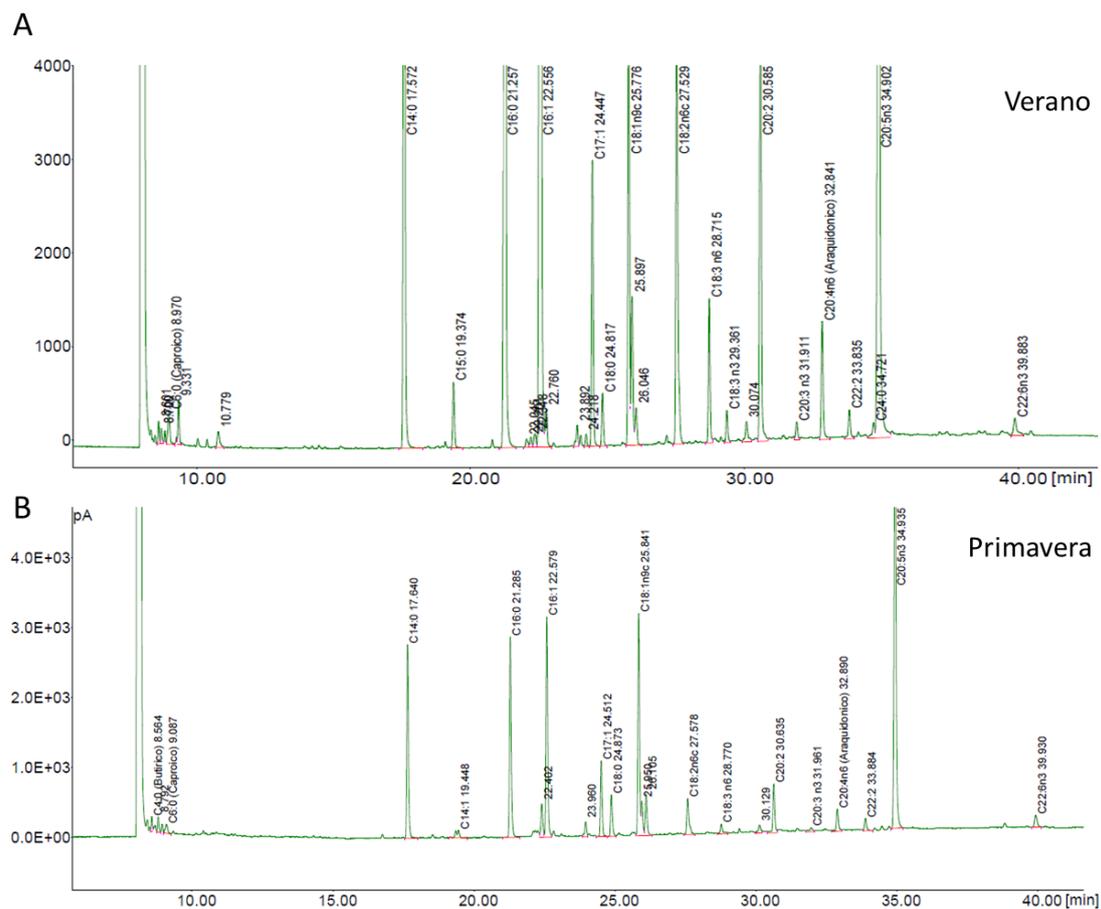


Figura 4.12. Perfil de FAME de los LN de *H. coffeaeformis* en cultivos a cielo abierto de verano (A) y primavera (B), obtenidos por cromatografía gaseosa.

4.3.5. Propiedades del biodiésel estimadas a partir del perfil de ácidos grasos

Las propiedades del biodiésel de *H. coffeaeformis* y de la soja, estimadas a partir de sus perfiles de ácidos grasos, se detallan en la Tabla 4.1. El cultivo de verano mostró: (a) un mayor grado de insaturación (GPI); (b) un mayor poder calorífico (PCS); (c) una mejor viscosidad cinemática (VC); y (d) un mejor punto de obstrucción del filtro en frío (POFF) con respecto a las mismas propiedades del cultivo de primavera. Por su parte, el cultivo de primavera mostró un número de cetano (NC) más alto y un índice de yodo (IY) más pequeño que el cultivo de verano. Los valores medios de las propiedades del biodiésel GPI, IY, NC, GE, VC, PCS de *H. coffeaeformis* fueron similares a los de la soja, excepto por FSLC y POFF, que mostraron mejores valores en la diatomea. Los valores de FSLC ($1,79 \pm 0,202$) y POFF ($-10,82^{\circ}\text{C} \pm 0,635$) del aceite de *H. coffeaeformis*, permitiría producir un biodiésel con mejores rendimientos a bajas temperaturas con respecto a un biodiésel producido a partir de aceite de soja, cuyos valores de FSLC y POFF fueron mayores.

Tabla 4.1. Propiedades del biodiésel estimadas a partir de los perfiles de ácidos grasos de *H. coffeaeformis*, cultivada en piletas tipo *raceway* a cielo abierto con agua de mar, y las correspondientes al aceite de soja. Grado de insaturación (GPI), índice de yodo (IY, I₂/100g), número de cetano (NC), punto nube (PN, °C), gravedad específica (GE, Kg/L), viscosidad cinemática (VC, mm²/s), valor calorífico superior (VCS, MJ/Kg), factor de saturación de cadenas largas (FSCL) y punto de obstrucción del filtro en frío (POFF, °C).

	Aceite de <i>Halimolobos coffeaeformis</i>			Aceite de Soja	
	[Este estudio]			(Knothe <i>et al.</i> 2018)	(Ivanov <i>et al.</i> 2010)
	Verano Media (± DE) (n=4)	Primavera Media (± SD) (n=4)	Promedio (± DE) (Verano & Primavera)	Rango (Múltiples valores)	Promedio (± SD) (n=3)
GPI	1,50 (± 0,085)	1,27 (± 0,047)	1,38 (± 0,137)	1,46 - 1,62*	1,44 (± 0,020) *
IY (gI ₂ /100g)	124,16 (± 6,343)	107,15 (± 3,504)	115,68 (± 10,184)	121,29 - 133,19*	119,74 (± 1,504) *
NC	52,88 (± 0,568)	54,40 (± 0,314)	53,64 (± 0,913)	48 - 56	53,28 (± 0,135) *
PN (°C)	-0,02 (± 1,139)	3,03 (± 0,629)	1,5 (± 1,829)	(-1,64) - 0,49*	0,77 (± 0,270) *
GE (Kg/L)	0,88 (± 0,0004)	0,88 (± 0,0002)	0,88 (± 0,0007)	0,880-0,881*	0,88 (± 0,0001) *
VC (mm ² /s)	4,26 (± 0,054)	4,40 (± 0,029)	4,33 (± 0,086)	4,0 - 4,3	4,29 (± 0,013) *
VCS (MJ/Kg)	41,17 (± 0,150)	40,77 (± 0,083)	40,97 (± 0,241)	41,1 - 41,38*	41,07 (± 0,035) *
FSCL	1,98 (± 0,009)	1,59 (± 0,044)	1,79 (± 0,202)	4,6 - 6,2*	6,25 (± 1,034) *
POFF (°C)	-10,21 (± 0,029)	-11,44 (± 0,139)	-10,82 (± 0,635)	(-2) - 3	3,20 (± 3,247) *

*Estos valores fueron calculados a partir de los valores de ácidos grasos reportados en los artículos citados.

4.4. Discusión

El desarrollo de cultivos bioenergéticos de diatomeas con fines comerciales enfrenta muchos desafíos, al igual que con otras microalgas, incluyendo los costos de capital y mantenimiento (Wang & Seibert 2017). La selección de especies robustas, su adaptación a las condiciones climáticas del lugar y el uso de insumos económicos son algunos de los principales desafíos a resolver. En este estudio, se demostró que *H. coffeaeformis* puede crecer y acumular triglicéridos óptimos para la producción de biodiésel en piletas tipo *raceway* a cielo abierto mediante el uso de agua de mar enriquecida con un biofertilizante y Si. El estuario de Bahía Blanca es un estuario marino ubicado en el hemisferio sur, en la región semiárida de la Pampa argentina. El clima presenta variaciones estacionales y diarias típicas de regiones templadas, que son generalmente definidas como entornos con precipitaciones moderadas distribuidas a lo largo del año o parte del año, con sequías esporádicas, veranos suaves a cálidos e inviernos fríos (Simmons *et al.* 2015). La precipitación anual promedio en la zona estudiada entre 2010 y 2021 fue de 568,7 mm, un valor típico para regiones semiáridas (Kasanin-Grubin *et al.* 2018). Las estaciones más favorables para el cultivo de *H. coffeaeformis* fueron el verano y la primavera. Durante estos períodos, las temperaturas medias fueron moderadas, oscilando entre 10 °C y 30 °C, sin alcanzar temperaturas medias superiores a 30 °C o inferiores a 5 °C, correspondiendo así al rango de temperatura tolerado por la especie (ver Capítulo 3 de esta Tesis;). Este rango térmico es mayor que el de otras diatomeas cultivadas a cielo abierto en latitudes similares. Por ejemplo, *Fistulifera solaris* y *Mayamaea* sp. presentaron rangos de crecimiento entre 20 °C y 35 °C y entre 10 °C y 28 °C, respectivamente (Matsumoto *et al.* 2017). Por otro lado, cabe mencionar que *H. coffeaeformis*, a escala de laboratorio, presentó su velocidad de crecimiento más baja (0,43 div.d⁻¹) a 5 °C (ver Capítulo 3;), por lo que se espera que cultivos desarrollados en otoño e invierno produzcan valores de biomasa más bajos. Sin embargo, *H. coffeaeformis* tiene una mayor tolerancia a bajas temperaturas que *Mayamea* sp. JPCCTDA0820, la cual fue seleccionada para desarrollar cultivos bioenergéticos durante los meses invernales en Kitakyusyu, Fukuoka, Japón (Matsumoto *et al.* 2017). La temperatura de los cultivos en *raceways* a cielo abierto es afectada directamente

por la luz solar y la temperatura del aire, y este efecto depende del volumen de cultivo (Borowitzka 2016). A mayor volumen, es decir, mayor masa térmica, menor será el efecto del ambiente sobre la temperatura del cultivo (Borowitzka 2016). Por lo tanto, cuanto más se reduzca el volumen del cultivo, debido a la evaporación, más se verá afectada su temperatura. Este efecto se observó en el cultivo de primavera desde el día 21, cuando el cultivo experimentó una disminución significativa en la profundidad, a menos de 8,4 cm, y las temperaturas del agua superaron los valores máximos de temperatura del aire. Por otro lado, las temperaturas del cultivo de verano siempre se presentaron por debajo de la temperatura máxima del aire. En este caso, la duración del cultivo fue más corta y, por lo tanto, el efecto de la evaporación fue menor. Es importante no llegar a niveles de cultivo muy bajos, en donde el sistema *raceway* pierde su capacidad de moderar la temperatura del cultivo y esto puede llevar a un colapso de la producción (Rodríguez-Miranda *et al.* 2020). En este caso la robustez de la especie evitó el decaimiento del cultivo.

Ante la creciente escasez de agua dulce para consumo humano, el cultivo de especies euritolerantes en agua de mar, se presenta como una alternativa interesante para la producción de aceites para biodiésel. El comportamiento euritolerante de *H. coffeaeformis* y el efecto estresor de la salinidad sobre el crecimiento y acumulación de lípidos neutros han sido analizados en el Capítulo 3 de esta Tesis. En el cultivo de verano, el aumento de la salinidad se mantuvo desde el día 0, alcanzando un valor de 47 ‰ en 8 días. En el cultivo de primavera, la salinidad disminuyó considerablemente en varias ocasiones en coincidencia con niveles de precipitación de 37 mm a 40 mm, por lo que el aumento sostenido de la salinidad comenzó a partir del día 18. Fue posible observar una relación inversa entre la profundidad y la salinidad de los cultivos, es decir, una reducción en la profundidad debido a la evaporación generó un aumento en la salinidad, mientras que un aumento en la profundidad debido a las precipitaciones produjo una reducción en la salinidad. En coincidencia con estas tendencias de la salinidad, la acumulación de TAG comenzó a los 8 días y 19 días en verano y primavera, respectivamente. Así, valores de salinidad iguales o mayores a 45 ‰ produjeron síntomas de estrés en la especie, independientemente de la estación del año. Esta observación corrobora el comportamiento de la cepa estudiada

bajo condiciones controladas de laboratorio (ver Capítulo 2 de esta Tesis), en donde la acumulación de lípidos neutros aumentó en células adaptadas a 45 ‰ con respecto a aquellas que crecían a 20‰ y 33‰. Sin embargo, aunque el cultivo de primavera alcanzó condiciones hipersalinas (tres veces la del agua de mar), su contenido de lípidos neutros no superó el alcanzado por el cultivo de verano. Así, otros factores, pueden haber influido en el grado de acumulación de TAG en los cultivos de *H. coffeaeformis*.

Como se ha mencionado, la acumulación de TAG en microalgas coincide con una disminución en el crecimiento, lo que puede deberse al envejecimiento celular o al estrés causado por diferentes factores, como la salinidad, intensidad de luz y deficiencia de nutrientes (Zulu *et al.* 2018; Aziz *et al.* 2020). En particular, las diatomeas alteran sus vías biosintéticas para la producción de lípidos neutros en respuesta a la edad del cultivo (Popovich *et al.* 2012; Martín *et al.* 2018; Marella *et al.* 2020), limitación de nitrógeno, silicio o fósforo (Hildebrand *et al.* 2014; Levitan *et al.* 2014; Smith *et al.* 2016; Mourya *et al.* 2022), y variaciones en la salinidad del medio (Ishika *et al.* 2018). La acumulación de TAG en el cultivo de verano fue más rápida que en el de primavera, aunque no se observó envejecimiento celular ni una fase de declinación de la densidad celular como fue observada por Martín *et al.* (2018) para cultivos *indoor* de *H. coffeaeformis*. Sin embargo, el cultivo de verano mostró una utilización más eficiente o rápida de los nutrientes disueltos que el cultivo de primavera, lo que podría generar un estrés nutricional. En verano, tanto el amonio, fosfato y silicatos disminuyeron significativamente hasta el día 4, en relación con el crecimiento exponencial del cultivo; mientras que comparativamente, la disminución de los nutrientes en primavera requirió un mayor período (más de 15 días). En cuanto al nitrógeno, el biofertilizante Bayfolan® fue seleccionado para promover el crecimiento, debido a que contiene altas concentraciones de N ($\geq 1000\mu\text{M}$), provenientes de dos fuentes, nitrato y amonio. En presencia de estas dos especies de N, *H. coffeaeformis* mostró una preferencia selectiva por el amonio, independientemente de la estación del año, y este uso fue más eficiente en verano. En general, las microalgas pueden utilizar nitrato y amonio, sin embargo, si ambas formas están presentes, utilizan prioritariamente el NH_4^+ , dado que su absorción e incorporación a las rutas metabólicas es menos costosa

energéticamente que incorporar nitrato. Por el contrario, el NO_3^- debe ser reducido a amonio, antes de ser utilizado, y esto demanda un gasto energético significativo para la célula (Gilbert *et al.* 2016). Además, el amonio puede acumularse espontáneamente en compartimentos celulares ácidos, como, por ejemplo, en tilacoides del cloroplasto (Cai *et al.* 2013; Gutierrez *et al.* 2016). En el presente estudio, la utilización de amonio fue más rápida en verano, sin embargo, no alcanzó valores limitantes [$\text{N} < 1,6 \pm 1,9 \mu\text{M}$ (Sarhou *et al.* 2005)]. Además, en ambos cultivos quedó un *stock* de nitrato disponible para el crecimiento, por lo que la fuente de N no se presentó como un potencial estresor de los cultivos.

Por su parte, la escasez de silicio también puede inducir la acumulación de TAG en diatomeas (Popovich *et al.* 2012a; Levitan *et al.* 2014), al afectar la síntesis de la pared celular o frústulo y limitar de esa manera la división celular. Como se ha mencionado, el biofertilizante utilizado no presenta Si en su composición, por lo tanto el silicato fue incorporado en una proporción Si:N de 0,125. Esta proporción fue seleccionada con el fin de generar una temprana acumulación de TAG debido a la deficiencia de Si (ver Capítulo 3 de esta Tesis,). En el cultivo de verano, los silicatos disminuyeron abruptamente con el crecimiento hasta el día 3, alcanzando valores cercanos al valor limitante para diatomeas [$\text{Si} < 3,9 \pm 5,0 \mu\text{M}$ (Sarhou *et al.* 2005)]. Así, este nutriente cumpliría un rol clave, junto con la salinidad, en optimizar la acumulación de TAG en los cultivos de *H. coffeaeformis*. Por su parte, en los primeros quince días del cultivo de primavera, si bien los silicatos mostraron una tendencia negativa, en correspondencia con el crecimiento, también presentaron eventos de recuperación. Dichos eventos coincidieron con períodos de precipitación, en donde la salinidad disminuyó por debajo de 33‰. De acuerdo con Baek *et al.* (2009) la salinidad tiene un efecto inverso sobre la disolución de los silicatos y fosfatos y, en consecuencia, sobre la disponibilidad de estos nutrientes (Baek *et al.* 2009). Así, la disminución de la salinidad al comienzo del cultivo de primavera, en sintonía con los eventos de precipitación, podría haber aumentado la disolución del silicato y fosfato, y consecuentemente haber generado un alivio del estrés nutricional y un retraso en la acumulación de TAG en la especie estudiada. De acuerdo con este escenario, valores de precipitación ≥ 30 mm tendrían un efecto sinérgico en los cultivos de

H. coffeaeformis sustentados con agua de mar, disminuyendo la salinidad y aumentando la disponibilidad de silicatos y fosfato. Esta sinergia podría explicar el retraso en la acumulación de TAG en el cultivo de primavera. Considerando esta información para el desarrollo de cultivos bioenergéticos masivos de la cepa estudiada, la adición automatizada de pulsos de agua de mar podría ser una estrategia inteligente para optimizar la producción de lípidos neutros, compensando la pérdida de agua por evaporación, manteniendo el efecto amortiguador del agua sobre la temperatura, reduciendo la concentración de nutrientes por dilución y aumentando la salinidad.

En el presente estudio, la relación IF-RN:IF-Cla constituyó un índice útil y rápido para determinar el grado de desbalance máximo entre el crecimiento (IF-RN:IF-Cla <40) y la acumulación de lípidos neutros (IF-RN:IF-Cla >40) en los cultivos de *H. coffeaeformis* y, consecuentemente, para determinar el momento óptimo para realizar la cosecha. Valores de IF-RN:IF-Cla < 40 caracterizaron los primeros 10 días y 25 días de los cultivos de verano y primavera, respectivamente. Ambos cultivos mostraron prácticamente el mismo patrón de crecimiento, no presentaron fase lag y la fase de crecimiento exponencial fue corta y de unos pocos días, lo que indica una adecuada respuesta de la especie al medio nutricio seleccionado. Por su parte, la fase estacionaria fue prolongada y no se observó un decaimiento de la densidad celular, lo que indica que no existió un déficit nutricio agudo en ninguno de los dos cultivos, con excepción del Si en el cultivo de verano. La producción de biomasa también mostró un patrón similar en ambos cultivos, con valores de 0,3 g.L⁻¹ y 0,45 g.L⁻¹ en verano y primavera, respectivamente. Estos rendimientos de biomasa fueron más altos que los obtenidos en cultivos *indoor* con f/2 de la misma cepa (0,22 a 0,23 g.L⁻¹) (Martín *et al.* 2016, 2018) y similares o ligeramente más altos que los obtenidos para otros cultivos bioenergéticos de diatomeas a cielo abierto, como *Fistulifera solaris* y *Mayamaea* sp. JPCC CTDA0820 (0,18 – 0,33 g.L⁻¹ y 0,29 g.L⁻¹, respectivamente) (Matsumoto *et al.* 2017; Sato *et al.* 2014). El aumento en la producción de biomasa en el presente estudio puede atribuirse a la robustez de la especie como también al biofertilizante utilizado. Por su parte, los valores de IF-RN:IF-Cla > 40 que caracterizaron la finalización del cultivo de verano (tres últimos días) y de primavera (último día), contribuyeron a detectar la etapa neta

de acumulación de TAG y consecuentemente el momento óptimo para realizar la cosecha.

Como se ha mencionado, para optimizar un cultivo bioenergético de microalgas es importante obtener altos porcentajes de aceites con una elevada proporción de LN respecto a los LP, y que esos LN presenten una mayor proporción de ácidos grasos saturados (AGS) y monoinsaturados (AGMI), que de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Knothe, 2005 y 2008). Además, el perfil de los ácidos grasos es importante para estimar la calidad del biodiésel (Hoekman *et al.* 2012; Talebi *et al.* 2013). Los cultivos desarrollados en este estudio, independientemente de la estación del año, mostraron un aumento significativo de los LN (66%-72%) en relación con los aceites de los inóculos (LN~LP~50%), Además, los TAG presentaron porcentajes dominantes de AGS (~32 %) y AGMI (~44 %), en relación con los AGPI (~24 %). Los AGS estuvieron dominados por C14:0 y C16:0; los AGMI por C16:1 ω -7; y los AGPI por EPA. En forma comparativa, el aceite de soja, usado comercialmente para producir biodiésel comercial, presenta un alto porcentaje de AGPI (~60 %), dominado por los ácidos linoleico (C18:2 ω -6, 49–57 %) y linolénico (C18:3 ω -6, 6–9 %) (Knothe 2008), seguido por un ~20 % de AGS, dominado por C16:0 (10–12 %) y C18:0 (3–5 %) (Knothe 2008; Ivanov *et al.* 2010), y ~20 % de AGMI, representado principalmente por el C18:1 ω -9 (18–26 % de los ácidos grasos totales). De acuerdo con esta información, la calidad del biodiésel fue estimada. El número de cetano (NC) es un descriptor relacionado con la calidad de ignición de un combustible en motores diésel. Cuanto mayor sea este NC, mejor será la calidad de ignición del combustible (Knothe 2008). Los aceites con predominio de AGS y AGMI por sobre AGPI confieren un NC más alto al biodiésel (Knothe 2008; Hoekman *et al.* 2012). Por ejemplo, los ésteres metílicos predominantes en los LN de los aceites de *H. coffeaeformis*, cultivada en primavera y verano, fueron el palmitato de metilo (C16:0) y el palmitoleato de metilo (C16:1 ω -7), los cuales presentan un NC de 85,9 y 56,59, respectivamente. Por su parte, el éster metílico predominante del aceite de soja es el linoleato de metilo (C18:2 ω -6), que tiene un NC de 38,2. Así, el NC del biodiésel producido a partir de aceites de *H. coffeaeformis* debería presentar un mejor punto de ignición que el biodiésel obtenido a partir del aceite de soja. Además, el aceite de *H. coffeaeformis*

presentó valores de FSCL y POFF inferiores a los de la soja, indicando que un biodiésel producido por este aceite presentaría cualidades superadoras a bajas temperaturas (Knothe 2008). Por su parte, el IY, VC y GE calculados para los aceites de *H. coffeaeformis* cumplen con los estándares establecidos por Europa (EN 14214) y los EE. UU. (ASTMD 6751–08).

Los rendimientos lipídicos de *H. coffeaeformis* fueron superiores en comparación con otras microalgas como, *Scenedesmus accuminatus* (Koley *et al.* 2019), *Chlorella sorokiniana* (Menegazzo *et al.* 2020), *Chlorella minutissima* (Sonkar *et al.* 2020) y *Amphora coffeaeformis* RR03 (Rajaram *et al.* 2018), pero similares a *Amphora* sp. MUR258 (Indrayani *et al.* 2019) y *S. obliquus* (Turpin) Kützing GA 45 (Bagchi *et al.* 2019). Los cultivos argentinos de soja tienen un rendimiento anual de biomasa estimado de 2591 kg. ha⁻¹ y un rendimiento anual de aceite de 471–487 kg.ha⁻¹ (Panichelli *et al.* 2008). Proyectando el rendimiento lipídico diario de los cultivos a cielo abierto de *H. coffeaeformis* a dos meses, se obtendría un rendimiento de aceites de 636 kg. ha⁻¹. Es importante aclarar que esta proyección no fue anualizada, ya que esto habría requerido información más detallada sobre el comportamiento de los cultivos de esta especie durante los meses menos favorables. Sin embargo, dado que en dos meses *H. coffeaeformis* mostró valores de rendimiento de aceites más altos que los de la soja durante todo el año, incorporar datos correspondientes a los meses desfavorables sólo aumentaría la diferencia a favor de la cepa estudiada. Por su parte, el cultivo de soja presenta una fuerte estacionalidad con un ciclo de seis meses, dejando el suelo en barbecho durante el invierno. En contraste, *H. coffeaeformis* puede ser cultivada durante la mayor parte del año, ya que puede crecer cuando la temperatura del agua es de aproximadamente 5°C o más alta (Ver Capítulo 3;). Además, los cultivos bioenergéticos convencionales, como los de soja o palma, generan cambios directos e indirectos en el uso de la tierra (Correa *et al.* 2019, Uusitalo *et al.* 2014). Estos cambios afectan los sumideros naturales de carbono, como los bosques, generando grandes emisiones netas de carbono relacionadas con el cambio en el uso de la tierra de bosque a tierra cultivada (Correa *et al.* 2019). Además, la capacidad de autoflocular de *H. coffeaeformis* genera un ahorro energético a la hora de realizar la cosecha, y también permite recuperar

el agua para su posterior reutilización, disminuyendo la huella hídrica del proceso.

Por último, luego del proceso de extracción de lípidos de la biomasa de *H. coffeaeformis*, se obtuvieron residuos conformados por las paredes celulares. Debido a su naturaleza silíceas, las paredes celulares pudieron recuperarse íntegramente y analizarse para evaluar su potencial uso. En particular, las industrias nanotecnológicas y de materiales se presentan como candidatas debido a su interés en la obtención renovable de sílice amorfa nanoporosa (Bayu *et al.* 2020). Así, en el Capítulo 6 de esta Tesis se analizarán las propiedades de sus paredes celulares con el fin de evaluar su potencial uso comercial.

4.5. Conclusión

La implementación de cultivos masivos de microalgas para la producción de biodiésel a escala regional requiere principalmente de selección de cepas oleaginosas, robustas y adaptadas a las condiciones climáticas del lugar. También es importante diseñar procesos sustentables basados en el uso del agua, los aportes nutricios y las condiciones ambientales que promueven la acumulación de TAG, necesarios para la producción de biodiésel. Este estudio demuestra la capacidad de *H. coffeaeformis* de crecer y producir TAG en piletas tipo *raceway* a cielo abierto, sustentadas con agua de mar y un biofertilizante rico en N. Usando este medio de cultivo, se determinó que la salinidad es un factor que puede modular la acumulación de TAG en la especie, en particular en regiones áridas y/o semiáridas en donde los eventos de precipitación son escasos. Las precipitaciones por encima de los 40 mm relajaron el efecto estresante de la salinidad y deben tenerse en cuenta en los cultivos a cielo abierto para anticipar fluctuaciones en el rendimiento lipídico. Además, una relación Si:N <0,5 debe ser considerada al inicio del cultivo con el fin de acelerar el proceso de acumulación de TAG. Dado que *H. coffeaeformis* es cosmopolita, sería importante evaluar el comportamiento de otras cepas de esta especie, con el fin de evaluar su potencial uso para el desarrollo de cultivos bioenergéticos en otros entornos áridos o semiáridos, con acceso a agua de mar, de acuerdo con las consideraciones del presente estudio (Fig. 4.12)

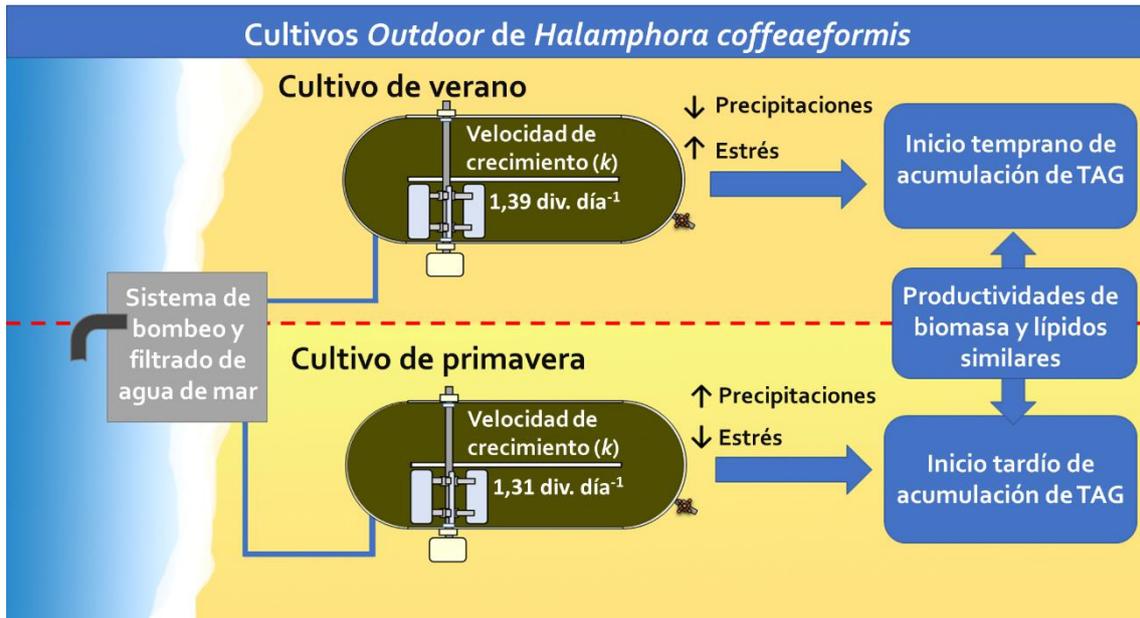


Figura 4.12. Representación esquemática de los cultivos de verano y primavera de *H. coffeaeformis*, indicando su tasa de crecimiento (k), el nivel de precipitaciones, y la demora en el inicio de acumulación de TAG.

Capítulo 5 – Análisis ultraestructural de la acumulación de triglicéridos en *Halamphora coffeaeformis* cultivada a cielo abierto

5.1. Introducción

Las diatomeas se clasifican dentro de la división Ochrophyta (Cavalier-Smith 1986; Adl *et al.* 2005) y como tales, poseen varias características ultraestructurales en común con otras algas de esta división. Las mitocondrias poseen crestas tubulares; los cloroplastos son complejos y están rodeados por cuatro unidades de membranas; y los tilacoides están dispuestos en lamelas tritilacoidales (Lepetit *et al.* 2012). En los organismos autótrofos, en general, el cloroplasto es una organela originada por un evento de endosimbiosis (Huang & Gogarten 2007), que cumple las funciones de fijar carbono y generar biomasa, mediante el proceso de fotosíntesis (Miller *et al.* 2020). En las diatomeas, en particular, el cloroplasto se originó como resultado de un evento de endosimbiosis secundaria, en donde una célula eucariota heterótrofa ancestral ingirió un alga roja, dejándola viva en su interior, de manera que el endosimbionte eucariota con el tiempo se convirtió en un nuevo cloroplasto, rodeado de cuatro membranas (Marechal *et al.* 2019; Scarsini *et al.* 2019). Como se ilustra en la Fig. 5.1, en el cloroplasto de las diatomeas se puede observar, desde el lumen del estroma hacia el citosol: la membrana interna de la envoltura plastidial (MIP), la membrana externa de la envoltura plastidial (MEP), la membrana periplastidial (MPP) y la membrana del retículo endoplasmático cloroplástico (MREC) (Flori *et al.* 2016; Maréchal *et al.* 2019). Además, la MREC (Fig. 5.1) es una continuidad de la membrana externa de la carioteca, lo que significa un contacto entre el cloroplasto y el sistema de endomembranas (Marechal *et al.* 2019, Scarsini *et al.* 2019). Dentro de las diatomeas podemos encontrar dos grandes linajes: las diatomeas céntricas que poseen simetría radial y varios cloroplastos discoides por célula, y las diatomeas pennadas que poseen simetría bilateral y uno o dos cloroplastos parietales de gran tamaño por célula (Nonoyama *et al.* 2019)

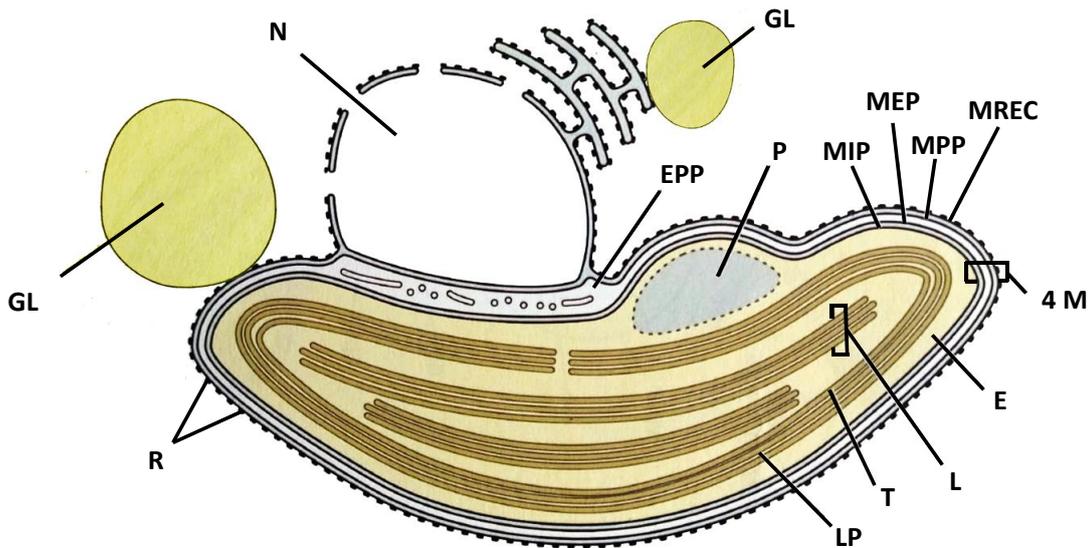


Fig. 5.1. Esquema de la ultraestructura de una célula vegetativa de una diatomea pennada. Cloroplasto rodeado por cuatro unidades de membrana (4 M). Membrana del retículo endoplasmático cloroplástico (MREC); membrana periplastidial (MPP), membranas externa e interna de la envoltura plastidial (MEP y MIP); ribosomas (R); espacio periplastidial (EPP); pirenoide (P); lamelas tritilacoidales (L); lamela periférica (LP); tilacoides (T); estroma del cloroplasto (E); núcleo (N) y gotas lipídicas citoplasmática (GL). Fuente: modificado de Bellorín-Romero (2022).

Las diatomeas, al igual que otras algas de la división Ochrophyta, almacenan crisolaminarina en vacuolas. Este glucano hidrosoluble, consiste en monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,3 con ramificaciones con uniones β -1,6 (Caballero *et al.* 2016). Además, poseen la capacidad de almacenar grandes cantidades de lípidos neutros (LN), principalmente triglicéridos (TAG) (Marechal *et al.* 2019). Los TAG son producidos en el cloroplasto y en el retículo endoplasmático rugoso (RE) (Fig. 5.2) bajo distintas condiciones de estrés, como lumínico, nutricional u osmótico (Goold *et al.* 2015; Rottet *et al.* 2015; Balamurugan *et al.* 2017). Debido a su alta hidrofobicidad, los TAG son almacenados principalmente en gotas lipídicas citoplasmáticas (GL) (Fig. 5.1) (Lupette *et al.* 2019, Balamurugan *et al.* 2017). Las GL, bajo condiciones de estrés o envejecimiento, pueden cumplir dos funciones, acumular energía y actuar como centros de procesos metabólicos para la síntesis de nuevas membranas (Goold

et al. 2015; Walther *et al.* 2017). El modelo estructural actual de una GL consiste en un núcleo de lípidos neutros (principalmente TAG), rodeado por una monocapa de lípidos polares (LP) y proteínas asociadas (Goold *et al.* 2015; Marechal *et al.* 2019). Los TAG y LP representan alrededor del 90% del peso de las GL, mientras que las proteínas representan del 1% al 5% (Goold *et al.* 2015). Dependiendo de la especie, las GL también pueden contener ácidos grasos libres o carotenoides (Goold *et al.* 2015). Las GL aumentan en número y tamaño al ser expuestas a condiciones de estrés (Goold *et al.* 2015), y este aumento puede deberse a la acumulación de LN en una misma GL, como también a la fusión de diferentes GL (Beller *et al.* 2010). Estos procesos pueden revertirse una vez que las condiciones ambientales vuelven a ser favorables (Goold *et al.* 2015; Murison *et al.* 2023). Se ha observado que las GL están en estrecho contacto con el cloroplasto y el sistema de endomembranas (Fig. 5.1), lo que sugiere una interconexión entre estos compartimentos celulares durante la respuesta al estrés y acumulación de LN (Lupette *et al.* 2019). Más específicamente, en diatomeas, las GL se encuentran íntimamente relacionadas con la membrana externa de la carioteca y con el cloroplasto a través de la MREC (Figs. 5.1 y 5.2) (Marechal *et al.* 2019).

Los LN producidos en el interior de los cloroplastos también pueden ser almacenados en estructuras intraplastidiales llamadas plastoglóbulos (Pg) (Fig. 5.2) (Balamurugan *et al.* 2017). Los Pg desempeñan un papel crucial durante situaciones de estrés, cumpliendo funciones de protección y reparación de las membranas contra daños oxidativos (Bréhélin & Kessler 2008; Rottet *et al.* 2015). Además, se los asocia con la acumulación de TAG dentro del cloroplasto (Balamurugan *et al.* 2017).

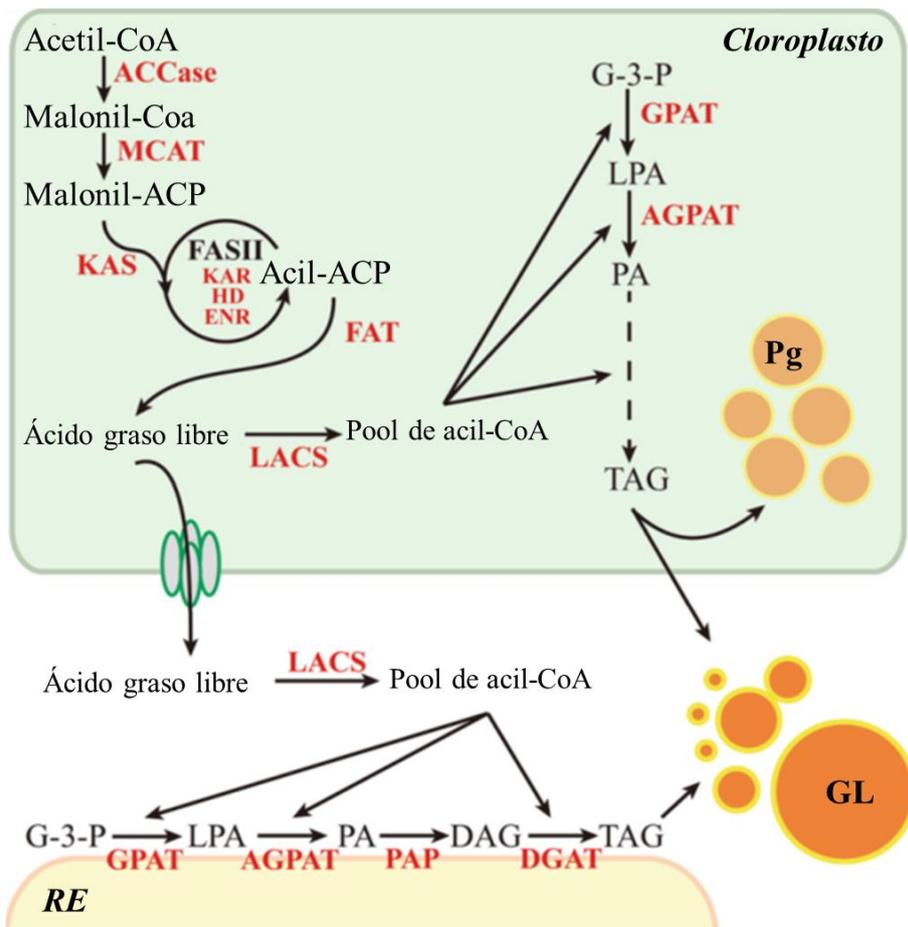


Figura 5.2. Representación esquemática de vías biosintéticas de TAG. Las siglas en rojo representan las enzimas; las siglas en negro representan los metabolitos. ACCase: acetil-CoA carboxilasa, MCAT: malonil CoA-acil transportador de proteínas transacilasa, KAS: 3-cetoacil-ACP sintasa; KAR: 3-cetoacil-ACP reductasa, HD: 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa, ENR: enoil-ACP reductasa, FAT: tioesterasa de acil-ACP de cadena larga, LACS: sintetasa de acil-CoA de cadena larga, GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa, AGPAT: 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, PAP: fosfatasa de ácido fosfatídico, DGAT: diacilglicerol aciltransferasa, G-3-P: glicerol-3-fosfato, LPA: ácido lisofosfatídico, PA: ácido fosfatídico, DAG: diacilglicerol, TAG: triglicérido, Pg: plastoglobulo, GL: gota lipídica, RE: retículo endoplasmático rugoso. Fuente: modificado de Balamurugan *et al.* (2017).

La estructura de los Pg consiste en un núcleo de LN (prenilquinonas, carotenoides y TAG), rodeado por una monocapa de lípidos polares con proteínas asociadas (Rottet *et al.* 2015). Esta monocapa suele presentarse contigua a la monocapa externa de las regiones curvas de la membrana de los tilacoides (Fig. 5.3) (Rottet *et al.* 2015). Los Pg pueden agruparse formando

redes extensas o cúmulos (Bréhélin & Kessler 2008). Los Pg pueden aumentar en tamaño y número, en respuesta a diferentes situaciones de estrés, como la presencia de metales pesados, estrés lumínico, deficiencia de nitrógeno y estrés osmótico, y esta situación puede revertirse bajo condiciones favorables (Bréhélin & Kessler 2008). Los cambios en el tamaño y cantidad de los Pg han sido asociados con la adaptación y supervivencia de las células en ambientes cambiantes (Bréhélin & Kessler 2008).

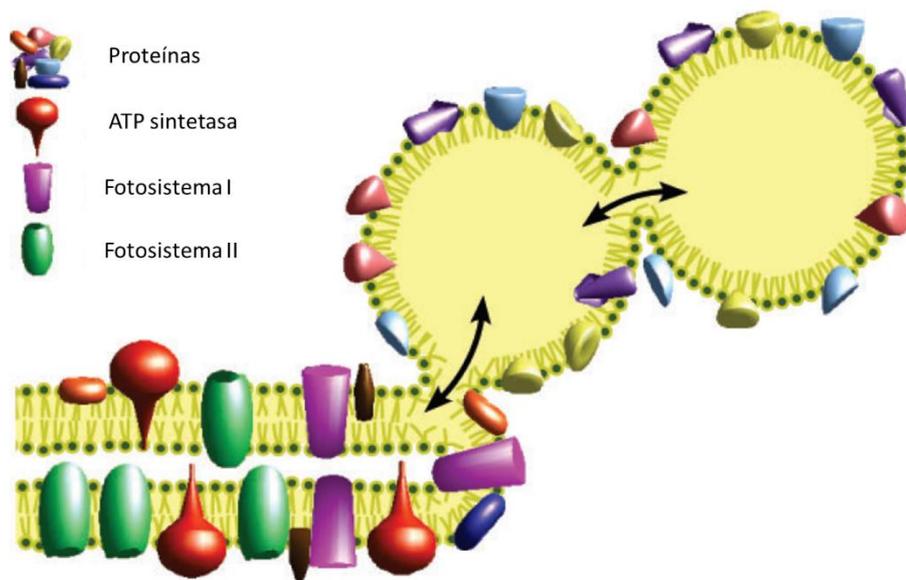


Figura 3. Modelo de acoplamiento de plastoglóbulos a tilacoides. El enlace físico entre plastoglóbulos y tilacoides puede permitir el canalizado bidireccional (flechas dobles) de metabolitos lipídicos. Fuente: modificado de Bréhélin & Kessler 2008

En general, los estudios relacionados con la acumulación de LN en diatomeas son referidos a su marcación con el fluoróculo Rojo Nilo con microscopía de fluorescencia (Wu *et al.* 2013; Yang lu *et al.* 2014; González-Fernández *et al.* 2020); mientras que existen muy pocos estudios a nivel ultraestructural (Yang *et al.* 2013; Luppete *et al.* 2019; Bedoshvili *et al.* 2021), siendo estos últimos referidos a escala de laboratorio, bajo condiciones controladas.

Bajo este contexto, el objetivo general de este capítulo fue realizar un estudio ultraestructural de la acumulación de TAG en cultivos de *H. coffeaeformis* a cielo abierto, destinados a la producción de biodiésel.

Resumen: En primavera de 2021 se realizó un cultivo de *H. coffeaeormis* a cielo abierto, en instalaciones del campus del CERZOS (ver Capítulo 4 de esta Tesis), en donde se efectuaron muestreos periódicos con el fin de evaluar la acumulación de TAG con microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía confocal de fluorescencia (MCF). La **hipótesis de trabajo** considerada en este capítulo fue que *los estudios ultraestructurales permiten detectar el estado fisiológico de la célula, así como la localización y el desarrollo de puntos de acumulación de lípidos neutros (PALN), como plastoglóbulos y gotas lipídicas citoplasmáticas, aportando conocimiento al análisis integral de la cinética de TAG y al momento apropiado para la realización de la cosecha en cultivos bioenergéticos de diatomeas. Como resultado, existirían cambios significativos en la formación de PALN en relación con las etapas de crecimiento de la especie, así como también con las condiciones meteorológicas y físico-químicas del cultivo a cielo abierto.*

5.2. Materiales y Métodos

Durante el cultivo de primavera (del 25-11-2021 al 22-12-2021), detallado en el Capítulo 4 de esta Tesis, se realizó un muestreo paralelo con el fin de analizar la formación de gotas lipídicas y plastoglóbulos, en distintas fases de crecimiento, mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión y microscopía confocal de fluorescencia

5.2.1. Estudio con microscopio electrónico de transmisión (MET)

Se tomaron muestras de 5 ml cada 3 días del cultivo de *H. coffeaeformis* llevado a cabo en primavera del 2021 (para más detalle, ver Capítulo 4). Inmediatamente luego de su recolección, las muestras fueron fijadas con 2,5% de glutaraldehído en buffer cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,4) con la adición de 0,25 M de sacarosa a 4°C. Se realizaron 4 lavados con buffer cacodilato de sodio 0,1 M con concentraciones decrecientes de sacarosa (0,25 M, 0,2 M, 0,1 M, 0 M) a 4°C, con una duración de 10 minutos cada uno. Posteriormente se llevó a cabo una segunda fijación con 1% de OsO₄ en buffer cacodilato de sodio 0,1 M durante 2 horas a 4°C. A continuación, se realizaron 4 lavados con buffer cacodilato de sodio 0,1 M a 4°C, cada uno con una duración de 10 minutos. Las muestras

luego se deshidrataron en una serie creciente de acetona (30, 50, 70, 90, 95, 100 y 100%) durante 10 minutos cada uno. La deshidratación se realizó a 4°C hasta acetona 70 y luego se continuó a temperatura ambiente. El material fue infiltrado en resina Spurr (25, 50, 75 y 100%) durante 4 días y polimerizado en cápsulas Beem a 70 °C durante 12 horas (Bedoshvili *et al.* 2007, 2009, Aboal *et al.* 2012, Giovanardi *et al.* 2013, Baldisserotto *et al.* 2014, 2016). Por último, se cortaron secciones del material fijado utilizando un ultramicrotomo Reichert Jung con cuchilla de diamante a 90 nm de espesor, se contrastaron con acetato de uranilo (1%) y citrato de plomo (3%) (Reynolds 1963). Las secciones se observaron y se realizaron micrografías en un MET JEOL 100CX-II, operado a 80 Kv, en el Centro de Microscopía del CCT-Bahía Blanca.

5.2.2. Estudio con microscopio confocal de fluorescencia (MCF)

Se tomaron muestras de 5 ml cada 3 días. Las muestras fueron teñidas con Rojo Nilo (RN) (9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona, Sigma) de acuerdo con Priscu *et al.* (1990). Para ello, se agregaron 5 µL de una solución de RN en acetona (1 mg mL⁻¹) a 5 ml de muestra. Antes del agregado de RN, las muestras fueron sonicadas en un ultrasonido Branson 5 durante 10 segundos, con el objetivo de separar las células agregadas y mejorar el ingreso del RN a las células. Para garantizar una adecuada tinción, las suspensiones celulares con RN se incubaron entre 5 y 10 minutos antes de su observación. Las células se observaron y se realizaron micrografías con un MCF modelo TCS SP2 SE, con un filtro de excitación de 475 nm y un filtro de emisión de 580 nm.

5.2.3. Estudio con microscopio electrónico de barrido (MEB)

Con el fin de analizar el aspecto de células íntegras de *H. coffeaeformis*, el día 27 se tomó biomasa de la cosecha del cultivo de primavera y se preparó para observaciones con un microscopio electrónico de barrido (MEB), como se detalla a continuación. Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído 2,5 % en buffer fosfato 0,067 M (pH 7,2) y sometidas a concentraciones crecientes de alcohol etílico (25%, 50%, 75% v/v; cada paso 15 minutos) hasta llegar a 100 % (15 minutos). Luego se deshidrataron en series crecientes de acetona (50/50; 15 minutos) hasta llegar a 100% (60 minutos). Posteriormente se realizó el secado

por punto crítico (E3000, Polaron) empleando CO₂. Las muestras fueron montadas sobre *stubs* y recubiertas con oro (300 Å), empleando una evaporadora de metales en plasma de Argón (91000 Model 3, Pelco). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido marca LEO EVO 40 (Cambridge 2003) a un potencial de 7.0 kV, en el Centro de Microscopía del CCT-Bahía Blanca.

5.2.4. Estimación del número y tamaño de puntos de acumulación de lípidos neutros en cultivos de *H. coffeaeformis*

El número y tamaño de puntos de acumulación de LN (PALN) de color amarillo dorado, teñidos con RN, fue estimado a partir de micrografías realizadas con MCF con el software Image-J. Como los PALN observables al MCF muestran una forma aproximada a la de una esfera, se utilizó el diámetro de los mismos para estimar su tamaño. El número de PALN fue expresado en N° PALN. célula⁻¹. Se utilizaron 20 micrografías de MCF por fase de crecimiento (n=20).

5.3. Resultados

El estudio de la formación de GL y Pg con MCF y MET se llevó a cabo en tres fases de crecimiento del cultivo de primavera de *H. coffeaeformis*, definidas de acuerdo a datos de densidad celular (DC) e intensidad de fluorescencia de Rojo Nilo (IF-RN) y detalladas en el capítulo 4 de esta Tesis (Fig. 5.4). De acuerdo con esta información, se determinaron tres fases: 1) Una fase exponencial (FEx), entre los días 0 y 6, caracterizada por un aumento exponencial de la DC, valores de IF-RN entre 42 y 140 (ua), y salinidades de 28,4 ‰ y 33,6 ‰; 2) Una fase estacionaria temprana (FE_{Tem}), entre los días 7 y 18, caracterizada por DC constantes, valores de IF-RN entre 96 y 201 (ua), y salinidades de 26,4 ‰ y 52,5 ‰; y 3) Una fase estacionaria tardía (FE_{Tar}), entre los días 19 y 27, caracterizada por una leve disminución de la DC, un aumento significativo de los valores de IF-RN hasta 865 ua y salinidades de 55,7 ‰ a 103,8 ‰. El día 27 se realizó la cosecha.

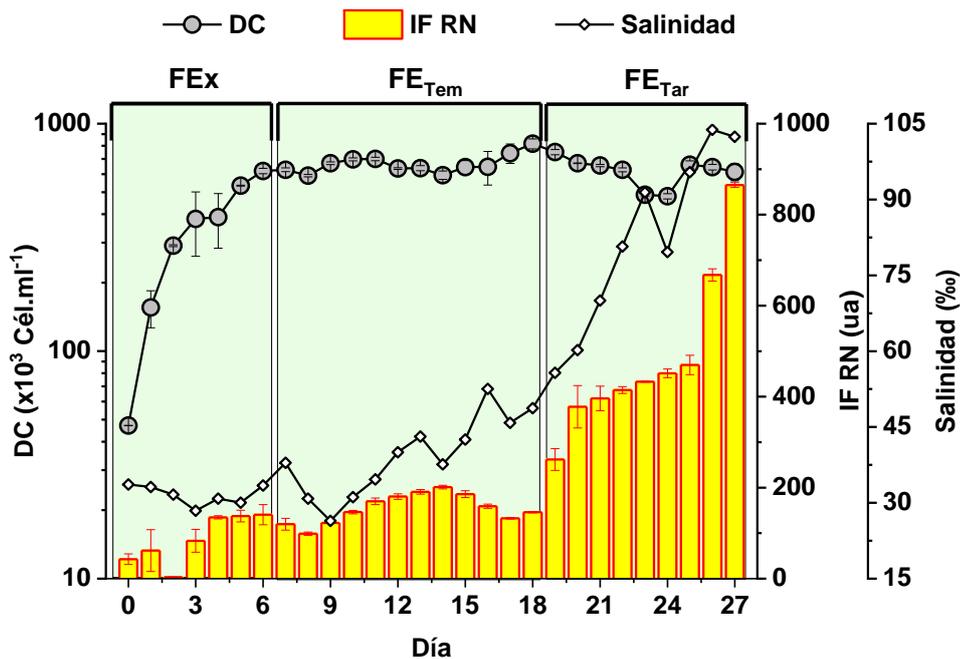


Figura 5.4. Fases de crecimiento del cultivo de primavera de *H. coffeaeformis* en pileta *raceway* a cielo abierto (Resultados obtenidos en el Capítulo 4 de esta Tesis)

Células de *H. coffeaeformis* en FEx al MET se muestran en la Fig. 5.5. Las células presentaron un cloroplasto parietal que ocupó gran parte del citoplasma (Fig. 5.5 A), en forma de “H” (Fig. 5.5 B), localizado en la región ventral y un pirenoide central alargado y fusiforme (Figs. 5.5 A, C y D), atravesado por una lamela tilacoidal (Fig. 5.5 C). Las células presentaron numerosas mitocondrias alargadas de tamaño considerable (Fig. 5.5 E y F) y vacuolas de un tamaño relativamente pequeño (Fig. 5.5 A y D). El núcleo presentó posición central y un nucléolo (Fig. 5.5 E). También pudo observarse la estrecha conexión entre el núcleo y el cloroplasto, debido a su vinculación a través de la carioteca con la MREC (Fig. 5.5 A y c). El cloroplasto presentó varios Pg pequeños (Fig. A, B y C), que en algunos casos llegaron a agruparse, formando cúmulos con un tamaño de $0,51 \pm 0,25 \mu\text{m}$ (Fig. 5.5 B y E). En esta etapa fue muy común encontrar células en división, con el núcleo con cromatina condensada (Fig. F), formación de las hipotecas y vesículas de deposición de sílice (VDS) (Fig. 5.5 G y H).

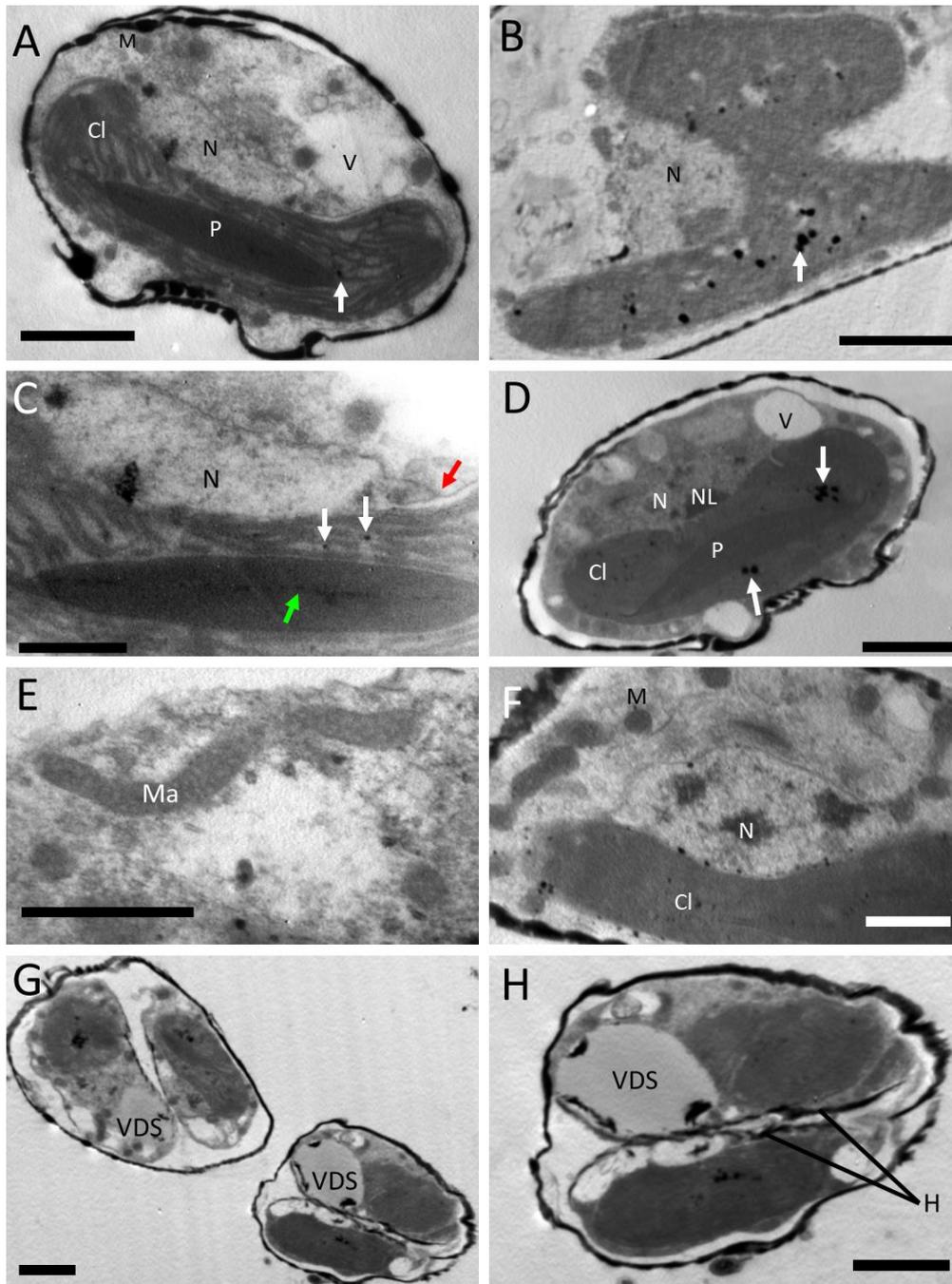


Figura 5.5 Ultraestructura de *H. coffeaeformis* en fase de crecimiento exponencial (FEx). **A.** Vista general de una célula. **B.** Detalle del cloroplasto en forma de H, próximo al núcleo. **C.** Detalle de la relación del núcleo y la MREC. **D.** Vista general de una célula en corte transversal. **E.** Detalle de mitocondrias. **F.** Detalle de perfil mitocondrial. **G.** Células en división. **H.** Detalle de células en división. Las flechas blancas indican los plastoglobulos (Pg) (**A, B, C y D**) o cúmulos de Pg (**B y D**). La flecha verde indica la lamela tilacoidal que atraviesa el pirenoide (**C**). La flecha roja indica la continuidad de la carioteca del núcleo con la MREC (**C**). Núcleo (N); nucléolo (NL); mitocondria (Ma); perfil mitocondrial (M); vacuola (V); cloroplasto (Cl); pirenoide (P); hipoteca (H); vesícula de deposición de sílice (VDS). Barra escala: A, B, D, G e H = 2µm; C, E y F = 1µm.

Células en FEx del cultivo de *H. coffeaformis* de primavera observadas con microscopio confocal de contraste de fases (MC) se muestran en las Fig. 5.6 A y C. Las mismas células observadas con microscopio confocal de fluorescencia (MCF) se muestran en las Fig. 5.6 B y D. En ellas se evidencia el cloroplasto de color rojo, debido a su autofluorescencia, y puntos de acumulación de LN (PALN), de color amarillo dorado, debido a la tinción de los lípidos neutros (TAG) con el fluorocromo RN. En la Fig. 5.6 A se observa una célula en división, con dos cloroplastos y una célula vegetativa; mientras que en la Fig. 5.6 B se puede observar la presencia de PALN puntiformes de color amarillo dorado. En las Fig. 5.6 C y D (día 6 del cultivo), se observa una célula con el cloroplasto en forma de "H", con seis PALN de mayor tamaño, localizados cerca del núcleo, el cual presenta una ubicación central y una apariencia algo más opaca con el MC. Adicionalmente, en las Fig. 5.6 A y C pueden observarse proyecciones que corresponden a exopolisacáridos (EPS), característicos en diatomeas pennadas.

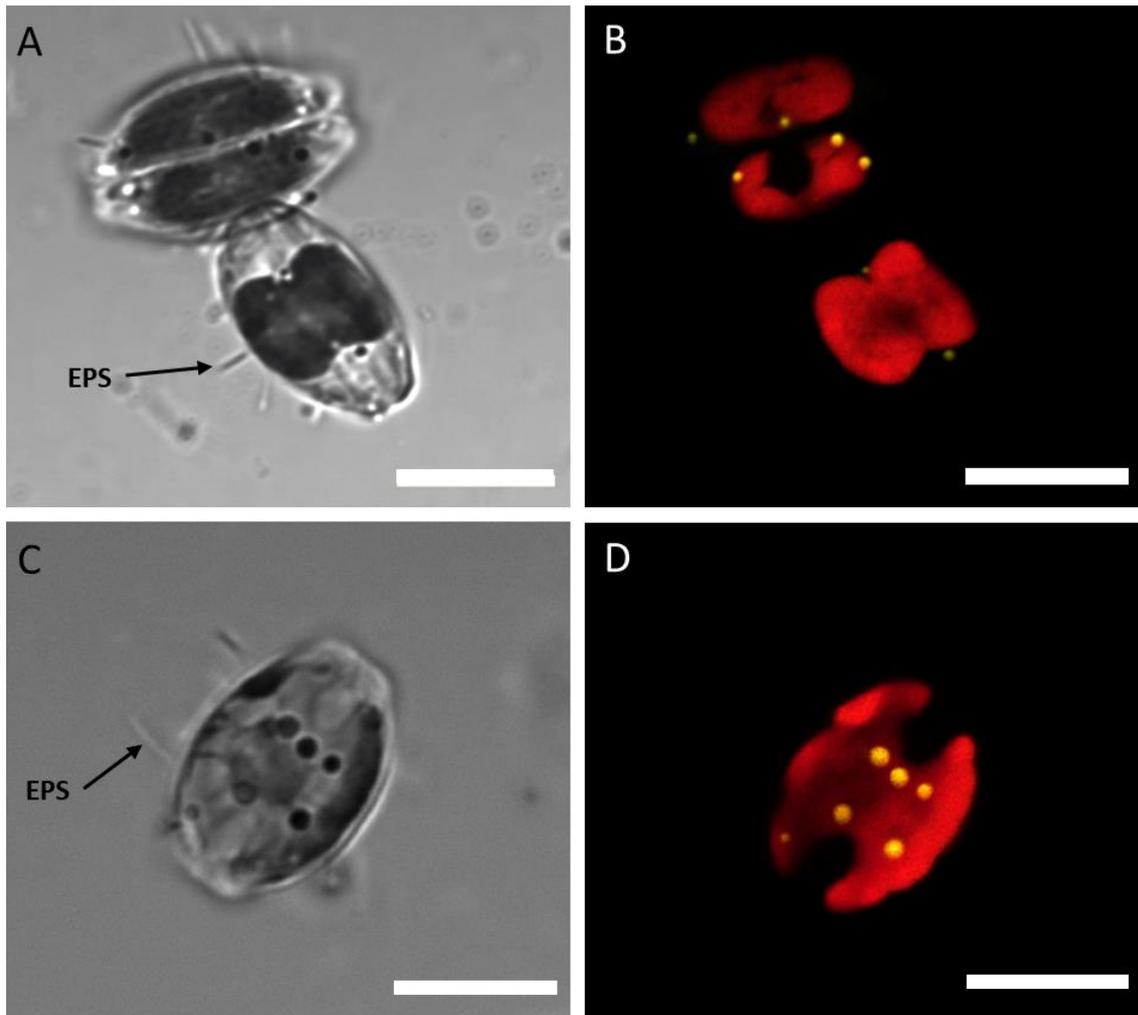


Figura 5.6 Células de *H. coffeaeformis* en FEx. **A y B)** Células en día 0; **C y D)** Células en día 6, observadas con microscopio confocal de contraste de fases (MC) (A y C) y MCF (B y D). A y C) Presencia de exopolisacaridos (EPS); B y D) Cloroplastos color rojo y puntos de acumulación de LN (PALN) con coloración dorada característica. Barra escala: 10 μ m.

En fase estacionaria temprana (FE_{Tem}), día 8 (Fig. 5.7 A), las células presentaron vacuolas pequeñas, cúmulos de Pg entre los tilacoides, numerosos perfiles mitocondriales, y no se observaron GL. En el día 11 (Fig. 5.7 B), se observaron las primeras células con formación de pequeñas GL, relacionadas con la carioteca y la MREC del cloroplasto. También fue notoria la acumulación de Pg en el cloroplasto (Fig. 5.7 C), y la presencia de vacuolas de mayor tamaño (Fig. 5.7 B). Hacia el día 15 (Fig. 5.7 D-E), las GL incrementaron de tamaño, y se ubicaron siempre alrededor del cloroplasto y el núcleo, asociadas a la carioteca y MREC. En esta fase de crecimiento aún se pudieron observar algunas células en división, con vesículas de deposición de sílice (Fig. 5.7 F-G).

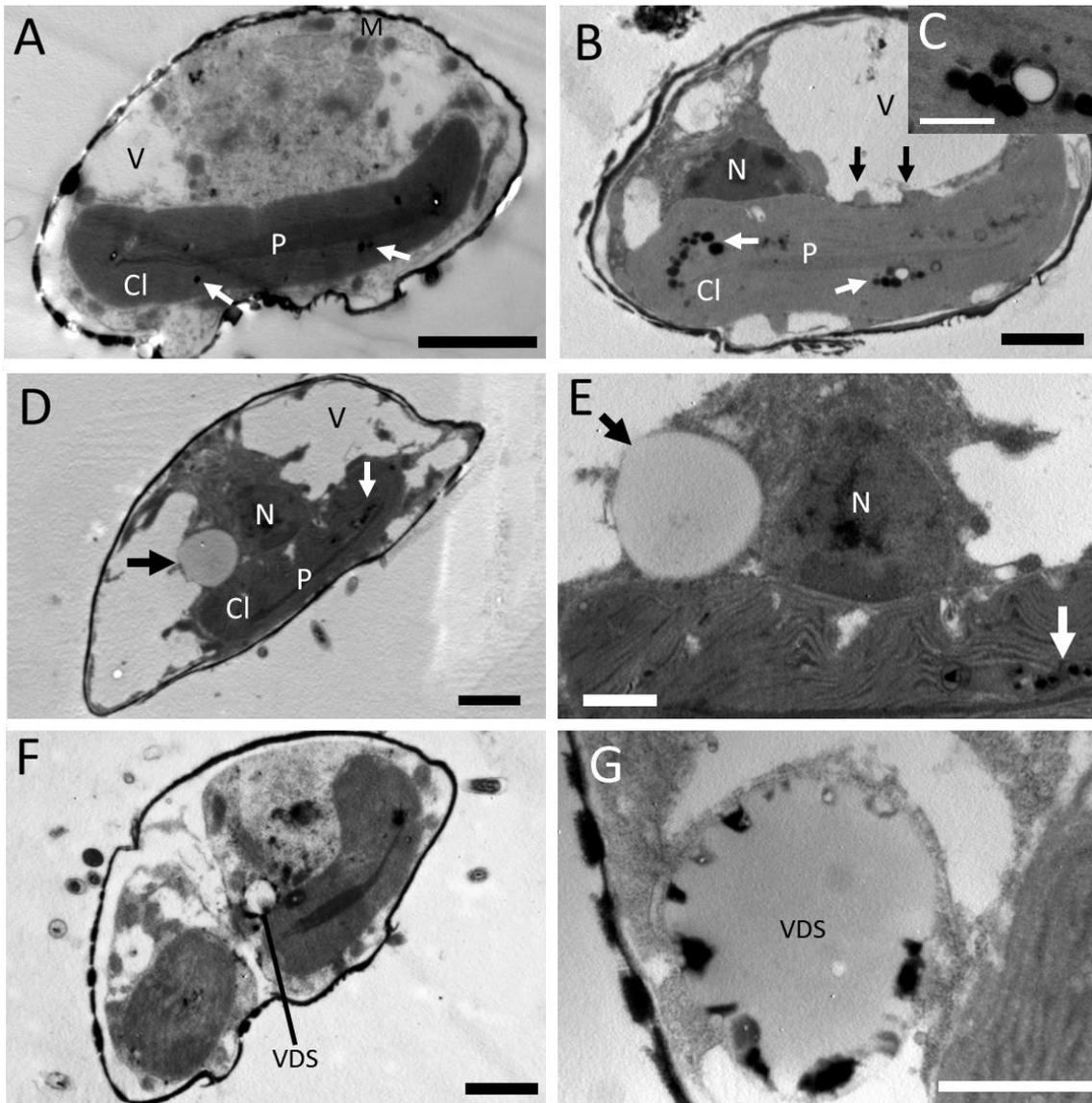


Figura 5.7. Ultraestructura de *H. coffeaeformis* en fase estacionaria temprana (FE_{Tem}). **A)** Células en día 8. **B)** Células en día 11. **B)** Detalle de cúmulo de plastoglóbulos **E**, **F**, **G** y **H)** Células en día 15. Las flechas blancas señalan plastoglóbulos (Pg) y las flechas negras señalan gotas lipídicas (GL). Núcleo (N); perfil mitocondrial (M); vacuola (V); cloroplasto (Cl); pirenoide (P); vesículas de deposición de sílice (VDS). Barra escala: A, C, E, F: 2 μ m; B y D: 1 μ m.

En la Fig. 5.8 se observan imágenes de MC (Fig. 5.8 A y C) y MCF (Fig. 5.8 B y D) de células de *H. coffeaeformis* durante la FE_{Tem} . Las Figs. 5.8 A y C corresponden a días 11 y 15, respectivamente. En general, puede observarse que los PALN fueron más numerosos y de mayor tamaño. Las células presentaron varias proyecciones de EPS en esta fase (Fig. 5.8 A y C).

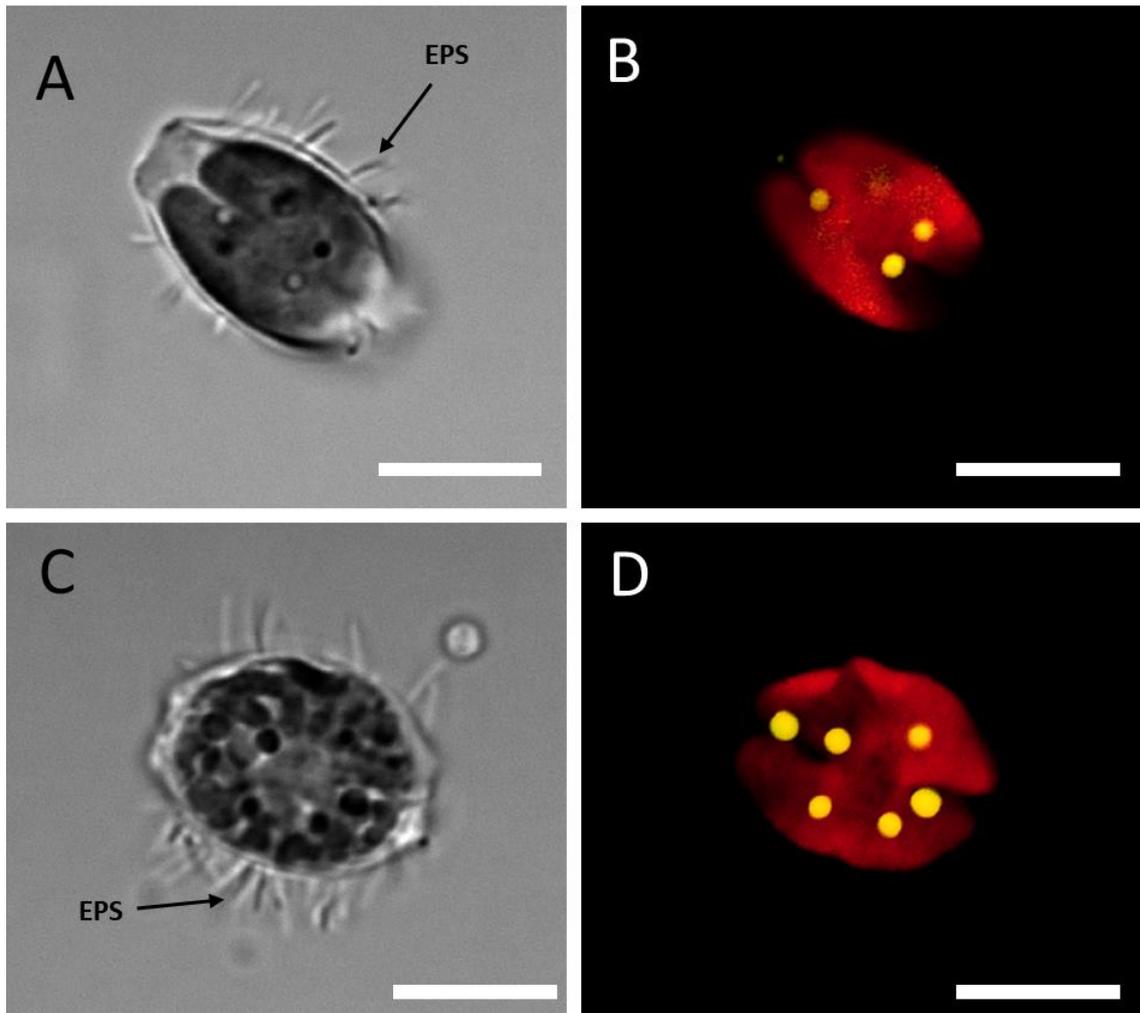


Figura 5.8. Células de *H. coffeaeformis* en FE_{Tem}. **A y B)** células en día 11. **C y D)** células en día 15, observadas con MC (A y C) y MCF (B y D). A y C) se observan exopolisacáridos (EPS); B y D) Cloroplastos color rojo y PALN con coloración dorada característica. Barra escala: 10 μ m.

En fase estacionaria tardía (FE_{Tar}), las células se presentaron muy vacuoladas y con GL de considerable tamaño, ocupando gran parte del citoplasma (Fig. 5.9). A partir del día 20 (Fig. 5.9 A y B), las GL incrementaron de tamaño con respecto a las observadas en células en FE_{Tem}. Los Pg no mostraron diferencias con los observados en FE_{Tem}, aunque algunos presentaron una menor coloración (Fig. 5.9 B). En el día 27 (Fig. 5.9 C-F), se observó un aumento del tamaño y número de las GL, e incluso GL muy próximas entre sí (Fig. 5.9 C, D). Es importante resaltar, que algunas células presentaron GL en distinto grado de desarrollo. (Fig. 5.9 C-F).

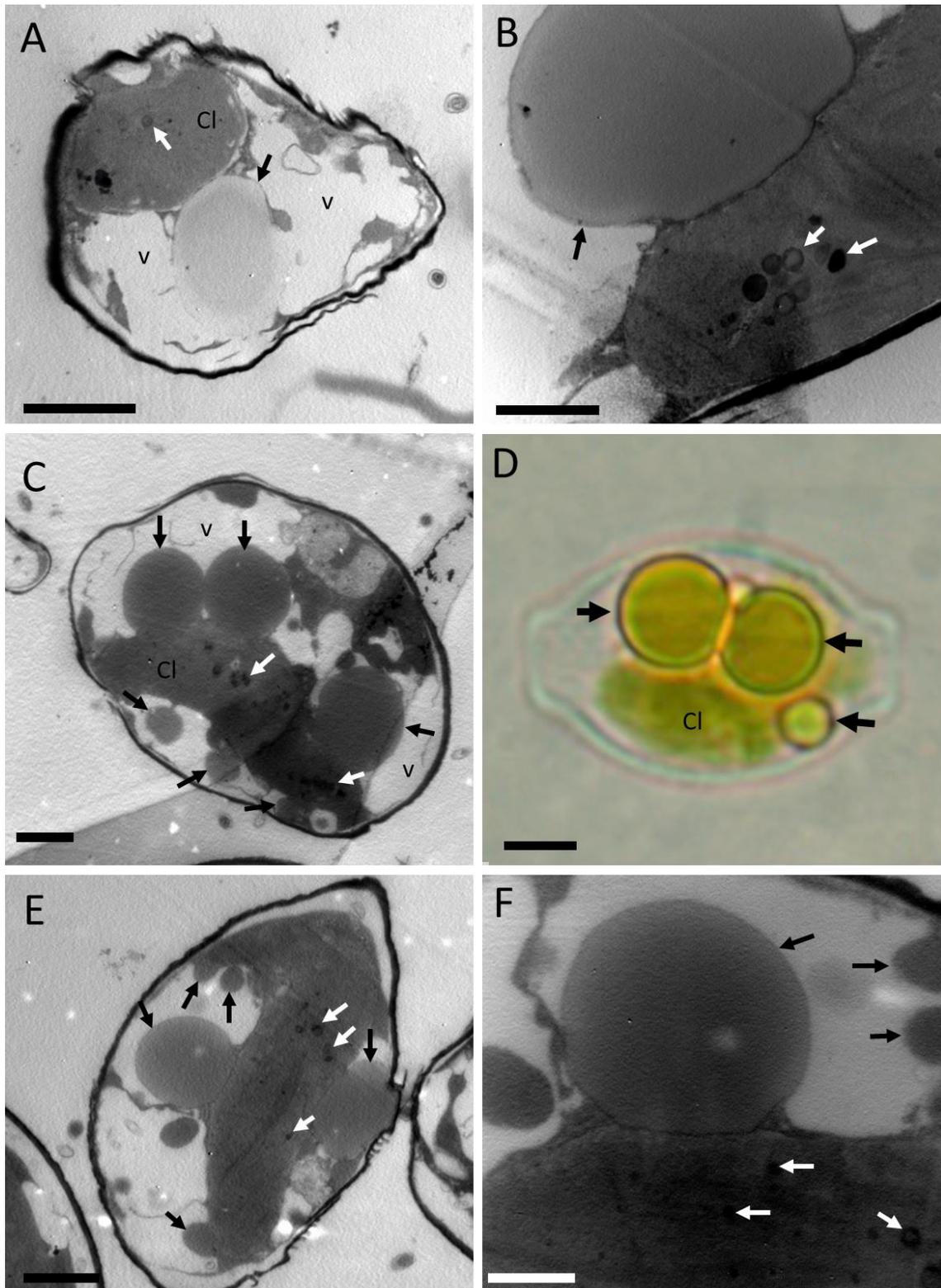


Figura 5.9. Ultraestructura de *H. coffeaeformis* en fase estacionaria tardía (FE_{Tar}). Células observadas con MET (A, B, C, E, F) y microscopio óptico, MO (D). Células en día 20 (A y B) y células en día 27 (C- F). Cl: cloroplasto; v: vacuola; las flechas blancas señalan plastoglóbulos; las flechas amarillas señalan gotas lipídicas. Barras de escala: A, C, D y E: 2 μ m; B y F = 1 μ m.

En la Fig. 5.10 se observan imágenes de MC (Fig. 5.10 A y C), MCF (Fig. 5.10 B, D) y MEB (Fig. 5.10 E y F) de células de *H. coffeaeformis* durante la FE_{Tar}. Las Fig. 5.10 A y C corresponden a días 20 y 27, respectivamente. En general, puede observarse que los PALN fueron de mayor tamaño con respecto a los observados en FE_{Tem}. Además, las células presentaron mayor producción de EPS (Fig. 5.10 A y C), los cuales fueron observados al MEB en forma de proyecciones, en distintas partes del frústulo (Fig. 5.10 E y F).

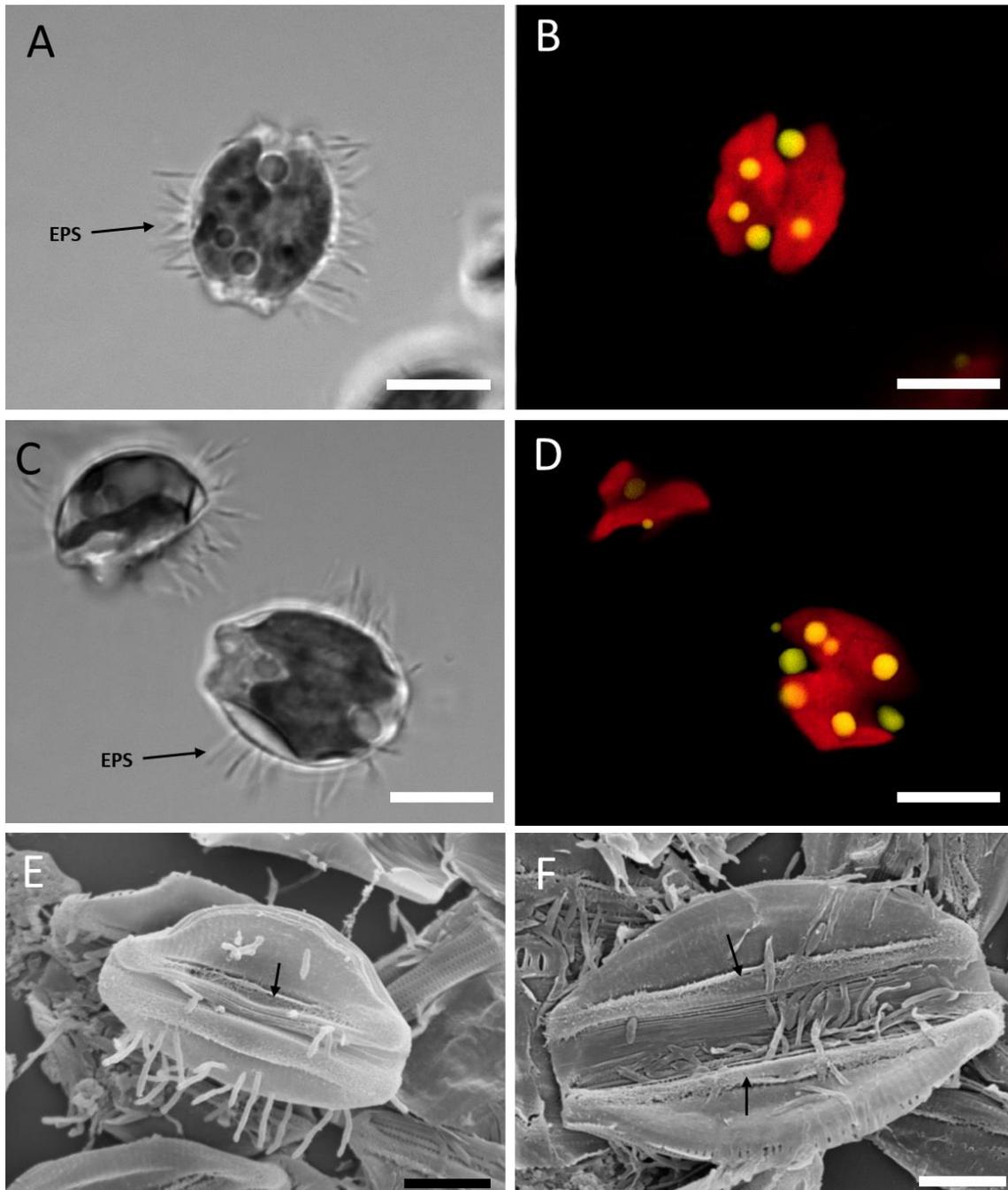


Figura 5.10. Células de *H. coffeaeformis* correspondientes a la FE_{Tar} (A y B: día 20; C, D: día 27) observadas con MC (A y C) y MCF (B y D). A y C) proyecciones de exopolisacáridos (EPS); B y D) Cloroplastos color rojo y PALN con coloración dorada característica. (E y F) células en vista valvar del día 27 observadas con MEB. Proyecciones de exopolisacáridos (EPS) se presentan en distintas partes del frústulo. Las flechas negras señalan el rafe. Barras de escala: A, B, C y D = 10 μm ; E y F = 4 μm .

Los resultados de tamaño y cantidad promedio de los PALN, estimados a partir de micrografías de MCF, en las diferentes fases de crecimiento se presentan en

la Fig. 5.11. Las distintas etapas del cultivo mostraron diferencias significativas entre si ($F = 129.51$, $p < 0,01$), siendo los PALN más pequeños en FEx, y los más grandes en FE_{Tar} (tamaño de PALN: FEx $0,58 \pm 0,15 \mu\text{m}$; FE_{Tem} $1,28 \pm 0,43 \mu\text{m}$; FE_{Tar} $2,63 \pm 0,78 \mu\text{m}$) ($F = 124,79$, $p < 0,01$; DMS = $0,25$, $p < 0,05$). En cuanto al número de PALN, las células en FEx presentaron números significativamente menores que las células en FE_{Tem} y FE_{Tar} (número de PALN: FEx $3,57 \pm 1,39$ PALN célula⁻¹, FE_{Tem} $6,00 \pm 1,22$ PALN célula⁻¹; FE_{Tar} $6,09 \pm 1,67$ PALN célula⁻¹), mientras que no presentaron diferencias significativas entre FE_{Tem} y FE_{Tar} ($F = 7,92$, $p < 0,01$; DMS = $1,49$, $p > 0,05$). Es interesante resaltar que en el MET no se encontraron GL durante la FEx.

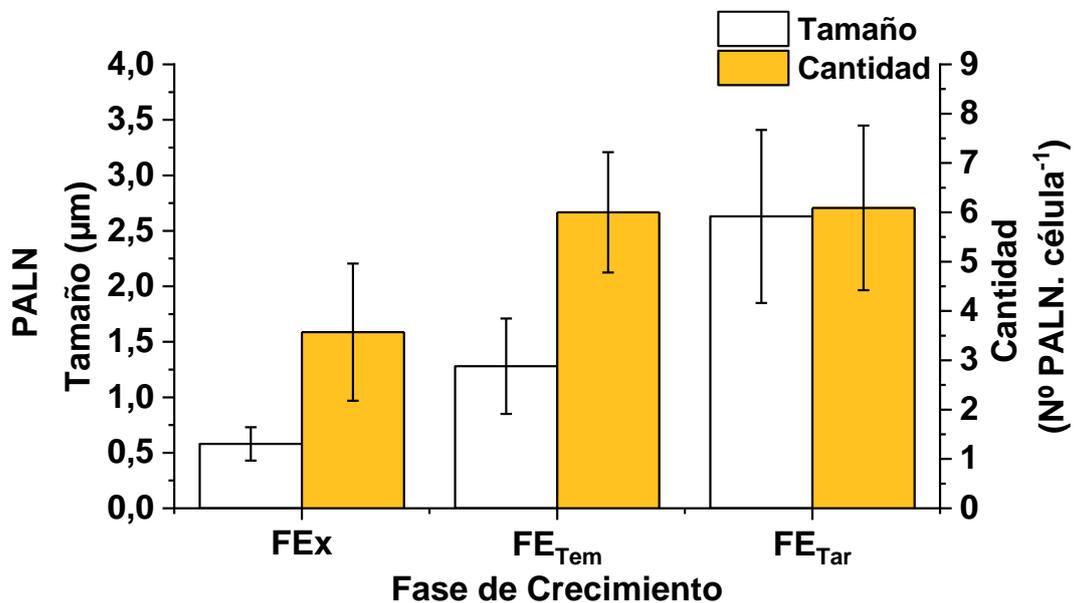


Figura 5.11. Tamaño y número de PALN en el cultivo de primavera de *H. coffeaeformis*, estimados con microscopio confocal de fluorescencia (MCF). Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar de 20 réplicas ($n = 20$)

Discusión

En diatomeas, las GL y, en menor medida, los Pg son sitios de acumulación de TAG relacionados con situaciones de estrés (Goold *et al.* 2015; Balamurugan *et al.* 2017), como el estrés lumínico, la deficiencia de nutrientes y el estrés osmótico, entre otros. Además, a medida que el período de estrés se prolonga, las GL pueden aumentar en cantidad y tamaño (Bréhélin & Kessler 2008; Rottet *et al.* 2015; Goold *et al.* 2015; Guzha *et al.* 2023; Leyland *et al.* 2020).

En el presente estudio, el cultivo de primavera de *H. coffeaeformis* se caracterizó por una etapa exponencial (FEx) con una buena disponibilidad de nutrientes (NO_3^- : de 551 μm a 306 μm ; NH_4^+ : de 984 μm a 417 μm ; PO_4^{3-} : de 173 μm a 13 μm y SiO_4^{4-} : de 170 μm a 21 μm) y valores de salinidad (entre 28,4 ‰ y 33,6 ‰) similares o inferiores a la salinidad inicial del cultivo (33,6 ‰). Como se ha mencionado anteriormente, en el Capítulo 4 de esta Tesis, dichas condiciones ambientales estimularon el crecimiento de *H. coffeaeformis*, lo que se tradujo en un aumento significativo de la densidad celular. En forma coincidente, las células observadas al MET no mostraron presencia de GL, pero sí de Pg, aunque en menor cantidad y tamaño que en otras fases de crecimiento. Si bien los Pg alcanzaron un tamaño máximo de 0,2 μm , muy inferior al de las GL, pudo observarse la presencia de varios cúmulos de Pg con un tamaño de hasta $0,51 \pm 0,25 \mu\text{m}$. La ausencia de GL en las células observadas con el MET, sugiere que los pequeños PALN puntiformes de LN presentes en el MCF, podrían ser principalmente cúmulos de Pg. Además, las bajas intensidades de fluorescencia de RN obtenidas durante esta fase de crecimiento, indican una baja acumulación de TAG. Otra característica ultraestructural, como la condensación cromatínica, un signo evidente de división celular, también estaría indicando la falta de estresores en esta etapa. . Es importante destacar que las diatomeas poseen mitosis cerrada, por lo que la carioteca no se desorganiza durante la división nuclear. Las células presentaron un cloroplasto bien desarrollado, numerosas mitocondrias, vacuolas pequeñas y escasos EPS. También pudieron observarse células en división celular con presencia de vesículas de deposición de sílice, indicando formación del frústulo. Un comportamiento similar fue indicado en células de diatomeas en fase exponencial, como *Synedra acus* (Bedoshvili *et al.* 2007), *Thalassiosira pseudonana*, *Cyclotella cryptica* (Heintze *et al.* 2020) y

Entomoneis cf. paludosa (Bedoshvili *et al.* 2021), donde no se encontraron GL durante la fase de crecimiento exponencial.

Por su parte, la FE_{Tem} se caracterizó por concentraciones de nutrientes más bajas (NO₃⁻: de 555 µm a 271 µm; NH₄⁺: de 283 µm a 66 µm; PO₄³⁻: de 76 µm a 14 µm; SiO₄⁴⁻: de 69 µm a 12 µm), pero no limitantes del crecimiento (Sarhou *et al.* 2005) y niveles de salinidad que oscilaron entre 26,4 ‰ y 52,5 ‰, debido a períodos de precipitación y evaporación. Bajo este escenario, en el MET se observaron células con formación de GL, en estrecha relación con la carioteca y la MREC, como también aumento del tamaño y el número de Pg; indicando señales de inestabilidad nutricia y osmótica. En concordancia con este comportamiento, el incremento en cantidad y tamaño de los Pg ha sido asociado a condiciones de estrés y funciones de protección de las membranas cloroplásticas (Rottet *et al.* 2015), bajo condiciones críticas de disponibilidad de nutrientes o aumento del estrés osmótico (Bréhélin & Kessler 2008). Por su parte, si bien hubo un aumento de cantidad y tamaño de GL, las mediciones con RN no mostraron un aumento significativo de TAG en comparación con los últimos días de la FEx. Esto indicaría que esta etapa inicial de acumulación de TAG en GL no sería aún lo suficientemente significativa para poder ser detectada mediante fluorimetría. Sin embargo, a nivel celular, el MET sería una herramienta adecuada para indicar que las células estarían comenzando a sufrir señales de estrés celular. La presencia de células en división y con numerosas mitocondrias, indicaría que esas condiciones ambientales aun no representarían un efecto estresor suficiente para maximizar la acumulación de TAG. Sin embargo, el mayor tamaño de vacuolas observado puede relacionarse con un posible incremento de almacenamiento de carbono en forma de crisolaminarina (Sayanova *et al.* 2017). Estos resultados coinciden con lo hallado por Popovich *et al.* (2020), quien indicó un aumento de la concentración de carbohidratos durante la fase estacionaria temprana de crecimiento en cultivos de *H. coffeaeformis*. Además, un incremento de proyecciones de EPS sobre la superficie de células de la especie estudiada en esta fase de crecimiento, puede asociarse con un aumento de estrés salino (Steele *et al.* 2014).

Por último, la FE_{Tar} fue el escenario propicio para la formación y aumento de las GL. Los valores de IF-RN registrados a partir del día 19 mostraron un aumento significativo hasta el final del cultivo. Esta fase fue definida en el Capítulo 4 de esta Tesis como la fase de acumulación de lípidos neutros. Las GL tienen la capacidad de aumentar de tamaño, tanto por incremento de nuevos TAG, como también por la fusión con otras GL, debido a la presencia de proteínas de membrana asociadas a la monocapa que reconocen a otras GL (Beller *et al.* 2010; Murphy 2012). De acuerdo con los resultados obtenidos, ambas estrategias estarían presentes en la especie estudiada. En esta etapa, las concentraciones de NO_3^- y de NH_4^+ continuaron disminuyendo (NO_3^- : de 309 μM a 19 μM ; NH_4^+ : de 41 μM a 14 μM ; PO_4^{3-} : de 121 μM a 15 μM ; SiO_4^{4-} : de 20 μM a 12 μM), pero ningún nutriente alcanzó valores limitantes para la especie (Sarhou *et al.* 2005, Martín 2016, 2018, Popovich *et al.* 2020), mientras que la salinidad presentó un aumento significativo y sostenido desde 55,7 ‰ hasta 103,8 ‰. Estos valores de salinidad han demostrado disminuir el crecimiento y aumentar la acumulación de TAG en *H. coffeaeformis*. En esta fase de crecimiento, los Pg no mostraron un aumento de tamaño ni cantidad, en coincidencia con el incremento de GL, sugiriendo una redirección de TAG a las GL citoplasmáticas. Además, el color más claro de algunos Pg sugiere la disminución en su contenido de pigmentos, como ha sido observado por otros autores (Rottet *et al.* 2015; Morelli *et al.* 2022). Además, el cambio de forma observado en el cloroplasto, podría relacionarse con el aumento de tamaño de las vacuolas y de las GL. Adicionalmente, se pudo observar un menor número de mitocondrias y un incremento de los EPS, lo que ha sido asociado en otras especies con condiciones críticas de estrés (van Creveld *et al.* 2015), en particular debido a estrés salino (Steele *et al.* 2014). Considerando que dos estresores importantes, como el incremento de salinidad y la disminución de nutrientes fueron progresivos con el desarrollo del cultivo (Capítulo 4 de esta Tesis,), los Pg y las GL aumentaron en cantidad y tamaño, coincidiendo con lo planteado por Rottet *et al.* (2015) y Goold *et al.* (2015), respectivamente. Los resultados del presente estudio concuerdan con lo reportado en otras especies de diatomeas pennadas como *Phaeodactylum tricorutum* (Murison *et al.* 2023) y *Entomoneis cf. paludosa* (Bedoshvili *et al.* 2021), las cuales no presentaron

formación de GL durante la fase de crecimiento exponencial (Bedoshvili *et al.* 2021; Murison *et al.* 2023). En forma coincidente con los resultados obtenidos en el presente trabajo, dichos autores observaron un incremento en el número y tamaño de las GL y de los Pg durante la fase de crecimiento estacionaria (Bedoshvili *et al.* 2021).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el MCF fue el equipo más sensible a la hora de hacer un seguimiento de la acumulación de TAG en células teñidas con Rojo Nilo; sin embargo, para definir el período más productivo, esta información debe ir acompañada por un análisis fluorimétrico de la cinética de la intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo. El MET permitió obtener información: a) integral del estado de la célula en las distintas fases de crecimiento y b) de la localización y el desarrollo de los Pg y GL. En el Capítulo 4 de esta Tesis se reportó una concentración de lípidos totales de 37,5 (\pm 0,015) % PSLC (peso seco libre de cenizas), el día de la cosecha, e indicaron que el régimen de precipitaciones de primavera habría retrasado el proceso de acumulación de TAG, considerando que el aumento de IF-RN comenzó el día 19 de cultivo. En forma coincidente con los resultados de este capítulo, las células observadas a partir del día 20, presentaron su contenido citoplasmático ocupado por un gran porcentaje de GL. Además, el MET mostró que en FE_{Tar} las células del cultivo de primavera aun presentaban formación de GL, cuando el cultivo de primavera aún no había alcanzado su contenido máximo de LN (ver Capítulo 4 de esta Tesis). Como ya ha sido mencionado, en el cultivo de primavera, los nutrientes no alcanzaron concentraciones limitantes del crecimiento y los valores de salinidad se vieron muy afectados por los períodos de precipitaciones, típicos de esta estación del año. Los valores de salinidad aumentaron en forma significativa (> 50‰) a partir del día 19 y llegaron a 102,4 ‰ el día de la cosecha (día 27). Así, la presencia de GL de gran tamaño a partir del día 20, junto con un aumento del tamaño de las vacuolas, no sólo servirían como reservas de energía frente a condiciones de disminución de nutrientes, sino también como una estrategia de la especie para no sufrir colapso celular debido a la pérdida de agua frente al incremento de la salinidad (Noguchi *et al.* 2014; Muralidhar *et al.* 2015; Xu *et al.* 2020). En sintonía con estos cambios morfológicos, la producción de EPS también puede interpretarse como una respuesta al estrés salino.

Comportamientos similares, como aumento del tamaño vacuolar, producción de EPS y formación de GL, han sido observados en otras microalgas frente al aumento de la salinidad (Farkas *et al.* 2023). Como ha sido mencionado en el Capítulo 3 de esta Tesis, *H. coffeaeformis* presenta condiciones favorables para el crecimiento a 20‰ de salinidad, pero su comportamiento eurihalino le permite sobrevivir hasta salinidades de 95‰ a través de la formación de GL, vacuolas y EPS. Así, el análisis ultraestructural corrobora que la salinidad es el principal estresor para el desarrollo de cultivos bioenergéticos de *H. coffeaeformis*.

Considerando la información obtenida en este capítulo, la Fig. 5.13 muestra una síntesis del proceso de acumulación de TAG en *H. coffeaeformis*. Al principio de la FEx se observó un reducido número de PALN, puntiformes, que aumentaron en número y tamaño hacia el último día de la FEx (día 6). Durante la fase de crecimiento estacionaria las Pg y GL continuaron incrementando en número y tamaño, y esta tendencia se mantuvo hasta el final del cultivo. En coincidencia, se observó un incremento del tamaño vacuolar y formación de exopolisacáridos.

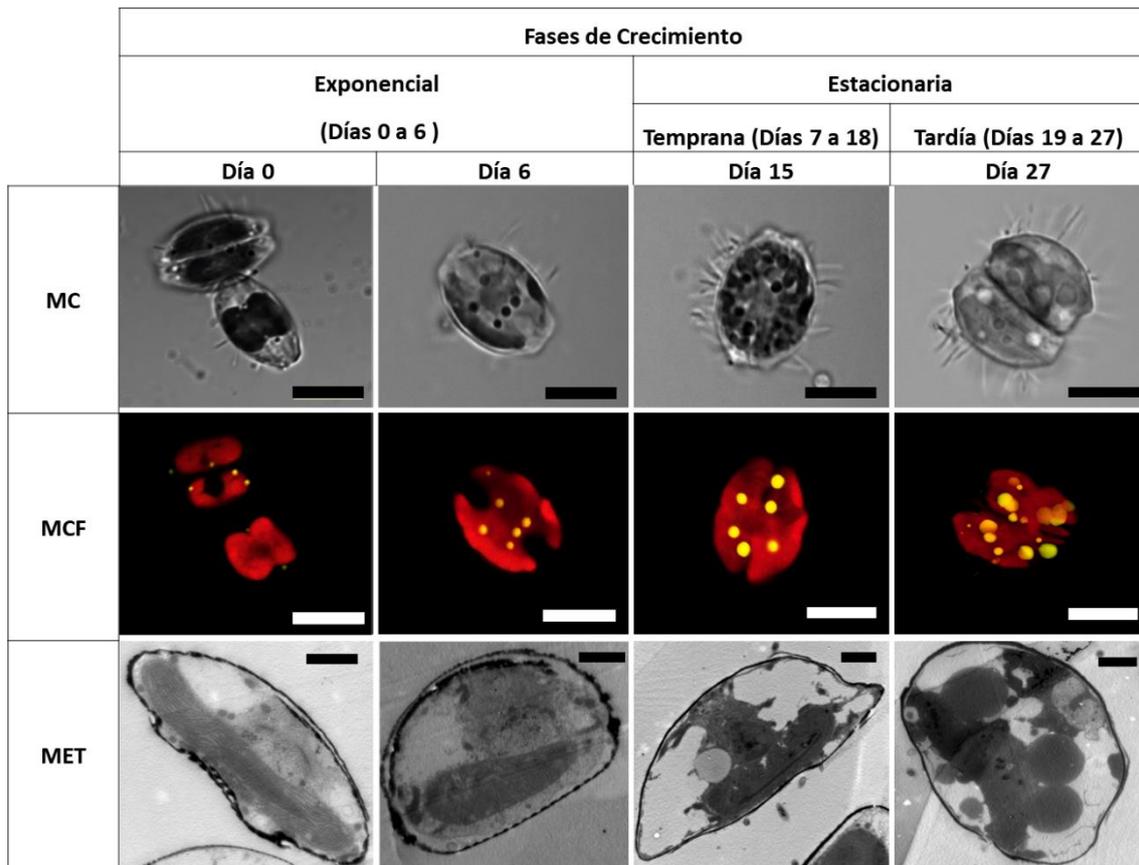


Figura 5.13. Células de *H. coffeaeformis* en diferentes etapas de crecimiento observadas con microscopio de contraste de fases (MC); microscopio confocal de fluorescencia (MCF) y microscopio electrónico de transmisión (MET). Barras de escala: MC y MCF: 10 μm ; MET: 2 μm .

5.4. Conclusión

En este capítulo, una combinación de métodos microscópicos fue usada para analizar la acumulación de TAG en un cultivo bioenergético *outdoor* de *H. coffeaeformis*. En particular, este trabajo representa el primer estudio ultraestructural de acumulación de TAG en el género *Halamphora*, y constituye un gran aporte al reducido número de trabajos ultraestructurales realizados en cultivos bioenergéticos de microalgas a cielo abierto. El MET reveló la presencia y formación de cúmulos de Pg en el estroma cloroplástico; como también el desarrollo de las GL citoplasmáticas y su asociación con la carioteca y la MREC. Durante la FEx no se encontraron GL con el MET, pero si se hallaron PALN con el MCF, en coincidencia con la formación de cúmulos de Pg. Así, el análisis ultraestructural aporta información relacionada con la acumulación de LN, y

confirma que el período de FE_{Tar} es el más adecuado para la cosecha de biomasa rica en TAG en cultivos bioenergéticos de *Halamphora coffeaeformis*.

Capítulo 6 - Caracterización de la pared celular de *Halamphora coffeaeformis* y su posible aplicación como transportador de drogas

6.1. Introducción

Las microalgas presentan una productividad de lípidos, en relación al área de cultivo, superior a cualquier otro cultivo terrestre, lo que las transforma en una fuente alternativa y prometedora de materia prima para biodiésel (S. Wang *et al.* 2022). Como previamente se ha indicado, si bien los cultivos bioenergéticos de microalgas para biodiésel son técnicamente factibles, aun es necesario optimizarlos para alcanzar su rentabilidad a nivel industrial (Dias Hornes da Rosa *et al.* 2023). Una estrategia a aplicar es usar el concepto de biorrefinería microalgal, definida como un sistema de producción y aprovechamiento integral de la biomasa (Wang *et al.* 2022). Mediante este aprovechamiento integral se minimiza el flujo de residuos y se reduce sustancialmente las emisiones de GEI, lo que resulta en una producción ambiental y económicamente más sustentable. Así, la creación de procesos energéticamente eficientes para valorizar la biomasa en biocombustibles y co-productos de alto valor agregado es vital para la sostenibilidad a largo plazo (Reshmy *et al.* 2022).

Las diatomeas, se destacan entre otras microalgas principalmente por la presencia de una pared celular llamada frústulo, formada por dos piezas o tecas que se solapan una con otra como las dos partes de una caja. El frústulo está compuesto principalmente por sílice amorfa hidratada u óxido de silicio ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (Round *et al.* 1990), secundado por otros elementos como C, N, P y S, relacionados con la presencia de proteínas y en menor cantidad por Mg, Na y Ca (Jiang *et al.* 2013, Lechner *et al.* 2015; De Sanctis *et al.* 2016, Xu *et al.* 2021). Morfológicamente, el frústulo presenta una pieza más grande llamada epiteca y otra pieza, ligeramente más pequeña y que encaja dentro de la epiteca, conocida como hipoteca (Fig. 6.1).

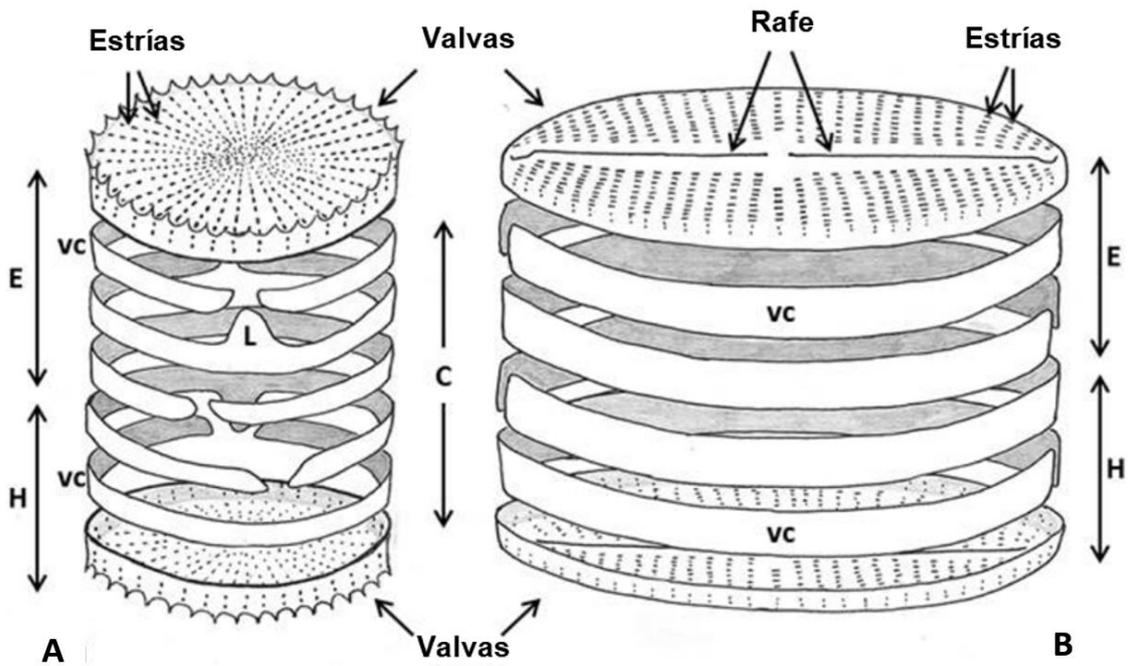


Figura 6.1. Esquemas de la estructura básica de la pared celular de (A) diatomeas céntricas y (B) diatomeas pennadas raquídeas. Cada frústulo comprende dos tecas, una epiteca (E) y una hipoteca (H). Cada teca está compuesta por una valva y una serie de bandas pleurales, P). Las filas de poros (estrías) están orientadas radialmente en las diatomeas céntricas (A), y alrededor de un eje longitudinal de simetría en las diatomeas pennadas (B). (Cox *et al.* 2014)

Las tecas se encuentran finamente perforadas, con una ultraestructura nanométrica (Golubeva *et al.* 2023) y ornamentadas en patrones regulares y simétricos determinados genéticamente (Fig. 6.1)). En cada teca se reconocen dos partes: 1) una única placa, conocida como valva; y 2) varias bandas pleurales en los bordes, conocidas en su conjunto como cíngulo, a través del cual las tecas se solapan entre sí. Así, cada teca posee su propia valva y cíngulo, es decir, la epiteca posee una epivalva y epicíngulo y la hipoteca posee una hipovalva e hipocíngulo. En base a la simetría de las valvas, la clasificación tradicional (Simonsen 1979) divide a la clase Bacillariophyceae en orden Centrales, con simetría radial, fundamentalmente circulares, y orden Pennales, con simetría bilateral, con frústulos primariamente alargados, lanceolados o elípticos. Dentro de este último orden, las diatomeas que presentan un rafe en sus valvas son denominadas raquídeas (Fig.6.1 B)

El silicio, de número atómico 14 (Friedmann *et al.* 2005), es el octavo elemento más abundante en el sistema solar y constituye el 27.7% de la corteza terrestre por peso, siendo el segundo elemento más común después del oxígeno (46.6%) (Henstock *et al.* 2015). Es un elemento metaloide que puede presentarse en forma amorfa o cristalina (Martin 2013). Unido al oxígeno presenta diferentes formas solubles en agua, absorbibles y potencialmente biodisponibles, como el ácido ortosilícico (H_4SiO_4) (Martin 2013). Como se ha mencionado, el frústulo de las diatomeas está compuesto por sílice amorfa, por ende, estas microalgas necesitan absorber silicatos (SiO_4^{4-}) del medio en donde crecen para la síntesis de sus paredes. A nivel industrial, la sílice amorfa es producido de manera sintética y utilizado para diversas aplicaciones como, adsorbentes, catalizadores, separaciones cromatográficas, imágenes celulares, y vacunas, entre otros (Cui *et al.* 2020; Niculescu 2020). En los últimos años, ha llamado la atención por sus prometedores avances para la administración de fármacos (Li *et al.* 2019) y para la ingeniería de tejido óseo en procesos de reparación (Eivazzadeh-Keihan 2020). Una fuente natural de sílice ampliamente utilizada es la diatomita o tierra de diatomeas. Es una roca sedimentaria, formada principalmente por fósiles de frústulos de diatomeas y, en menor medida, por diferentes partículas clásticas y materiales orgánicos, considerados impurezas. Estas impurezas afectan su utilidad a nivel industrial (Harwood 1999). Las características que hacen que la diatomita resulte atractiva para usos industriales son su baja densidad, alta porosidad, baja conductividad térmica, alto punto de fusión (1400 °C a 1750 °C), solubilidad en soluciones alcalinas fuertes y ácido fluorhídrico, y ser químicamente inerte (Harwood 1999). Dentro de sus aplicaciones comerciales se destaca en materiales para filtros, agentes aislantes, abrasivos, absorbentes, materiales de construcción, rellenos minerales, pesticidas, suplementos para el suelo, catalizadores, recubrimientos, aditivos alimentarios, nanotecnología, agentes anti-aglomerantes y aplicaciones farmacéuticas o biomédicas, como la administración de fármacos (Harwood 1999; Ghobara & Mohamed 2019). Sin embargo, la integridad de los frústulos de la diatomita no suele ser buena, ya que la presión en los depósitos subterráneos daña sus estructuras (Jiang *et al.* 2013). Además, esta roca está formada por una mezcla de varias especies, obstaculizando la separación de los diferentes tipos de frústulos y el aprovechamiento de sus características particulares (Jiang

et al. 2013). La diatomita es un recurso fósil no renovable, y su minería y procesamiento pueden tener efectos negativos para la salud humana (Nattrass *et al.* 2015) y ambiental (Harwood 1999; Wantzen & Mol 2013); sin embargo, es un recurso explotado a nivel mundial (Cameron *et al.* 2014). En particular, en Argentina los yacimientos se encuentran en varias provincias, pero la mayoría se ubican en las proximidades de la localidad de Ingeniero Jaccobasi (Provincia de Río Negro) (Gozalvez *et al.* 2004, Fusé *et al.* 2013).

En comparación con la diatomita, los frústulos de cultivos de diatomeas presentan mayor integridad, son más puros al no presentar partículas clásticas y son más homogéneos, ya que pueden provenir de cultivos de especies individuales (Jiang *et al.* 2013). Los frústulos son un material nanoporoso (Amoda *et al.* 2020) y muy diverso, dado que la morfología es específica a nivel de especies (Fu *et al.* 2022). Este último aspecto es muy importante, dado que las diatomeas comprenden un grupo muy diverso taxonómicamente presentando entre 12.000 y 30.000 especies (Malviya *et al.* 2016). Bajo este contexto, en los últimos años se vienen desarrollando numerosos estudios orientados al potencial uso de los frústulos en aplicaciones biomédicas, biotecnológicas, ambientales y nanotecnológicas como: celdas solares (Bandara *et al.* 2020), control hemostático (Wang *et al.* 2021), dispositivos fotoeléctricos y artefactos de protección UV (Li *et al.* 2021), remoción de fármacos y purificación de agua (Yan *et al.* 2021), reparación de huesos (Reid *et al.* 2021), biosensores y transportadores de drogas (Sardo *et al.* 2021), entre otros. Sin embargo, para que estas aplicaciones resulten sostenibles a nivel comercial, es importante optimizar aspectos relacionados con: la selección de especies robustas para su cultivo, métodos de purificación de los frústulos, compatibilización de los frústulos en pruebas ambientales, biomédicas y farmacológicas, entre otras.

En cuanto a los métodos de purificación o limpieza de los frústulos, existen diferentes métodos físicos y químicos para eliminar la materia orgánica asociada a la estructura silíceo. Entre los métodos físicos se puede mencionar el secado, autoclave, calcinación en estufa o calcinación con plasma (Van Eynde *et al.* 2014; Jain *et al.* 2022). Es importante tener en cuenta que un aumento de la temperatura o del tiempo de calcinación pueden ayudar a remover una mayor cantidad de materia orgánica, aunque una temperatura elevada también puede

producir alteraciones en la estructura o composición de los frústulos (Umera *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2013; Van Eyde *et al.* 2014). Entre los tratamientos químicos se puede mencionar, el uso de diferentes ácidos o sustancias oxidantes. Los más comunes son el ácido sulfúrico, el ácido clorhídrico, solución piraña (solución de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno), el ácido nítrico y el peróxido de hidrógeno. Tanto la solución piraña como los ácidos sulfúrico y clorhídrico, son ácidos fuertes que tienen efectos muy agresivos, pueden llegar a dañar la estructura silíceo del frústulo y requieren tratamientos posteriores para terminar de acondicionar el material (Sardo *et al.* 2021). Por otro lado, los tratamientos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o ácido nítrico (HNO₃) son menos peligrosos, aunque requieren un tratamiento adicional de alta temperatura para poder lograr una mayor eficiencia de oxidación (Sardo *et al.* 2021).

Las nanopartículas de sílice mesoporosas (NPSMs o sus siglas en inglés MSNP's), son partículas de origen artificial que se utilizan ampliamente como vehículos de administración de fármacos (Bharti *et al.* 2015), debido a sus notables propiedades físico-químicas que incluyen, resistencia mecánica, estabilidad química, biocompatibilidad y versatilidad sintética. La estructura mesoporosa única de la sílice facilita la carga eficaz de los fármacos y su posterior liberación controlada en el sitio objetivo. Entre las propiedades deseables para la utilización de sílice en sistemas de administración de drogas se puede mencionar: área superficial alta, volumen de poros grande y distribución estrecha del tamaño de los poros (Bharti *et al.* 2015). Además, el potencial zeta, los grupos funcionales en superficie y el rango de tamaño de las nanopartículas, deben ser tenidos en cuenta para garantizar la internalización, la absorción, la liberación controlada y la entrega dirigida de drogas, dado que influyen en la biodisponibilidad de las mismas (Bharti *et al.* 2015). La preparación de NPSMs fue comunicada por primera vez por científicos de la Mobil Company en 1992 y aunque inicialmente se desarrollaron para su uso como soportes de catálisis, pronto se descubrió su potencial aplicación, como sondas de imagen, sensores, materiales ópticos, fotocatalisis, pilas de combustible, sistemas eléctricos y, sobre todo, en el ámbito de la investigación médica (Llinàs & Sánchez-García 2013). La fabricación de NPSM's requiere habilidades avanzadas, que a menudo implican el uso de productos químicos tóxicos, los

cuales pueden derivar en la formación de subproductos contaminantes no reutilizables, haciendo el proceso poco rentable y crítico ambientalmente (Delasoie & Zobi 2019).

En la última década, los frústulos de las diatomeas han sido cada vez más reconocidos como un biomaterial prometedor para aplicaciones de administración de fármacos (Delasoie & Zobi 2019; Tramontano *et al.* 2020) El frústulo representa una fuente alternativa y económica de sílice mesoporoso altamente estructurada, biocompatible y con una superficie potencialmente modificable (Delasoie & Zobi 2019, Yang *et al.* 2023). Sus grupos funcionales son muy estables y abarcan: silanol (Si-O), siloxano (Si-O-Si); hidroxilo (O-H) (generalmente asociado a grupos Si-OH), alcanos (C-H) y carbonilos (C=O) (Golubeva *et al.* 2023). Son materiales micro/nanoportadores ideales, ya que permiten retener la bioactividad y la naturaleza del fármaco cargado y son capaces de transportarlo al sitio de acción. Sus características químicas, la diversidad de sus morfologías, el tamaño y la porosidad, la funcionalización de la superficie ajustable y la biocompatibilidad hacen de los frústulos de las diatomeas una herramienta única en el campo de las aplicaciones de administración de fármacos (Delasoie & Zobi 2019). De acuerdo a este escenario, una amplia gama de propiedades, factores y condiciones de carácter físico, químico, biológico y fisiológico deben cumplirse con el fin de preparar NPSM's a partir de frústulos de diatomeas para su utilización como una nanoplataforma biomédica.

Frente a este escenario y bajo un concepto de biorrefinería, en el presente estudio hemos considerado la posibilidad de obtener sílice amorfa biogénica de una manera renovable a partir de frústulos de cultivos bioenergéticos de *H. coffeaeformis*, con el fin de aumentar la rentabilidad del proceso y valorizar la biomasa en forma integral.

Objetivo general

El objetivo general de este capítulo fue caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los frústulos de *Halamphora coffeaeformis* y su

biocompatibilidad con el tejido sanguíneo, bajo dos condiciones de cultivo, con el fin de evaluar su potencial aplicación en el campo biomédico.

Objetivos específicos

Caracterizar los frústulos de *H. coffeaeformis*, obtenidos a partir de cultivos en fotobiorreactores y en piletas bioenergéticas a cielo abierto, mediante el análisis de:

- Morfología y ultraestructura a partir de microscopía electrónica de barrido (MEB)
- Estabilidad térmica (Análisis termogravimétrico)
- Composición elemental superficial empleando espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X (XPS)
- Composición elemental con MEB-EED (SEM-EDS)
- Área superficial (Área BET)
- Potencial-Z y diámetro hidrodinámico
- Grupos funcionales EITF (FTIR)
- Evaluar la biocompatibilidad en muestras de sangre entera a partir del estudio del efecto hemolítico y la fragilidad osmótica.

Resumen: En primavera de 2021 se realizó un cultivo de *H. coffeaeormis* a cielo abierto, en instalaciones del campus del CERZOS (ver Capítulo 4 de esta Tesis), y al final del mismo se cosechó la biomasa producida y parte de la misma se reservó para la caracterización de los frústulos. Adicionalmente se realizó un cultivo en fotobiorreactor para realizar una caracterización de los frústulos bajo condiciones controladas. La hipótesis de trabajo considerada en este capítulo fue *que las propiedades fisicoquímicas y la biocompatibilidad con el tejido sanguíneo de los frústulos de H. coffeaeformis, son adecuadas para su aplicación en el campo biomédico.*

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Obtención de biomasa para análisis de frústulos

Para la obtención de biomasa y caracterización de los frústulos, se realizaron ensayos bajo dos condiciones: 1) un cultivo realizado en un fotobiorreactor, bajo condiciones controladas, y 2) un cultivo realizado en pileta *raceway* a cielo abierto, bajo condiciones naturales.

Para lograr condiciones controladas, se realizó un cultivo en un fotobiorreactor (FBR) cilíndrico de 25 litros de capacidad, marca Figmay). Se usaron 16 litros de medio de cultivo f/2 (Guillard 1973), preparado a partir de agua de mar estéril y con una salinidad de 30‰. El FBR fue ubicado en un cuarto bajo condiciones controladas, a una temperatura de 20 ± 1 °C, una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 12:12 hs luz:oscuridad. Luego de siete días, el cultivo fue cosechado. Para ello, se detuvo el sistema de paletas del FBR y se esperó un período de 4h para que las células autofloculen. Se retiraron aproximadamente 12 L de sobrenadante, y los 4 L de cultivo floculado fue centrifugado en una centrífuga Rolco 2070 a 3000 rpm durante 10 min. El pellet formado fue lavado dos veces con un buffer de NaCl al 0.9% (pH 7) y centrifugado nuevamente. El pellet resultante fue guardado en un freezer a -18°C hasta su posterior utilización (Biomasa-FBR).

Por otro lado, una muestra de biomasa obtenida durante el cultivo de primavera en pileta *raceway* a cielo abierto (Biomasa-RAC), de acuerdo con lo detallado en el Capítulo 4 de esta Tesis, fue separada y reservada para el análisis de sus frústulos.

6.2.2. Limpieza de frústulos por oxidación y tratamiento térmico

La limpieza o purificación de los frústulos se llevó a cabo primero por un tratamiento químico de oxidación de la biomasa, seguido por un tratamiento térmico de calcinación de los frústulos.

Para la oxidación de la biomasa, 30 g de Biomasa-FBR y 30 g de Biomasa-RAC fueron colocados en vasos de precipitado de 250 ml con 100 ml de peróxido de hidrógeno (30 v v^{-1}) (Fig 6.2 A) y sumergidos en un baño

termostatizado (FAC Ballus) a 80°C durante 12 horas (Fig 6.2 B-C). Una vez cumplido el tiempo, el material fue centrifugado (10 min 3600 RPM) (Marca Rolco 2070) y lavado con agua destilada hasta alcanzar un pH de 7 (Fig 6.2 D). Los frústulos (F) fueron ubicados formando una capa delgada en cajas de Petri (Fig 6.2 E) y llevados a estufa a 60°C durante 2 días (Fig 6.2 F). Los frústulos secos fueron conservados en tubos de centrifuga estériles con tapa rosca en un desecador hasta su análisis. Los frústulos provenientes de fotobiorreactor serán nombrados como F-FBR y los provenientes de la pileta tipo *raceway* como F-RAC.

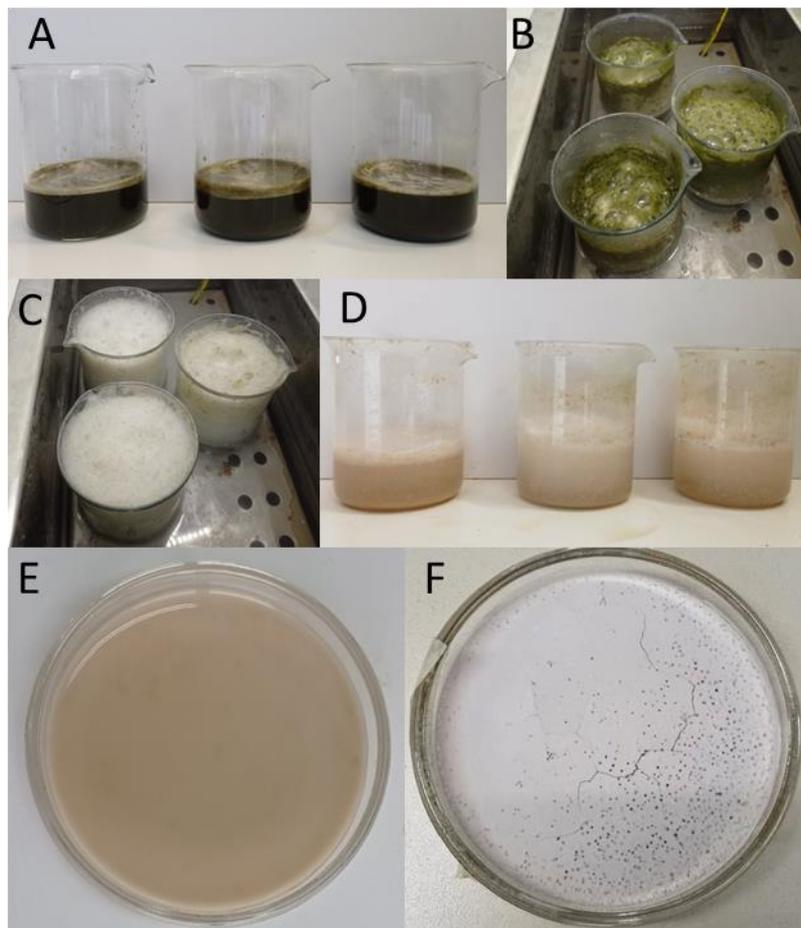


Figura 6.2. Oxidación de biomasa de *Halamphora coffeaeformis* con peróxido de hidrógeno. **A)** Biomasa-RAC en vasos de precipitado de 250 ml con 100 ml de peróxido de hidrógeno (30 v v^{-1}). **B)** Inicio de la oxidación de la biomasa en baño termostatizado a 80°C. **C)** Fin de la oxidación de la biomasa en baño termostatizado. **D)** Biomasa oxidada (Frústulos). **E)** Frústulos húmedos en placa de Petri. **F)** Frústulos secos en placa de Petri.

Previamente al tratamiento térmico, se realizó un análisis termogravimétrico preliminar con los F-FBR, con el fin de determinar el efecto de la temperatura sobre el peso de los frústulos y de esta manera poder seleccionar las temperaturas adecuadas para el tratamiento de calcinación. Para ello, se colocaron submuestras de 30 mg en un Analizador Termogravimétrico TA Instruments Discovery TGA-5500 (Fig. 6.3), al cual se le aplicó un flujo de aire (25 mL min^{-1}) hasta alcanzar 1000°C a una velocidad de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el análisis termogravimétrico, los frústulos fueron sometidos a tres tratamientos térmicos (300°C , 500°C y 800°C), con el fin de completar su limpieza. Para ello, los frústulos tratados por el método de oxidación fueron llevados a una estufa con circulación de aire, la cual se ajustó a las temperaturas seleccionadas durante 1 hora. También se reservó una parte de los frústulos de ambos cultivos sin calcinar (60°C , temperatura de estufa de secado), con el fin de realizar futuras comparaciones. El material fue guardado en tubos de centrífuga estériles con tapa rosca y conservado en desecador hasta su posterior análisis.

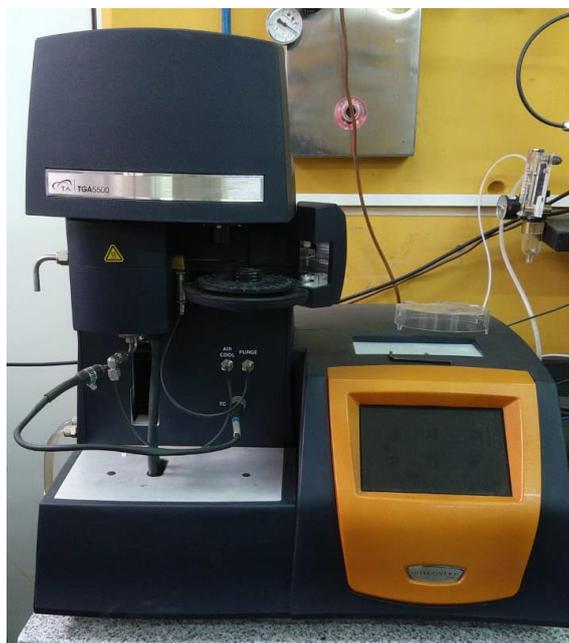


Figura 6.3. Analizador termogravimétrico (TGA 5500) utilizado para realizar el análisis.

6.2.3. Composición elemental superficial

El análisis de la composición elemental superficial de los frústulos se realizó mediante Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS), con un

Espectrómetro ESCA PHI 548 (Fig. 6.4), equipado con un analizador cilíndrico de doble paso. Esta técnica permite determinar el estado químico y la composición elemental de las primeras capas atómicas de un material (típicamente de entre 0.5 a 3 nm de profundidad) mediante la irradiación de la muestra con rayos X blandos (Briggs & Grant 2003). En este caso, se empleó la radiación no monocromática del ánodo de Al a 250 W (12.5 kV a 20 mA). Los espectros de resolución se adquirieron a una energía de paso de 50 eV, lo que proporcionó una resolución absoluta de aproximadamente $\pm 0,5$ eV. La presión base de operación se mantuvo por debajo de 5×10^{-9} Torr. La energía de ligadura del orbital 2p del silicio se utilizó como referencia de carga y se fijó en 102,6 eV. La deconvolución de las señales se llevó a cabo mediante suma de funciones Gaussianas y Lorentzianas y resta de fondo de tipo Shirley y. De esta forma, la estimación de las concentraciones atómicas de los elementos se llevó a cabo al relacionar las áreas de los picos luego de la sustracción del fondo, y se corrigieron en función de los factores de sensibilidad atómica correspondientes, dentro de un error absoluto aproximado del 20%.



Figura 4. Espectrómetro ESCA PHI 548

6.2.4. Morfología y composición elemental

El estudio de la morfología ultraestructural del frústulo y la composición elemental subsuperficial se llevó adelante con un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), equipado con un sistema de Rayos x de Energía Dispersiva (SEM-EDS). Este método mide la composición elemental en un rango entre 700 y 1900 nm (Georget *et al.* 2021), abarcando la totalidad del frústulo. El estudio se realizó sobre 20 frústulos elegidos al azar, sobre los cuales se tomó una micrografía y se analizó tamaño y composición elemental. Para preparación del material, submuestras de frústulos tratados por oxidación y bajo las tres condiciones de calcinación fueron montadas en soportes de vidrio, secadas a temperatura ambiente y metalizadas con oro en un Equipo de Pulverización Iónica JEOL JFC-1100. Distintas submuestras fueron observadas en un microscopio LEO, EVO-40XVP (CCT-CONICET, Bahía Blanca). La terminología referida a la morfología del frústulo sigue la nomenclatura convencional de Anonymous (1975) y Round *et al.* (1990). Las micrografías fueron analizadas y separadas en capas con el programa Adobe Photoshop CS6. Las capas se vectorizaron con el programa Inkscape y fueron cargadas y ensambladas en el software. Los aspectos finales del modelo digital se moldearon en la página <https://stephaneginier.com/sculptgl/>. Finalmente se realizó una impresión 3D con una impresora CoLiDo™ 3.0. L, obteniendo una réplica tridimensional representativa de la morfología de *H. coffeaeformis*.

6.2.5. Área superficial BET

El método BET permite determinar la superficie de un sólido basándose en la adsorción de un gas inerte, generalmente N₂, a baja temperatura. La ecuación ó isoterma BET, es la forma más común de determinar los valores de monocapa y área específica en diversas ramas de la físicoquímica (Naderi 2015). En este método, se utiliza la fisisorción de una monocapa de gas, que suele ser débil y reversible, sobre un sólido para realizar la medición. Es necesario enfriar el sólido y estimar la cobertura de la monocapa. A partir de la cobertura estimada, se puede calcular el área superficial del material. El cálculo del área cubierta

toma en consideración la cantidad de gas o vapor utilizado para formar la monocapa, así como las dimensiones y el número de moléculas involucradas en el proceso (Naderi 2015).

El área superficial de los frústulos se midió con un Analizador de Área Superficial y Tamaño de Poro Nova 1200e (Fig. 6.5).



Figura 6.5. Analizador de Área Superficial y Tamaño de Poro Nova 1200e.

6.2.6. Presencia de grupos funcionales

La presencia de grupos funcionales en los frústulos fue estudiada mediante Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), utilizando un Espectrofotómetro Vertex 70 (Bruker). Para la adquisición de los espectros, se utilizó una resolución espectral estándar de 4 cm^{-1} en el rango espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , con 64 acumulaciones por muestra.

6.2.7. Potencial Zeta

La medición del potencial Zeta (ζ) de los frústulos en suspensión acuosa se realizó de acuerdo a la técnica de microelectroforesis láser Doppler

(Bhattacharjee 2016). Es una técnica indirecta que se basa en la determinación de la movilidad electroforética y en la aplicación de ecuaciones matemáticas para su cálculo. Cuando una partícula con carga eléctrica se dispersa en un medio acuoso, se produce una doble capa eléctrica (EDL) alrededor de ella como resultado de la interacción entre la carga de la partícula y las moléculas y iones del medio acuoso. Al aplicar un campo eléctrico a dicha dispersión, las partículas cargadas se mueven hacia el electrodo opuesto (electroforesis). El ζ se deduce de la movilidad electroforética de partículas cargadas bajo la acción del campo eléctrico. Refleja la diferencia de potencial entre la EDL de partículas electroforéticamente móviles y la capa dispersante que las rodea en el plano de deslizamiento. Para determinar este desplazamiento, se utiliza un haz láser incidente y se mide el cambio de su fase o frecuencia causado por el movimiento de las partículas. Esta medición es convertida matemáticamente en el valor del ζ por medio de la ecuación de Smoluchowski o Hückel, según el tamaño de la EDL. (Bhattacharjee 2016). Esta técnica permitió obtener información sobre la carga superficial de los frústulos a un pH 7.

Para medir el ζ de los frústulos, se prepararon dispersiones con una concentración de 1 mg mL^{-1} y se sometieron a tratamiento ultrasónico durante 30 minutos. Se utilizó NaCl $0,01\text{M}$ como electrolito soporte. Las mediciones del potencial zeta se realizaron usando un Malvern Zetasizer Nano ZS90.

6.2.8. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersión

El diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersión de las partículas se analizaron de acuerdo a la metodología de Dispersión de Luz Dinámica (DLS). El diámetro hidrodinámico (DH), es una estimación del tamaño de las nanopartículas que tiene en cuenta su composición, carga, forma e interacción con el medio circundante. El índice de polidispersión (IPD) es una estimación de la polidispersión de las partículas en suspensión, es decir, la variabilidad en el tamaño de las partículas dentro de una muestra. Esto es particularmente importante en aplicaciones donde se requiere un tamaño de partícula homogéneo. Los valores de índice de polidispersión (IPD) obtenidos por DLS pueden indicar si una muestra es altamente monodispersa ($\text{IPD} \leq 0,1$),

moderadamente monodispersa ($0,1 < IPD \leq 0,5$) o polidispersa ($IPD > 0,5$) en el medio estudiado. (Bhattacharjee 2016)

Esta técnica, se basa en la interacción de la luz con partículas en suspensión y en su movimiento browniano, expresada en una función de correlación (Bhattacharjee 2016). La función de correlación proporciona información sobre el tamaño de las partículas. Finalmente, los datos obtenidos de la curva de correlación son transformados en medidas de diámetro hidrodinámico y distribución de tamaños utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$DH = \frac{KT}{6\pi\eta R} \quad (\text{Ecuación } 6.1)$$

Donde, DH es el diámetro hidrodinámico, K la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, η la viscosidad del disolvente y R radio de la partícula esférica.

Para llevar a cabo la medición del DH, se prepararon dispersiones de frústulos en agua destilada con una concentración cercana a 1 mg mL^{-1} , las cuales fueron sometidas a un tratamiento ultrasónico de 30 minutos. Posteriormente, se tomó 1 mL de la suspensión y se colocó en una celda de vidrio de 12 mm de camino óptico. Para realizar las mediciones, se empleó un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS90.

6.2.9. Caracterización de hemoglobina libre media y fragilidad osmótica de eritrocitos

Una vez obtenida la información relativa a la caracterización de los frústulos bajo ambas condiciones de cultivo, se analizaron los resultados y se procedió a la selección de los frústulos con tratamientos térmicos de 300 y 500°C para la realización de las pruebas de biocompatibilidad con muestras de sangre. En este sentido, se evaluó el efecto sobre los glóbulos rojos en términos de hemólisis (determinación de hemoglobina libre) e integridad de la membrana plasmática (ensayo de fragilidad osmótica). Para el ensayo de hemoglobina libre se utilizaron solo los tratamientos F-FBR 300 y F-RAC 300 de manera preliminar.

Para el ensayo de fragilidad osmótica se utilizaron los tratamientos F-FBR 300, F-FBR 500, F-RAC 300 y F-RAC 500.

Los ensayos en sangre se llevaron a cabo de acuerdo a las Guías de Buenas Prácticas Clínicas de la Declaración de Helsinki (ICH GCP Guidelines), a la disposición nacional argentina de ANMAT 6677/10 y a la ley N° 11044 de la Provincia de Buenos Aires bajo el consentimiento de los donantes. Las muestras fueron recolectadas por punción venosa empleando EDTA 5 mM como anticoagulante.

6.2.10. Determinación de hemoglobina libre

La determinación de hemoglobina libre brinda información acerca del efecto hemolítico de las sustancias estudiadas. En condiciones normales, la hemoglobina se encuentra en el interior de los eritrocitos. Frente a ciertas circunstancias inductoras de lisis, la misma se libera al plasma y la puede ser detectada analíticamente (Rosa *et al.* 2020).

Los eritrocitos fueron tratados durante 1 hora con una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de F-FBR 300 y de F-RAC 300. Para esto se preparó una suspensión de 3 mg de frústulos de *H. coffeaeformis* en 3 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9%). Luego se colocaron 0,5 ml de sangre en eppendorfs y se les agregó 0,5 ml de la suspensión de solución fisiológica y frústulos. Además, se realizó un control con solución fisiológica sin frústulos. Los eppendorfs fueron colocados en un agitador durante una hora a 40 rpm. Luego, cada muestra se incubó en NaCl (0,9%) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se realizó una centrifugación durante 10 minutos a 6000 rpm con el objetivo de separar el plasma de las células no lisadas. Se agregaron 0,3 ml de plasma a 2,7 ml de Na_2CO_3 10 mg.dl^{-1} en tubos de ensayo y se midieron las absorbancias a 415 nm, 450 nm y 700 nm (espectrofotómetro synergy-HT Biotek). Estas absorbancias fueron utilizadas para estimar la Hb libre media utilizando la siguiente ecuación (Rosa *et al.* 2020)

:

$$Hb \text{ libre media } (\text{mg dL}^{-1}) = 155.ABS_{415} - 130.ABS_{450} - 124ABS_{700}$$

(Ecuación 6.1)

Donde ABS_{415} , ABS_{450} y ABS_{700} son las absorbancias a 415 nm, 450 nm y 700 nm, respectivamente. Cada tratamiento fue analizado por triplicado.

6.2.11. Fragilidad osmótica

La prueba de fragilidad osmótica se emplea para evaluar la resistencia de los eritrocitos a la ruptura por la acción de la presión osmótica sobre la membrana de los eritrocitos, cuando se colocan en soluciones salinas hipotónicas. Es un indicador de la relación volumen/superficie celular, utilizado para evaluar las propiedades de las membranas citoplasmáticas y el efecto sobre el volumen intracelular (Alonso-Geli *et al.* 2015)

La evaluación de la fragilidad osmótica en los eritrocitos se llevó a cabo utilizando una serie de diluciones de NaCl. Los eritrocitos fueron tratados durante 1 hora con una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cuatro de los tratamientos de frústulos seleccionados (F-FBR 300, F-FBR 500, F-RAC 300 y F-RAC 500). Luego, cada muestra se incubó en diluciones de NaCl (0–0,9%) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se realizó una centrifugación durante 10 minutos a 6000 rpm con el objetivo de eliminar las células no lisadas. El porcentaje de hemólisis se determinó espectrofotométricamente a 540 nm en un lector de placas múltiples (synergy-HT Biotek). Cada condición se realizó en triplicado y la hemólisis se expresó como % de la condición de hemólisis del 100% (0% NaCl) (Benson & Swallen 1964). Se analizó un control que consistió en el tratamiento de eritrocitos utilizando una serie de diluciones de NaCl sin el agregado de frústulos.

6.3. Resultados

6.3.1. Descripción morfológica del frústulo

Micrografías de células y frústulos de *Halamphora coffeaeformis* obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) se muestran en la Fig. 6.6. Esta especie presenta células solitarias con frústulos complejos, similares a un tercio de una naranja, y con algunas desviaciones de la descripción tradicional de las diatomeas pennadas. Considerando su asimetría, presentan una vista ventral y una vista dorsal. En la Fig. 6.6 A se observan dos células enteras con su forma

típica preservada mediante la metodología de punto crítico. En la célula superior, en vista ventral, se observan las dos valvas, y en la célula inferior, en vista dorsal, se observan las numerosas bandas que conforman el cingulo. Las valvas son semi-lanceoladas y asimétricas, con un margen dorsal convexo y un margen ventral de recto a ligeramente cóncavo, en donde se ubica el rafe. Llamativamente ambos rafe se observan en la misma vista ventral. Células en vista dorsal elípticas, con extremos rostrados cortos (Fig. 6.6 A). Valvas con extremos subcapitados (Fig. 6.6 C y G), excepto algunos especímenes más pequeños con extremos indiferenciados (Fig. 6.6 B), con un tamaño de 3,2 μm a 7,8 μm de ancho y 15,3 μm a 39,6 μm de largo. Rafe débilmente arqueado, alineado y cerca del margen ventral de la valva (Fig. 6.6 C y G). Terminaciones proximales del rafe rectas (Fig. 6.6 D y H) y terminaciones distales levemente desviadas hacia el margen dorsal (Fig. 6.6 E y I). Rafe proximal interno recto con helictoglosas centrales fusionadas (Fig. 6.6 D); y extremos distales desviados ventralmente en helictoglosas poco desarrolladas (Fig. 6.6 E). Estrías dorsales biseriadas (Fig. 6.6 D, E, H, I y J), las centrales bifurcadas (Fig. 6.6 D y H). Presentan 22,1 ($\pm 0,17$) estrías dorsales cada 10 μm , y 123 ($\pm 4,5$) areolas cada 10 μm . En general, las areolas presentan un tamaño de 37,9 ($\pm 9,46$) nm. Cingulo compuesto por varias bandas pleurales que rodean toda la cara valvar (Fig. 6.6 F), más anchas dorsalmente, con dos filas de poroides (Fig. 6.6 L) y afinadas en la cara ventral, con una sola fila de poroides (Fig. 6.6 M). Presentan 44,6 ($\pm 1,5$) poroides cada 10 μm (Fig. 6.6 L y M), con un tamaño de poroides de 91,4 nm ($\pm 24,6$ nm).

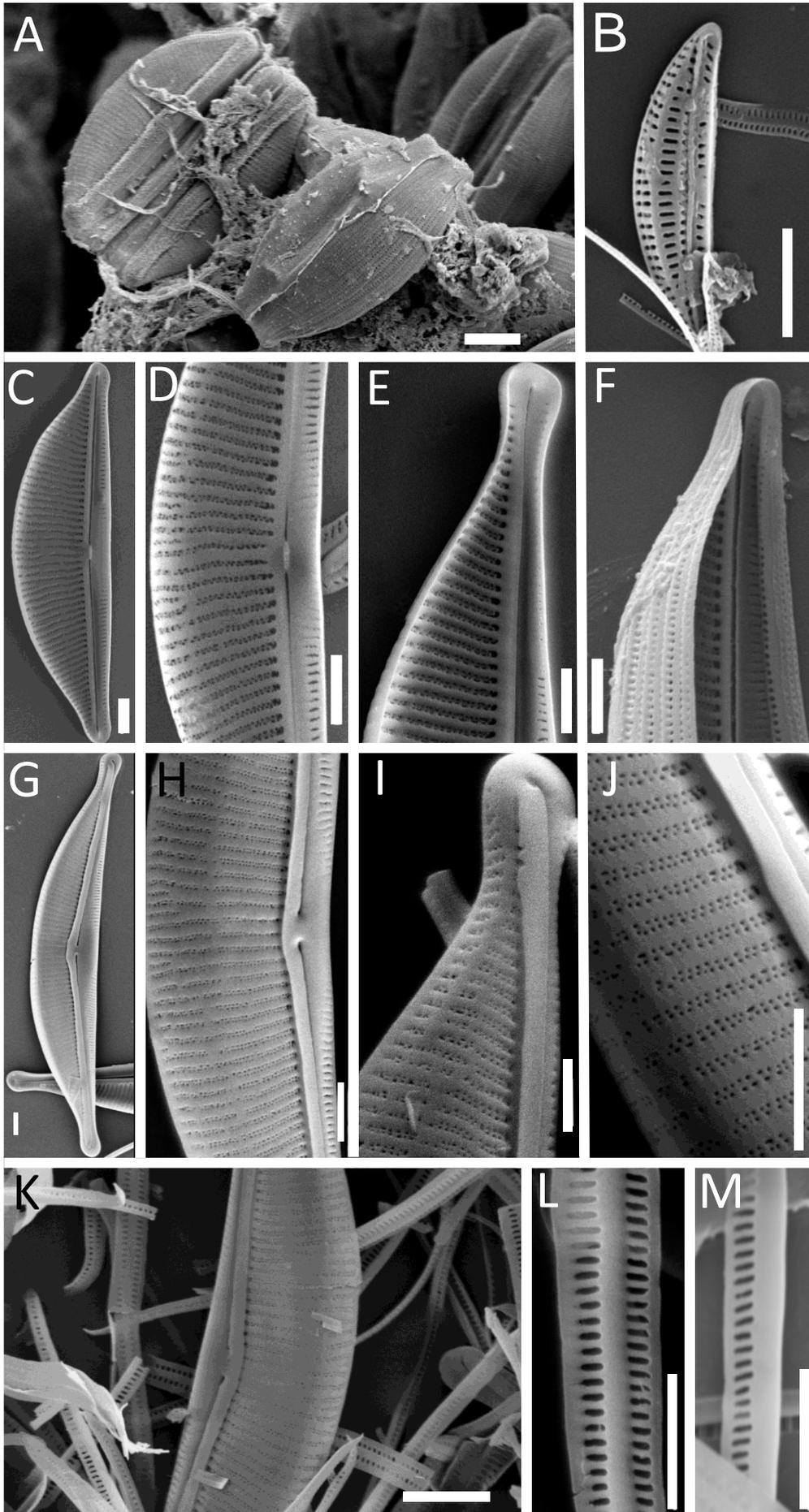


Figura 6.6. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de *Halamphora coffeaeformis*. **A)** Células en vista ventral (superior) y dorsal (inferior); **B)** Vista externa de un espécimen pequeño; **C–F)** Vistas internas de las valvas; **C)** Valva completa; **D)** Detalle del área central y extremos proximales del rafe; **E)** Detalle del extremo de la valva; se observa el extremo distal del rafe y la helictoglosa; **F)** Detalle del extremo de la valva con bandas pleurales unidas a la valva; **G–J)** Vistas externas de las valvas; **G)**, Valva completa; **H)** Detalle del área central y extremos proximales del rafe; **I)** Detalle del extremo de la valva; se observa el extremo distal del rafe; **J)** Detalle de estrías biseriadas; **K)** Vista externa de la valva rodeada de bandas pleurales dorsales y ventrales; **L)** Detalle de zona dorsal de banda pleural con doble fila de poroides; **M)** Detalle de zona ventral de banda pleural con una sola fila de poroides. Barra de escala: **A** = 4 μm ; **B–M** = 2 μm .

La Figura 6.7 muestra los resultados obtenidos con el modelado tridimensional del frústulo de *H. coffeaeformis*. La representación de la morfología del frústulo fue exitosa partiendo de micrografías de SEM (Fig 6.7 A), vectorizadas, ensambladas (Fig. 6.7 B) y ajustadas (Fig. 6.7 C). El resultado final de la impresión 3 D del frústulo se observa en las Figs. 6.7 D, E y F. La Fig. 6.7 D muestra la impresión en vista ventral y la Fig. 6.7 E en vista dorsal. La Fig. 6.7 F muestra las dos tecas separadas, además de sus lados interno y externo.

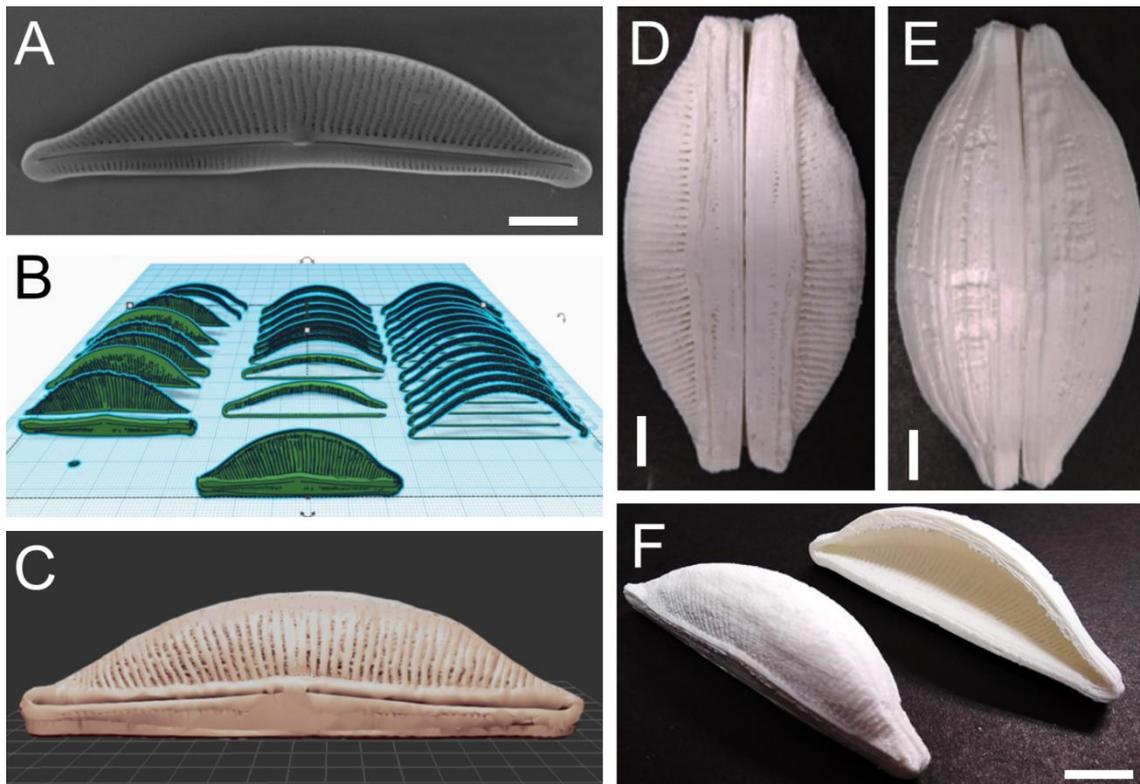


Figura 6.7. Modelado tridimensional de *H. coffeaeformis*. **A** Vista interna de valva. **B** Imágenes vectorizadas del frústulo ensambladas en el software Tinkercad. **C** Modelo del frústulo ensamblado y ajustado en el sitio web <https://stephaneginier.com/sculptgl/>. **D-F** Impresiones 3-D de frústulos de *H. coffeaeformis*; **D** Vista ventral; **E** Vista dorsal; **F** Vistas interna y externa del modelo impreso de las tecas. Barras escala: **A** = 3 μ m; **D-F** = 2 cm.

6.3.2. Análisis termogravimétrico

La Figura 6.8 muestra los resultados del análisis termogravimétrico de los F-FBR de *H. coffeaeformis*. Los valores de temperatura relacionados con una mayor pérdida de peso, con respecto al peso inicial, fueron: 1) 50°C (2%); 2) 300°C (11%) y 3) 500°C (9,5%). Por otro lado, a partir de 800°C los valores de la derivada de pérdida de peso se redujeron a valores próximos a cero, por lo que, a partir de este punto, la masa se vuelve constante.

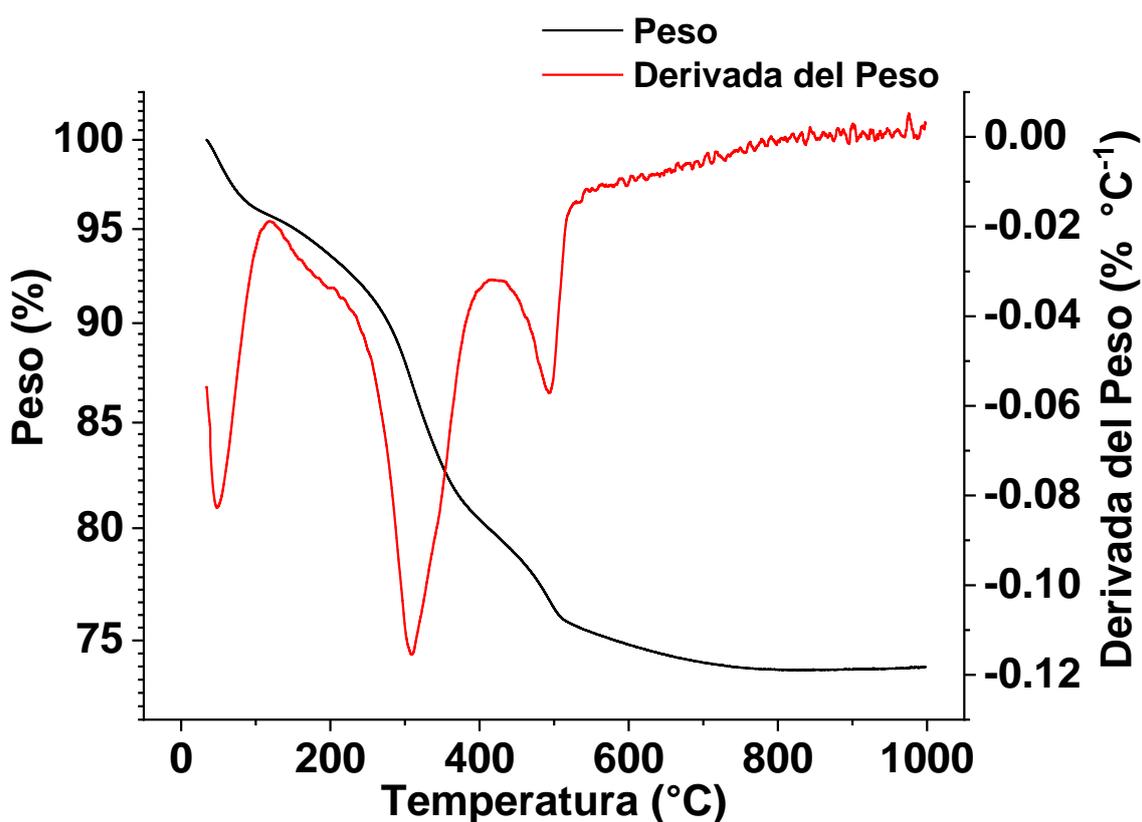


Figura 6.8. Análisis termogravimétrico de frústulos de *H. coffeaeformis* obtenidos en fotobiorreactor (F-FBR). Porcentaje del peso inicial y derivada del porcentaje del peso inicial en relación con la temperatura.

6.3.3. Composición elemental con XPS y EDS

El análisis de la composición elemental superficial de los frústulos de *H. coffeaeformis* (F-FBR y F-RAC) mediante XPS puede observarse en las Fig. 6.9 A y C. Hasta los 500°C, los F-FBR (Fig. 6.9 A) mostraron una marcada disminución del porcentaje atómico de carbono (C) (40,4% a 15 %) y un aumento de silicio (Si) (18,4% al 26,4%) y de oxígeno (O) (40,2% a 57,7%). Además, se encontró ~ 1,5% de calcio (Ca) en todos los tratamientos, y 1,8% de nitrógeno

(N) en el tratamiento a 300°C. En cuanto a los F-RAC, el C disminuyó hasta una calcinación de 500°C (43,25% a 22,25%) y el Si y O aumentaron de 9% a 12% y de 40,2% a 55,8%, respectivamente. Además, se encontró presencia de Ca (3,36% a 4,27%) y P (4% a 5%) en todos los tratamientos (Fig. 6.9 C).

El análisis de la composición elemental de los frústulos de *H. coffeaeformis* mediante EDS puede observarse en las Fig. 6.9 B y D. Los F-FBR (Fig. 6.9 B) mostraron una marcada disminución de C (40,9% a 29 %) hasta una calcinación de 500°C, mientras que el Si subió de 18,6% a 21,1%, y el O aumentó de 31.7% a 42.6%. Se encontró alrededor de 3 % de Ca, 4,5 de sodio (Na) y 1% de magnesio (Mg) en todos los tratamientos de F-FBR. En cuanto a los F-RAC, el C disminuyó hasta una calcinación de 500°C (24% a 21,3%), mientras que el Si aumentó levemente de 20% a 22.7% y el O varió entre 44.6% y 49.2%. (Fig. 6.9 D). Adicionalmente, se encontró entre 2.6% y 3.9% de Ca, entre 5.2 y 6.1% Na y alrededor de 1.5 % de Mg en todos los tratamientos de F-RAC

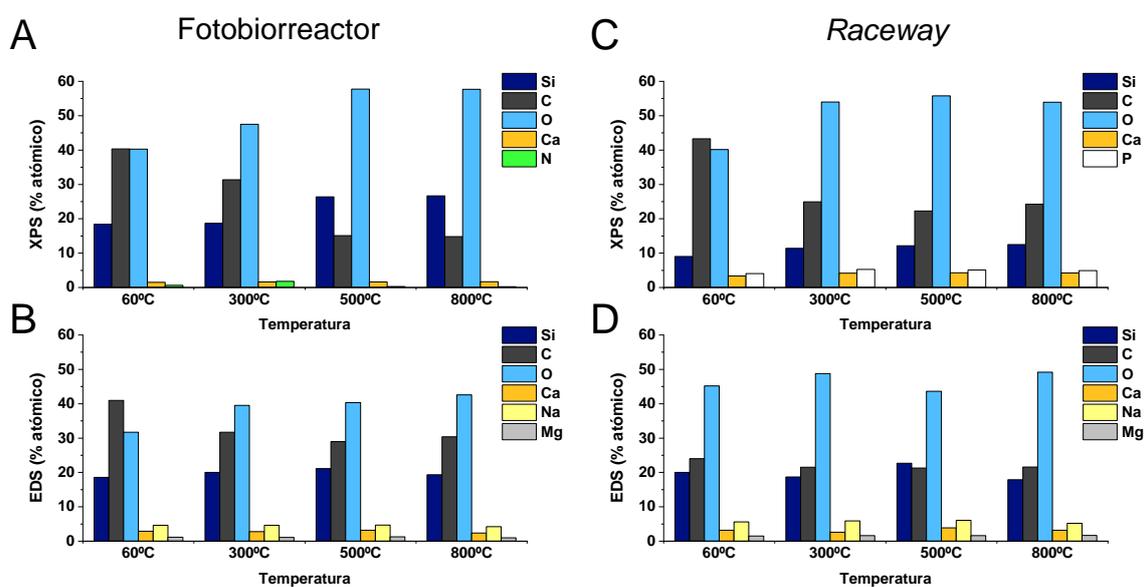


Figura 6.9. Resultados de la composición elemental (CE) de frústulos de *H. coffeaeformis* a diferentes temperaturas. CE superficial, medida por XPS (A y C) y CE medida por EDS (B y D). F-FBR (A y B) y F-RAC (C y D)

6.3.4. Presencia de grupos funcionales

La Figura 6.10 muestra los espectros IF-RTA de los frústulos F-FBR (Fig. 6.10 A) y F-RAC (Fig. 6.10 B) de *H. coffeaeformis* para cada tratamiento (60°C, 300°C,

500°C y 800°C). En todos los tratamientos para ambos cultivos, se observaron bandas de absorción correspondientes a: hidroxilos (O-H) de grupos Si-OH (3100 a 3500 cm^{-1}), alcanos (C-H) (2939 and 2860 cm^{-1}), O-H (1670 cm^{-1}), silanol (Si-O) (956, 445 cm^{-1}) y siloxanos (Si-O-Si) (1220 a 1050 cm^{-1} , 805 cm^{-1}). Además, en F-FBR 60°C, F-FBR 300°C y F-RAC 60°C se observan grupos carbonilos (C=O) (1732 cm^{-1}). Estos grupos dejan de observarse a 500°C. De la misma manera, la intensidad de los picos correspondientes a alcanosC-H y Si-OH disminuyeron su intensidad a 800°C.

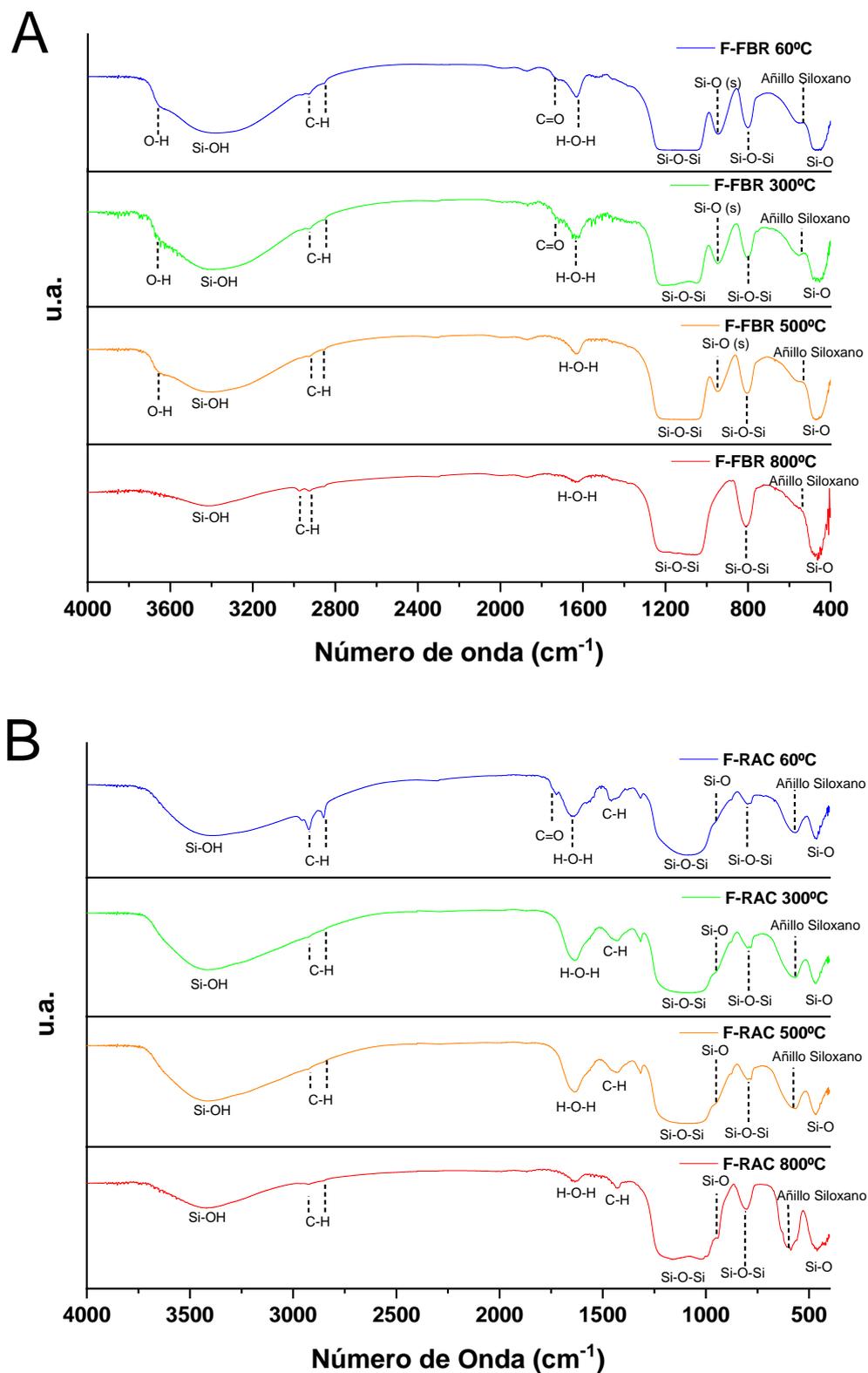


Figura 6.10. Espectros IF-RTA de frústulos de *H. coffeaeformis* con diferentes tratamientos térmicos (60°C, 300°C, 500°C y 800°C) obtenidos en fotobiorreactor (A) y en pileta tipo *raceway* (B)

6.3.5. Área superficial BET

La Figura 6.11 muestra los resultados de área superficial medidos con el método de Brunauer-Emmet-Teller (BET). Los F-RAC (Fig. 6.11 B) presentaron valores superiores de área BET comparado con los F-FBR (Fig. 6.11 A). Los F-FBR mostraron un valor máximo de $27 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ con una calcinación a 300°C , mientras que los F-RAC mostraron un valor máximo de $68.6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ también a 300°C . Esta información coincide con el punto de mayor pérdida de peso por calcinación, que se encontró a 300°C (Fig. 6.8).

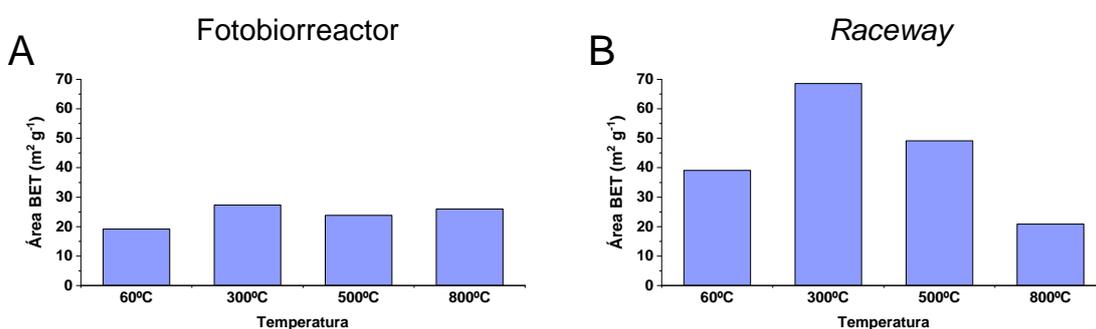


Figura 11. Resultados del área superficial BET de frústulos de *H. coffeaeformis* con diferentes tratamientos térmicos (60°C , 300°C , 500°C y 800°C) obtenidos en fotobiorreactor (A) y en pileta tipo *raceway* (B)

6.3.6. Diámetro hidrodinámico (DH), índice de polidispersión (IPD) y potencial zeta (ζ)

En la Tabla 6.1 se presentan los resultados correspondientes a DH, IPD y ζ de los frústulos de *H. coffeaeformis* para los diferentes tratamientos térmicos. Los F-FBR y F-RAC presentaron un DH entre $398,4 \text{ nm}$ y $485,3 \text{ nm}$ y entre $412,9 \text{ nm}$ y $504,3 \text{ nm}$, respectivamente. El IPD indica que las partículas de los frústulos son moderadamente monodispersos ($0,1 < \text{IPD} \leq 0,5$) (Bhattacharjee 2016). Los valores de potencial z de los F-FBR y F-RAC fueron del orden de -33 mV y -20 mV , respectivamente; sugiriendo una mayor estabilidad de la dispersión en el medio acuoso y la presencia de no agregados en los F-FBR.

Tabla 6.1. Diámetro hidrodinámico (DH), índice de polidispersión y potencial zeta (ζ) por DLS (Dynamic Light Scattering) de frústulos de *H. coffeaeformis* obtenidos en FBR y piletas tipo *raceway* para diferentes tratamientos de temperatura (60°C, 300°C, 500°C y 800°C).

Tratamientos	DH (nm)	IPD	ζ (mV)	ζ Desviación (mV)
F-FBR 60°C	-	-	-34,3	5,48
F-FBR 300°C	398,4	0,307	-33,1	4,63
F-FBR 500°C	485,3	0,462	-34,5	4,7
F-FBR 800°C	483,3	0,415	-33,6	5,04
F-RAC 60°C	-	-	-20.2	3.89
F-RAC 300°C	504.3	0.412	-23.6	5.05
F-RAC 500°C	412.9	0.356	-23.2	4.82
F-RAC 800°C	429.6	0.337	-26.9	4.95

6.3.7. Caracterización de hemoglobina libre media y fragilidad osmótica de eritrocitos

La mezcla realizada entre la suspensión de frústulos en solución fisiológica y sangre ($1 \text{ v } \text{v}^{-1}$) no afectó la estructura de los eritrocitos, los cuales presentaron una apariencia lisa y un tamaño de $5,35 \mu\text{m}$ ($\pm 0,14 \mu\text{m}$) (Fig. 6.12). Los ensayos hematológicos relacionados con el efecto hemolítico de F-FBR y F-RAC a 300°C no evidenciaron valores de Hb libre mayores a $10 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ (Fig. 6.13). Este resultado indica que los frústulos no indujeron hemólisis en las condiciones de estudio (Rosa *et al.* 2020).

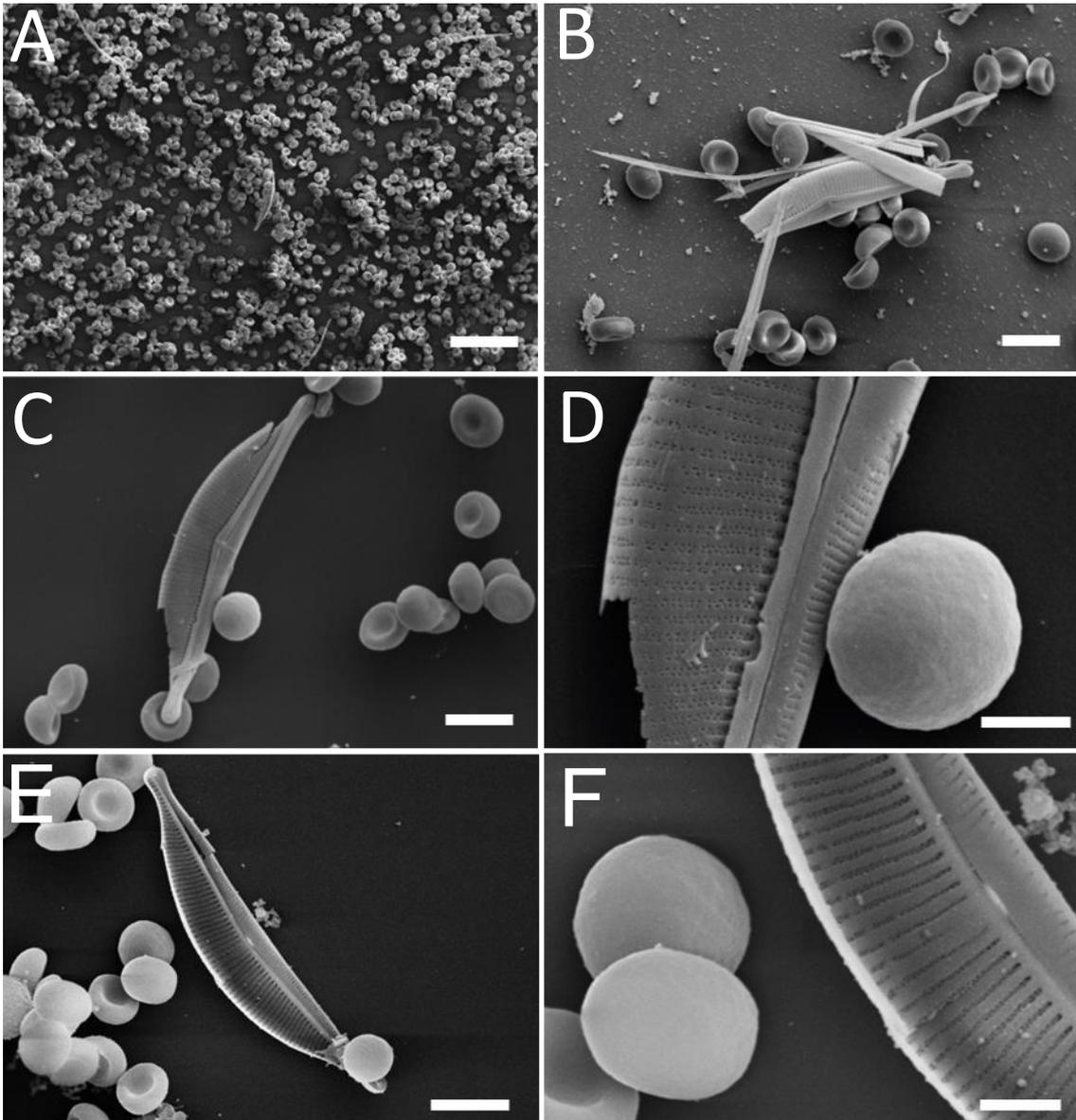


Figura 12. Micrografías con MEB de una mezcla de frústulos de *H. coffeaeformis* con eritrocitos de sangre humana. **A)** Frústulos rodeados de eritrocitos. **B)** Valva y restos de cópulas próximos a eritrocitos. **C)** Vista externa de una valva con un grupo de eritrocitos. **D)** Detalle de vista exterior de una valva junto a un eritrocito. **E)** Vista interior de una valva con un grupo de eritrocitos. **F)** Detalle de vista interior de la valva mostrando estrías con poros y helioplax central del rafe. Barra de escala: A = 30 μm ; B, C y E = 6 μm ; D y F = 2 μm .

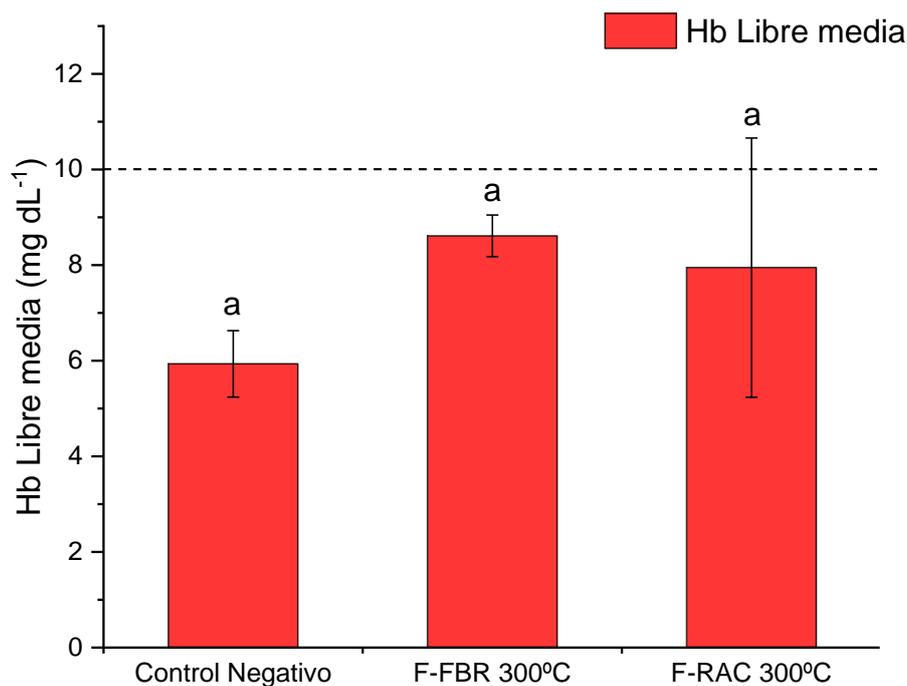


Figura 6.13. Hemoglobina (Hb) libre media en plasma sanguíneo sometida a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de frústulos de *H. coffeaeformis* calcinados a 300°C y provenientes de cultivos en FBR y pileta *raceway*. La línea punteada indica el valor de referencia normal de hemoglobina libre en plasma: hasta 10 mg. dl^{-1} .

Con respecto a los resultados de fragilidad osmótica para los diferentes tratamientos (Fig. 6.14); en osmolaridades de 11%, 38%, 56%, 69% y 100% ($F = 0,00$, $p > 0,05$; $F = 0,93$, $p > 0,05$; $F = 3,71$, $p > 0,05$; $F = 1,22$, $p > 0,05$; $F = 1,63$, $p > 0,05$, respectivamente), los F-FBR 300°C , F-FBR 500°C y F-RAC 500°C no mostraron diferencias significativas con el control. Por otro lado, en osmolaridades de 60%, 64% y 73%, los F-FBR 300°C mostraron valores significativamente mayores que los del control ($F = 31,25$, $p < 0.05$; $F = 70,23$, $p < 0.01$; $F = 4,17$, $p < 0.01$). En osmolaridades de 42%, 47% y 51%, los F-RAC 300°C presentaron valores significativamente mayores que los del control ($F = 7,57$, $p < 0,01$; $F = 8,99$, $p < 0,01$; $F = 20.96$, $p < 0,01$).

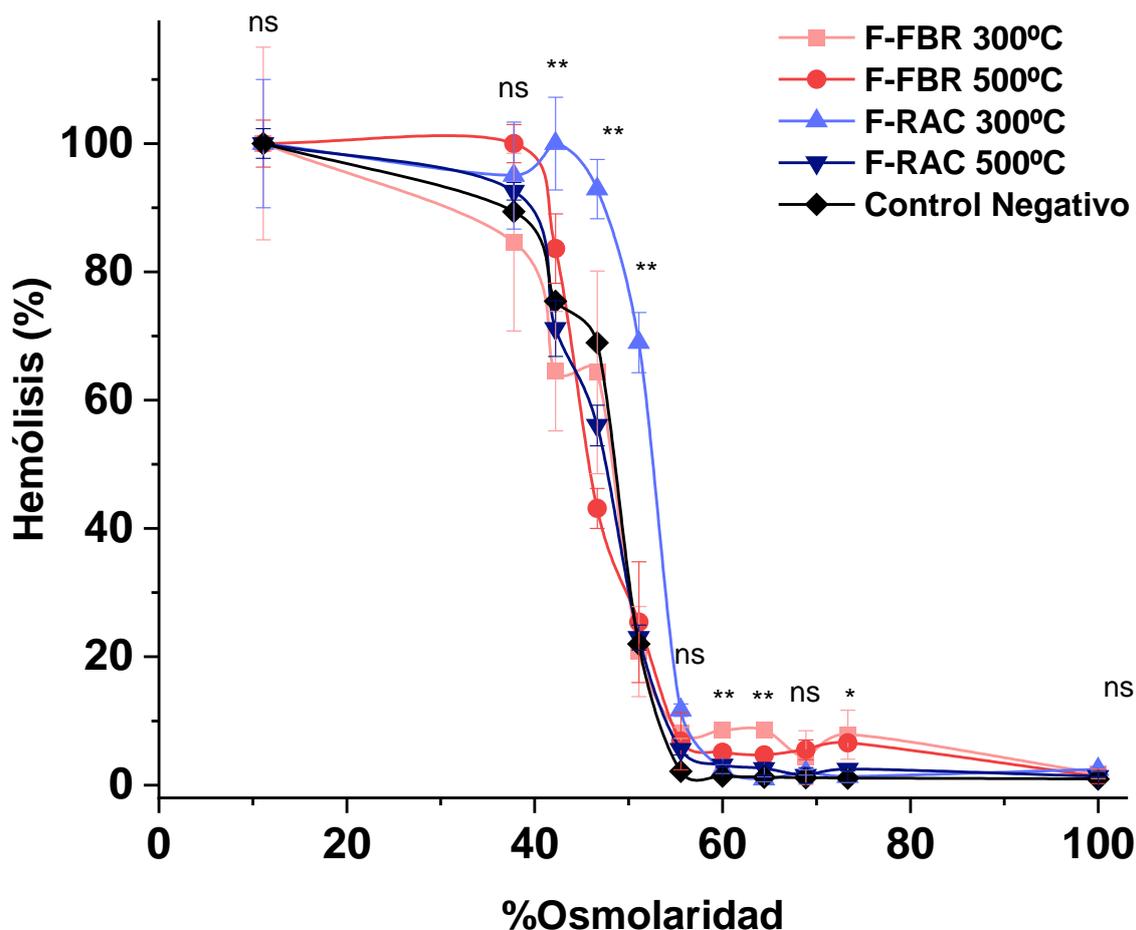


Figura 6.14 Fragilidad osmótica expresada en porcentaje de hemólisis, inducida por un incremento de la osmolaridad de eritrocitos expuestos a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de frústulos de *H. coffeaeformis* calcinados a 300°C y 500°C y provenientes de cultivos en FBR y pileta *raceway*. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas (DMS, ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

6.4. Discusión.

Como se indicó en la introducción de este capítulo, las características de los frústulos, como la morfología, composición elemental, presencia de grupos funcionales, área superficial BET, tamaño y carga eléctrica son importantes al momento de evaluar su potencial aplicación. Por otro lado, estas propiedades varían con la especie, tratamiento de limpieza utilizado, condiciones de cultivo, fases de crecimiento, entre otras. En el presente estudio, un método de oxidación con peróxido de hidrógeno a 80°C durante 12 horas fue completado con un tratamiento térmico. En particular, el TGA fue una herramienta útil para definir las temperaturas que producen las mayores pérdidas de masa en los frústulos

de *H. coffeaeformis* y los tratamientos térmicos a utilizar. Los puntos de mayor pérdida de peso fueron a 60°C, 300°C y 500°C; mientras que a partir de 800°C la pérdida de masa registró valores muy bajos, por lo que se consideró que en estos valores la eliminación de agua y oxidación de otros compuestos fue despreciable. Los frústulos de otras diatomeas como *Craspedostauros* sp. (Soleimani *et al.* 2020) y *Pinnularia* sp. (Van Eynde *et al.* 2014) mostraron comportamientos similares frente a tratamientos térmicos, sugiriendo que los componentes de la pared celular de las diatomeas responderían de una manera similar al efecto de la temperatura. De acuerdo con datos de la literatura, la pérdida de peso observada hasta los 200°C puede asociarse con la eliminación de agua adsorbida en el frústulo (Belmabkhout *et al.* 2010), mientras que la fuerte disminución de peso registrada entre 200°C y 550 °C, correspondería a la pérdida de biomoléculas como lípidos, proteínas y silanoles, presentes en la pared celular (Kadam *et al.* 2013; Bedoshvili *et al.* 2007).

Con respecto a la composición de la pared celular de las diatomeas, el C, O y Si son los elementos más abundantes (Jiang *et al.* 2013, Leone *et al.* 2019, Xu *et al.* 2021) y su detección varía con la metodología utilizada para su determinación. En este estudio, el análisis con XPS mostró que los tratamientos térmicos generaron una reducción en el porcentaje superficial de C hasta temperaturas de 500°C para los F-FBR y F-RAC, mientras que los porcentajes superficiales de Si y O aumentaron hasta los 500°C. Esto podría deberse a que el tratamiento de oxidación elegido con peróxido de hidrógeno no fue suficiente para oxidar la totalidad del C que se encontraba en la superficie del frústulo, y que el tratamiento térmico fue un complemento importante para su reducción. A su vez, los F-RAC presentaron porcentajes de P y Ca superiores a los de los F-FBR. Estos iones presentes en los frústulos obtenidos en cultivos a cielo abierto, pueden relacionarse con el gran aumento de salinidad que sufrió el cultivo como consecuencia de la temperatura y la evaporación (ver Capítulo 4 de esta Tesis). Los frústulos de diatomeas tienen la capacidad de adsorber iones y han sido propuestos para captar Ar^{3+} , Hg^{3+} y Cd^{2+} (Yu *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2015; Li *et al.* 2023). Así un aumento de iones Ca y P en el agua podrían haber sido adsorbidos por los frústulos de *H. coffeaeformis*. Los resultados de composición elemental obtenidos con EDS mostraron una tendencia similar que los obtenidos

con XPS, pero con una magnitud inferior, observándose una menor reducción en el C y un menor aumento en el porcentaje de Si y O. El análisis con EDS muestra una penetración en la muestra entre 900 nm y 1700 nm, mientras que el análisis con XPS es más superficial, con una penetración de hasta 3 nm, (Briggs & Grant 2003, García *et al.* 2019; Georget *et al.* 2021). Así, la disminución de C observada en los frústulos de *H. coffeaeformis* es principalmente superficial. Es interesante resaltar, que la disminución de C y el aumento de Si coinciden con los valores de mayor pérdida de peso mostradas por el TGA. Esto se relaciona con que el esqueleto de sílice del frústulo está recubierto por sustancias orgánicas de la célula viva, aún después de los tratamientos de oxidación, por lo que es adecuado aplicar un tratamiento más agresivo al material si se desea obtener una mejor limpieza del mismo (Kadam *et al.* 2013; Bedoshvili *et al.* 2007).

Los grupos funcionales típicos de las paredes celulares de las diatomeas comprenden: silanol (Si-O), siloxano (Si-O-Si), hidroxilo (O-H) (generalmente asociados a grupos Si-OH), alcanos (C-H) y carbonilos (C=O) (Golubeva *et al.* 2023). El análisis de los frústulos de *H. coffeaeformis* indicó la presencia de grupos funcionales típicos de diatomeas como grupos Si-OH, O-H, Si-O y Si-O-Si, relacionados principalmente con la estructura silíceo del frústulo, compuesta por óxidos de silicio, y grupos C=O y C-H relacionados con moléculas orgánicas. La presencia de grupos silanol en la superficie podría permitir la funcionalización con medicamentos, agentes de imagen y de blanco en la superficie del material, como sucede en las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNPs) (Mohanam *et al.* 2023). Otras diatomeas, como *Pinnularia* sp. (Van Eynde *et al.* 2014) y *Halamphora* cf. *salinicola* (Golubeva *et al.* 2023), mostraron espectros similares con la presencia de los mismos grupos funcionales. Además, *Halamphora coffeaeformis* mostró la misma tendencia de disminución de intensidad en grupos C-H, C=O y Si-OH con un aumento de temperatura que *Pinnularia* sp. (Van Eynde *et al.* 2014), por lo que este efecto podría darse en las diatomeas en general. En el tratamiento a 60 °C pudo observarse una mayor intensidad de grupos C-H y C=O, en comparación con los tratamientos de mayor temperatura. Por su parte, la disminución en intensidad de los grupos C=O y C-H observada en los F- FBR y F-RAC coincide con la disminución de C, lo que indica que mayores temperaturas generan una oxidación de enlaces C-H y C=O, y en

consecuencia una disminución de moléculas orgánicas. De la misma manera, la disminución de los enlaces Si-OH puede explicarse por el aumento de temperatura (Potapov, & Zhuravlev 2005)

El área superficial BET de las paredes celulares de las diatomeas es una medida de su superficie total, incluyendo sus cavidades, en relación a su peso (Walton *et al.* 2007). Los valores son específicos para cada especie, pero también pueden diferir con el tratamiento de limpieza usado (Van Eynde *et al.* 2014; Jain *et al.* 2022; Saad *et al.* 2020). En el presente trabajo, los frústulos de *H. coffeaeformis*, independientemente del origen, alcanzaron sus máximos valores de área superficial BET a 300°C, siendo 27 m² g⁻¹ para los F-FBR y 68,6 m² g⁻¹ para los F-RAC. Esta información coincide con el punto de mayor pérdida de peso a 300°C, en relación con la disminución de carbono. Además, el área superficial BET puede verse reducida por altas temperaturas debido a una reducción de su porosidad causada por transformaciones en la estructura del material (Galarneau *et al.* 2001; Naderi 2015, Liao *et al.* 2018). Como se ha mencionado, el área superficial BET varía con las especies, por ejemplo, los frústulos de *Denticula sp.* (tratados con HCl, H₂O₂, estufa o plasma), presentaron valores entre 16,5 m² g⁻¹ y 25,9 m² g⁻¹ (Jain *et al.* 2022), inferiores a los F-RAC a 60°C, 300°C y 500°C, pero similares a los obtenidos en los F-FBR. Los frústulos de *Pinnularia sp.* (tratados con SDS/EDTA, H₂O₂, HNO₃, secado o autoclavado) presentaron un amplio rango de valores de área superficial BET, entre 8 m² g⁻¹ y 160 m² g⁻¹, dependiendo del tratamiento de limpieza utilizado (Van Eynde *et al.* 2014). Por otro lado, especies de diatomeas tratadas con métodos de oxidación más agresivos, como *Stephanodiscus hantzschii* (Li *et al.* 2020), *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira weissflogii*, *Thalassiosira sp.* (Gannavarapu *et al.* 2019), *Cyclotella cryptica* (Wang *et al.* 2019), *Amphora sp.* (Rajendran *et al.* 2019) y *Chaetoceros sp.* (Saadatalab *et al.* 2023) presentaron valores de área superficial BET superiores a los frústulos de *H. coffeaeformis*. Si bien el área superficial BET es específico para cada especie, los métodos de limpieza utilizados en estos estudios fueron más agresivos y peligrosos para el medioambiente que los aplicados en el presente estudio. Algunos ejemplos de estos tratamientos incluyeron, el método piraña (una mezcla de ácido sulfúrico [H₂SO₄], y peróxido de hidrógeno [H₂O₂]), el método con ácido sulfúrico y el

método con HCl. Estos métodos utilizan sustancias altamente contaminantes (Sipila *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2018) que además necesitan tratamientos posteriores prolongados y pueden dañar el frústulo. Cuando se busca desarrollar procesos productivos amigables con el medio ambiente es necesario utilizar métodos eficientes y de bajo impacto ambiental (Yin *et al.* 2020).

Tener conocimiento de la carga superficial de un material es importante por dos razones. En primer lugar, el valor del potencial zeta indica la estabilidad de una suspensión (Golubeva *et al.* 2023). Los sistemas estables y no agregativos se caracterizan por valores absolutos del potencial zeta mayores a ± 25 mV (Pryshchepa *et al.* 2020). Si las partículas tienen potenciales zeta más pequeños, es necesario agregar surfactantes para proporcionar más repulsiones electrostáticas (Gumustas *et al.* 2017). En segundo lugar, el potencial zeta determina las propiedades de adsorción de un material. Por ejemplo, una superficie cargada negativamente tendrá una mayor afinidad por compuestos catiónicos (Golubeva *et al.* 2023). En general, los F-FBR y F-RAC presentaron valores de electronegatividad relativamente elevados, siendo el potencial zeta de los F-FBR (-30mV) significativamente mayor que los F-RAC, el cual sólo superó -25mV a 800°C. Bajo otras temperaturas los valores fueron cercanos a -25mV. Esto indica una mayor estabilidad para los F-FBR. Estos valores de potencial z vuelven a los frústulos útiles para adsorber moléculas con carga positiva (Manciu *et al.* 2017; Golubeva *et al.* 2023). Los valores de potencial zeta obtenidos para *H. coffeaeformis* se asemejan a valores encontrados en la bibliografía para frústulos de otras diatomeas como *Melosira nummuloides* (Lee *et al.* 2020), *Cocconeopsis orthoneoides*, *Navicula avium*, *Navicula* sp., *Pleurosigma indicum* (Wang *et al.* 2021) y *Halamphora cf. salinicola* (Golubeva *et al.* 2023). También se puede mencionar frústulos de *Halamphora subturgida* modificados en nanodendrítas metálicas (Bose *et al.* 2020) e incluso sílice amorfa para fines biomédicos (Hempt *et al.* 2020). Cabe destacar que el potencial zeta no depende solamente de las propiedades del material, y puede manipularse mediante cambios de pH y fuerza iónica de la solución, modificando las propiedades de sorción del material (Golubeva *et al.* 2023). En cuanto al DH, F-FBR 300°C fue el más pequeño y homogéneo. Por otro lado, dentro de los F-FBR, el DH mostró una tendencia a aumentar a mayores temperaturas (de 398,4

nm a 483,3 nm) y, dentro de F- RAC, el DH mostró una tendencia a disminuir (504,3 nm a 412,9 nm). Adicionalmente, el IPD indica que los tratamientos son moderadamente monodispersos ($0,1 < IPD \leq 0,5$), por lo que el material en todos los tratamientos es relativamente homogéneo (Bhattacharjee 2016).

Las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSNP's) artificiales, se utilizan en sistemas de entrega controlada y dirigida de drogas (Bharti *et al.* 2015), debido a su baja toxicidad y alta capacidad de carga de medicamentos. Gracias al fuerte enlace Si-O, las MSNP's son más estables a la degradación y estrés mecánico en comparación con otros transportadores de fármacos (Bharti *et al.* 2015). Los grupos silanol facilitan la funcionalización de la superficie para controlar la carga y liberación de medicamentos (Mohanani *et al.* 2023). La principal desventaja de las MSNP's se atribuye a la densidad superficial de grupos silanol que podría interactuar con la superficie de los fosfolípidos de las membranas de los glóbulos rojos generando hemólisis (Bharti *et al.* 2015), aunque esta desventaja se ve reducida al unir silanoles con medicamentos (Mohanani *et al.* 2023). El diámetro hidrodinámico obtenido como resultado de someter los frústulos de *H. coffeaeformis* a un tratamiento ultrasónico, mostró valores entre 400 nm y 500 nm aproximadamente, pudiendo ser considerados nanopartículas después de este proceso (Kohane 2006). De esta forma podríamos obtener nanopartículas de sílice biogénico, lo que podría significar una ventaja sobre la fabricación de MSNP's de origen sintético (Delasoie & Zobi, 2019).

La biocompatibilidad y el uso seguro de nuevos materiales en el campo biomédico, son temas cruciales en la ciencia de biomateriales (Cohn *et al.* 2017). Las pruebas de determinación de hemoglobina libre media y fragilidad osmótica son importantes para evaluar la biocompatibilidad sanguínea sobre los glóbulos rojos (Cavalu *et al.* 2018). Los resultados de hemoglobina libre media obtenidos de F-FBR 300°C y F-RAC 300°C no evidenciaron un efecto hemolítico en la concentración evaluada. El ensayo de fragilidad osmótica brinda información acerca de la integridad de la membrana plasmática. De acuerdo con los resultados obtenidos, ninguno de los frústulos produjo diferencias significativas respecto al control a excepción de F-RAC 300°C, donde se observa un leve corrimiento de la curva, atribuible a su forma de obtención y al tratamiento térmico.

6.5. Conclusión

El estudio detallado de los frústulos de *H. coffeaeformis* revela su potencial utilidad en el campo biomédico en diversas aplicaciones. La aplicación de tratamientos de oxidación y calcinación a diferentes temperaturas demostró cambios significativos en la composición y propiedades superficiales de los frústulos. La persistencia de carbono en la superficie, incluso después de tratamientos agresivos, sugiere la presencia de sustancias orgánicas adheridas al esqueleto de sílice y destaca la importancia de métodos más intensivos si se requiere una limpieza más efectiva. Además, el potencial zeta mostró valores prometedores, especialmente para los frústulos obtenidos del cultivo en fotobiorreactor, generando suspensiones estables y no agregativas. La evaluación de la interacción de los frústulos con la sangre revela una baja alteración, respaldando su biocompatibilidad. Sin embargo, se observa que ciertas calcinaciones afectan la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos, lo que resalta la importancia de considerar las condiciones de tratamiento para evitar posibles efectos adversos. En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial de los frústulos de *H. coffeaeformis* en aplicaciones biomédicas, pero señalan la necesidad de investigaciones adicionales para comprender y optimizar los procesos que permitan una adecuada aplicabilidad.

Capítulo 7 - Síntesis y conclusiones generales

Las microalgas han ganado notable atención a nivel industrial debido que a través de ellas es posible obtener diversos productos como proteínas, lípidos pigmentos y sustancias antioxidantes, entre otros, que dan lugar a su uso potencial en diversas aplicaciones. En el sector energético las microalgas se presentan como una alternativa factible a los combustibles fósiles, ya que a través de ellas es posible la producción de distintos biocombustibles, dentro de ellos el biodiésel. En la actualidad, el 82,3% de la demanda energética mundial se satisface mediante el consumo de combustibles fósiles, por lo que es necesario encontrar alternativas que ayuden a reducir su consumo a valores sostenibles. En este contexto, la investigación desarrollada en el marco de esta tesis se enfocó en evaluar el potencial uso de la diatomea *Halamphora coffeaeformis* como fuente de materia prima para la producción de aceites para biodiésel, teniendo en cuenta que la selección de cepas nativas tiene la ventaja de que estas especies están adaptadas a las condiciones locales, una característica importante para realizar cultivos masivos a cielo abierto.

En primer término, se determinaron, a escala de laboratorio, las condiciones óptimas y el rango de crecimiento a diferentes temperaturas y salinidades posiblemente encontradas en cultivos *outdoor*. También se evaluó el efecto de diferentes salinidades en la acumulación, cantidad y calidad de lípidos, y se puso a prueba un medio de cultivo basado en agua de mar y biofertilizante carente de silicio (Si), con diferentes concentraciones de silicatos, siendo el Si un nutriente esencial para el cultivo de diatomeas. Este medio de cultivo se propuso como una alternativa económica a los medios convencionales de laboratorio y se denominó “medio BAY”. Los resultados obtenidos permitieron determinar que las épocas del año propicias para el cultivo a cielo abierto de *H. coffeaeformis* en la localidad de Bahía Blanca (38° 45' S, 62° 22' O) son los meses de primavera y verano. Además, para optimizar el crecimiento lo más adecuado es utilizar una temperatura de 20°C, una salinidad de 20 ‰ y una relación Si:N de 0,5. Por otro lado, si lo que se busca es optimizar la acumulación de triglicéridos (TAG),

conviene que la diatomea crezca a una salinidad de 33 ‰ y a una relación Si:N de 0,125. Esta información sirvió como base para llevar a cabo la siguiente etapa de esta tesis, definiendo las condiciones óptimas para la generación de inóculo de rápido crecimiento, y condiciones adecuadas para maximizar la acumulación de TAG en piletas a cielo abierto.

En segundo término, se evaluó el comportamiento de las variables climáticas, fisicoquímicas y biológicas en cultivos *batch* a cielo abierto de *Halamphora coffeaeformis* utilizando medio BAY. Los resultados obtenidos demuestran que la producción de inóculos puede ser optimizada mediante el uso de fotobioreactores con una temperatura de 20°C, una salinidad de 20‰ y un medio de cultivo con una relación Si:N de 0,5. Bajo estas condiciones, se logró un rápido crecimiento y en cuatro días la especie llegó a una fase de crecimiento estacionaria, obteniendo inóculos fisiológicamente activos y adecuados para iniciar un escalamiento. Por otro lado, los cultivos en piletas *raceway* a cielo abierto se realizaron con agua de mar, con una salinidad inicial de 33 ‰, y una relación Si:N de 0,125 para maximizar la acumulación de TAG. Los resultados obtenidos muestran que, bajo estas condiciones, la salinidad fue el principal factor de estrés que estimuló la acumulación de TAG. Salinidades superiores a 45‰ mostraron un aumento significativo de la señal de RN, fluorocromo utilizado para la detección de TAG, y salinidades inferiores no generaron el estrés suficiente, retrasando el inicio de la acumulación lipídica. En ese sentido, precipitaciones por encima de los 40 mm relajaron el efecto estresante de la salinidad y deben tenerse en cuenta en los cultivos a cielo abierto para anticipar fluctuaciones en el rendimiento lipídico. Adicionalmente, la salinidad tiene un efecto inverso sobre la disolución de los silicatos y fosfatos, generando un alivio del estrés nutricional y un retraso en la acumulación de TAG en la especie estudiada.

La estimación de las propiedades del biodiésel a partir del perfil de ácidos grasos de la especie, indicó que un biodiésel producido por estos aceites presentaría características que cumplen con los estándares establecidos por Europa (EN 14214) y los EE. UU. (ASTMD 6751–08). Este biodiésel mostraría mejor factor

de saturación de cadenas largas y punto de obstrucción del filtro en frío que el biodiésel producido a partir del aceite de soja. Además, la productividad lipídica del cultivo de *H. coffeaeformis* mostró ser al menos un 30% superior al cultivo de soja.

El análisis ultraestructural en diferentes fases de crecimiento permitió observar el tiempo y los sitios de acumulación de TAG en la especie, como son las gotas lipídicas citoplasmáticas (GL) y los plastoglobulos (Pg) ubicados en el cloroplasto. Además, en base al tamaño y cantidad de GL y el estado general de las células se pudo confirmar que la fase de crecimiento estacionaria tardía es el período más adecuado para la cosecha de biomasa rica en TAG en cultivos bioenergéticos de *H. coffeaeformis*. El estudio de la ultraestructura de esta especie no solo ha aportado conocimientos fundamentales sobre su biología celular, sino que también ha proporcionado directrices prácticas para la optimización de cultivos bioenergéticos. El MCF fue el equipo más sensible a la hora de hacer un seguimiento de la acumulación de TAG en células teñidas con RN; sin embargo, para definir el período más productivo, esta información debe ir acompañada por un análisis fluorimétrico de la cinética de la intensidad de fluorescencia del RN. La identificación de las fases críticas para la acumulación de TAG es esencial para maximizar la eficiencia y el rendimiento de la producción de biodiésel a partir de microalgas.

Una estrategia que permite aumentar la rentabilidad de la producción de biocombustibles, es la de realizarla dentro de un esquema de biorrefinería. Para ello es necesario obtener al menos un co-producto que de valor agregado al proceso. En ese sentido, los resultados de este estudio posicionan al frústulo de *H. coffeaeformis* como un candidato importante para su uso en aplicaciones biomédicas. Bajo ciertas condiciones demostró tener una buena biocompatibilidad, la capacidad de generar suspensiones estables y no agregativas. Esta estabilidad es crucial para su uso en aplicaciones biomédicas, como la administración de medicamentos, donde la dispersión uniforme es esencial para la eficacia del tratamiento. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para comprender plenamente los procesos y

optimizar las condiciones que permitan su aplicación efectiva y segura. La integración de los conocimientos obtenidos en esta tesis con futuras investigaciones podría abrir nuevas oportunidades para el uso de frústulos de microalgas en la biomedicina, contribuyendo así al desarrollo de tecnologías más avanzadas y sostenibles.

La presente tesis aporta información valiosa para promover emprendimientos de base científico-tecnológica o *spin-off* en nuestro país. La producción de biodiésel, a diferencia de los combustibles de origen fósil, se puede realizar de un modo más descentralizado, lo cual permite un desarrollo de diversas instalaciones regionales de pequeña escala, capaces de complementar el mercado energético local. Por ejemplo, la zona interna del estuario de Bahía Blanca se caracteriza por extensas planicies de marea, no aptas para la agricultura y con potencialidad para el desarrollo de biorrefinerías microalgales (Fig. 7.1); es de fácil acceso; provee el agua salobre necesaria para el sostenimiento de los cultivos y presenta una zona portuaria que ofrece servicios ágiles, flexibles y adaptables a los requerimientos y cambios tecnológicos que exigen las economías internacionales. Aun cuando numerosos retos científico-tecnológicos e institucionales deben resolverse para obtener biodiésel a partir de microalgas a un precio competitivo, la inminente crisis energética sigue motivando el desarrollo de estas investigaciones a nivel mundial con el fin de lograr una tecnología económicamente viable y amigable con el ambiente.

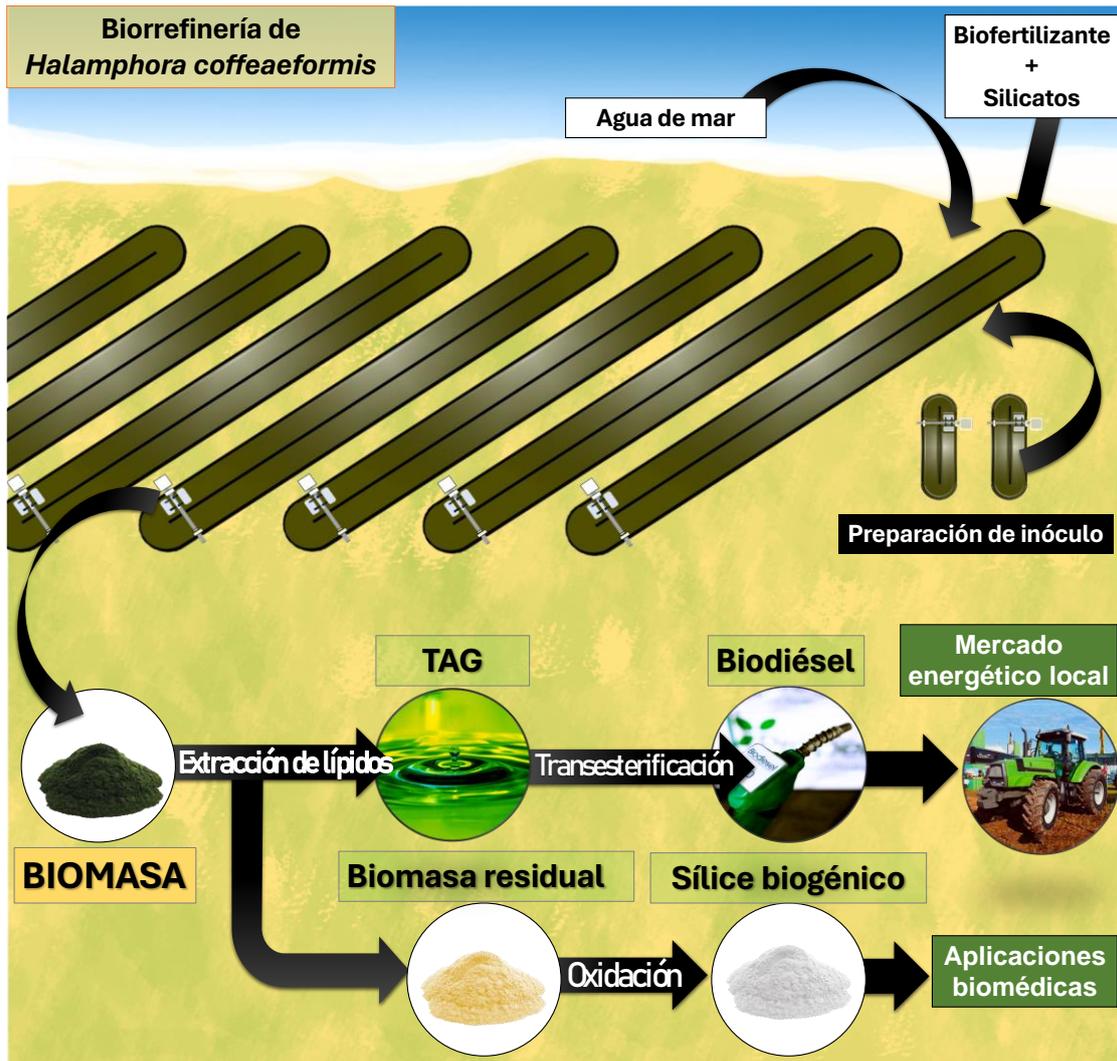


Figura 7.1. Esquema de biorrefinería de *H. coffeaeformis*.

Referencias

- Aboal M, Marco S, Chaves E, Mulero I, García-Ayala A. (2012). Ultrastructure and function of stalks of the diatom *Didymosphenia geminata*. *Hydrobiologia*, 695(1): 17–24. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1193-y>
- Abomohra AEF, Jin W, Tu R, Han SF, Eid M, Eladel H. (2016). Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 596–606. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.05>.
- Ación Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., & Molina Grima, E. (2019). *Costs analysis of microalgae production. Biofuels from Algae*, 551–566. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00021-4>.
- Adl MS, Simpson AGB., Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G., Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor FJR. (2005). The new classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5): 399–451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>
- Alaswad, A., Dassisti, M., Prescott, T., & Olabi, A. G. (2015). *Technologies and developments of third generation biofuel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 1446–1460. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.058>.
- Alonso-Geli Y, Alonso-Moreno Y, Falcón-Diéguéz JE, Lucambio-Miró L, Castro-Piñol M. (2015) Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica. *Revista Cubana de Química*, 27: 110–118.
- Ambaye, T. G., Vaccari, M., Bonilla-Petriciolet, A., Prasad, S., van Hullebusch, E. D., & Rtimi, S. (2021). *Emerging technologies for biofuel production: A*

critical review on recent progress, challenges and perspectives. *Journal of Environmental Management*, 290, 112627.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112627>.

Amoda A, Borkiewicz L, Rivero-Müller A, Alam P (2020). Sintered nanoporous biosilica diatom frustules as high efficiency cell-growth and bone-mineralisation platforms. *Materials Today Communications*, 24: 100923.
<https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.100923>.

Andeden, EE, Ozturk S, Aslim, B. (2021). Evaluation of Thirty Microalgal Isolates as Biodiesel Feedstocks Based on Lipid Productivity and Triacylglycerol (TAG) Content. *Current Microbiology*, 78(2), 775–788.
<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02340-5>.

Anonymous. (1975). Proposals for a standardization of diatom terminology and diagnoses. *Nova Hedwigia (Beih.)*, 53: 323-354.

Artamonova, E. Y., Svenning, J. B., Vasskog, T., Hansen, E., & Eilertsen, H. C. (2017). Analysis of phospholipids and neutral lipids in three common northern cold water diatoms: *Coscinodiscus concinnus*, *Porosira glacialis*, and *Chaetoceros socialis*, by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Applied Phycology*, 29(3): 1241–1249. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1055-0>.

Awosusi AA, Mata MN, Ahmed Z, Coelho MF, Altuntaş M, Martins JM, Martins JN, Onifade ST. (2022). How Do Renewable Energy, Economic Growth and Natural Resources Rent Affect Environmental Sustainability in a Globalized Economy? Evidence From Colombia Based on the Gradual Shift Causality Approach. *Frontiers in Energy Research*, 9: 739721.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.739721>.

Aziz MMA, Kassim KA, Shokravi Z, Jakarni FM, Liu HY, Zaini N, Tan LS, Saiful Islam AMB, Shokravi H. (2020) Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119: 109621,
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621>.

- Baek SH, Shimode S, Kim H, Han MS, Kikuchi T. (2009). Strong bottom–up effects on phytoplankton community caused by a rainfall during spring and summer in Sagami Bay, Japan. *Journal of Marine Systems.*, 75: 253–264, <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2008.10.005>.
- Bagchi SK, Patnaik R, Sonkar S, Koley S, Rao PS, Mallick N. (2019). Qualitative biodiesel production from a locally isolated chlorophycean microalga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing GA 45 under closed raceway pond cultivation. *Renewable Energy*, 139: 976–987, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.02.115>.
- Balamurugan S, Wang X, Wang HL, An CJ, Li H, Li DW, Yang WD, Liu JS, Li HY. (2017). Occurrence of plastidial triacylglycerol synthesis and the potential regulatory role of AGPAT in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnology for Biofuels* 10: 97. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0786-0>.
- Baldisserotto C, Giovanardi M, Ferroni L, Pancaldi S.. (2013). Growth, morphology and photosynthetic responses of *Neochloris oleoabundans* during cultivation in a mixotrophic brackish medium and subsequent starvation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(2): 461–472. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1426-3>.
- Baldisserotto C; Popovich C; Giovanardi M; Sabia A; Ferroni L; Constenla D; Leonardi P; Pancaldi S. 2016. Photosynthetic aspects and lipid profiles in the mixotrophic alga *Neochloris oleoabundans* as useful parameters for biodiesel production. *Algal Research*, 16:255-265. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.022>.
- Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo J, Robledo CW (2008) Infostat: Manual del Usuario. Córdoba, Argentina
- Bandara TMWJ, Furlani M, Albinsson I, Wulff A, Mellander BE. (2020). Diatom frustules enhancing the efficiency of gel polymer electrolyte based dye-sensitized solar cells with multilayer photoelectrodes. *Nanoscale Advances*, 2(1): 199–209. <https://doi.org/10.1039/c9na00679f>.

- Barnech Bielsa BG; Popovich* CA; Rodríguez MC; Martínez AM; Martín L; Matulewicz MC; Leonardi, PI. (2016). Simultaneous production assessment of triacylglycerols for biodiesel and exopolysaccharides as valuable co-products in *Navicula cincta*. *Algal Research*, 15:120-128. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.013>.
- Bartley ML, Boeing WJ, Corcoran AA, Holguin FO, Schaub T. (2013). Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalga *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Biomass Bioenergy* 54: 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.03.026>.
- Bayu A, Rachman A, Noerdjito DR, Putra MR Widayatno WB. (2020). High-value chemicals from marine diatoms: a biorefinery approach. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 460: 012012. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/460/1/012012>.
- Beal CM, Gerber LN, Sills DL, Huntley ME, Machesky SC, Walsh MJ, Tester JW, Archibald I, Granados J, Greene CH. (2015). Algal biofuel production for fuels and feed in a 100-ha facility: A comprehensive techno-economic analysis and life cycle assessment. *Algal Research*, 10, 266–279. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.017>.
- Bedoshvili ED, Likhoshway YV Grachev MA. (2007) Ultrastructure of diatom *Synedra acus subsp. radians* as revealed by transmission electron microscopy after mild silica dissolution. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 34: 303–306. <https://doi.org/10.1134/S1062359007030144>.
- Bedoshvili YD, Podunay Y, Nikonova A, Marchenkov A, Bairamova E, Davidovich N, Likhoshway Y. (2021). Lipid and Fatty Acids Accumulation Features of *Entomoneis cf. paludosa* during Exponential and Stationary Growth Phases in Laboratory Culture. *Diversity*, 13(10): 459. <https://doi.org/10.3390/d13100459>.

- Bedoshvili YD, Popkova TP, Likhoshway YV. (2009). Chloroplast structure of diatoms of different classes. *Cell and Tissue Biology*, 3(3): 297–310. <https://doi.org/10.1134/s1990519x09030122>.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. (2006). *Ecology: from individuals to ecosystems*. Blackwell Publications, Oxford.
- Beller M, Thiel K, Thul PJ, Jäckle H. (2010). Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus. *FEBS Letters*, 584(11): 2176–2182. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.022>.
- Bellorín-Romero A, Bulboa-Contador C, Contreras-Porcía L. (2022) *Algas: Una Introducción a la Ficología.*; RIL (Eds).
- Ben-Amotz, A. (2004). Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: *Dunaliella*. En *Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, A Richmond (ed), 273–280.
- Benson ES, Swallen T. (1964). Erythrocyte Osmotic Fragility Test. *Postgraduate Medical Journal*, 36(5), A-46-A-54. <https://doi.org/10.1080/00325481.1964.11695344>.
- Bharti C, Nagaich U, Pal AK, Gulati N. (2015) Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 5(3): 124-33. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.160844>.
- Bhattacharjee S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235: 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- Bhattacharya, M., & Goswami, S. (2020). Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25: 101580. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101580>

- Bonechi C, Consumi M, Donati A, Leone G, Magnani A, Tamasi G, Rossi C. (2017). Biomass: An overview en Dalena F, Basile A, Rossi C (Eds) Bioenergy Systems for the Future, 3–42. Woodhead Publishing <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101031-0.00001-6>.
- Bongiovani N, Popovich CA, Martínez AM, Freije H, Constenla D, Leonardi PI. (2013). *In vivo* measurements to estimate culture status and neutral lipid accumulation in *Nannochloropsis oculata* CCALA 978: implications for biodiesel oil studies, *Algological Studies*, 142: 3–16, <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2013/0104>.
- Bongiovani N, Popovich, CA., Martínez AM, Constenla D, Leonardi PI. (2019). Biorefinery approach from *Nannochloropsis oceanica* ccala 978: neutral lipid and carotenoid co-production under nitrate or phosphate Deprivation. *Bioenergy Research*, 13, 518–529. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10045-2>.
- Borowitzka MA, Vonshak A. (2017). Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *European Journal of Phycology*, 52(4), 407–418. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>.
- Borowitzka MA. (2013). Species and strain selection. En: Borowitzka MA, Moheimani NR (Eds) Algae for biofuels and energy. Springer, Dordrecht, pp 77–89 21
- Borowitzka MA. (2016). Algal physiology and large-scale outdoor cultures of microalgae. En: M. B, J. B, J. R (Eds) The physiology of microalgae. Developments in applied phycology, vol 6. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_23.
- Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R. (2013). Open Pond Culture Systems. En: Borowitzka, M., Moheimani, N. (Eds) Algae for Biofuels and Energy. Developments in Applied Phycology, vol 5. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_8.
- Bose R, Roychoudhury P, Pal R. (2021). In-situ green synthesis of fluorescent silica–silver conjugate nanodendrites using nanoporous frustules of

- diatoms: an unprecedented approach. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(6): 1263–1273. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02536-4>.
- BP (2021) BP statistical review of world energy, 71th edn. BP, London, pp 1–60. <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2022-full-report.pdf>. Consultado el 23 de junio de 2023
- Bréhélin C, Kessler F. (2008). The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks†. *Photochemistry and Photobiology*, 84(6): 1388–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00459.x>.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.
- Briggs D, Grant JT. (2003). Surface analysis by Auger and x-ray photoelectron spectroscopy. Briggs D, Grant JT (eds). IMPublications, 900 pp., ISBN 1-901019-04-7
- Brzezinski MA. (1985). The Si: C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. *Journal of Phycology*, 21: 347-357
- Bussard A, Corre E, Hubas C, Duvernois-Berthet E, Le Corguillé G, Jourden L, Culpier F, Claquin P, Lopez PJ. (2016). Physiological adjustments and transcriptome reprogramming are involved in the acclimation to salinity gradients in diatoms. *Environmental Microbiology*, 19(3): 909–925. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13398>.
- Caballero MA, Jallet D, Shi LB, Rithner C, Zhang Y, Peers G (2016). Quantification of chrysolaminarin from the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 20: 180–188.

- Cai T, Park SY, Li Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19: 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.03>.
- Cameron NG. (2013). Diatoms. En Elias SA, Mock CJ (Eds), *Encyclopedia of Quaternary Science*, 522–525. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53643-3.00359-9>.
- Casanova LM, Mendes LBB, Corrêa TdS, da Silva RB, Joao RR, Macrae A, Vermelho AB. (2023). Development of Microalgae Biodiesel: Current Status and Perspectives. *Microorganisms* 11(1):34. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010034>.
- Cavalier-Smith, T. (1986). The kingdom Chromista: origin and systematics. En: Round FE, Chapman DJ (Eds), *Progress in phycological research*. Vol. 4: 309-347. Bristol: BIPRESS Ltd.
- Cavalu S, Antoniac IV, Fritea L, Mates IM, Milea C, Laslo V, Vicas S, Mohan A. (2018). Surface modifications of the titanium mesh for cranioplasty using selenium nanoparticles coating. *Journal of Adhesion Science and Technology* 32(22): 2509–2522. <https://doi.org/10.1080/01694243.2018.1490067>.
- CERZOS. Estación meteorológica (<https://meteobahia.com.ar> CERZOS-CONICET). Consultado 11 Mar 2022
- Chang JS., Show PL, Ling TC, Chen CY, Ho SH, Tan CH, Nagarajan D, Phong WN. (2017). Photobioreactors. En Larroche C, Sanromán MA, Du G, Pandey A (Eds), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 313–352. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00011-2>
- Chanquia, SN, Vernet G, Kara S. (2021) Photobioreactors for cultivation and synthesis: Specifications, challenges, and perspectives. *Engineering in Life Sciences*, 22; 712–724 <https://doi.org/10.1002/elsc.202100070>

- Chen B, Xiong R, Li H, Sun Q, Yang J. (2019). Pathways for Sustainable Energy Transition. *Journal of Cleaner Production* 228: 1564–1571 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.372>
- Chew KW, Yap JY, Show PL, Suan NH, Juan JC, Ling TC, Lee DJ, Chang JS. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229: 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>.
- Chhandama MVL, Satyan KB, Changmai B, Vanlalveni C, Rokhum SL. (2021). Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. *Bioresource Technology Reports*, 15: 100771. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100771>.
- Chisti Y. (2016). Large-Scale Production of Algal Biomass: Raceway Ponds. *Green Energy and Technology*, 21–40. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_2
- Choudhary S, Tripathi S, Poluri KM. (2022). Microalgal-Based Bioenergy: Strategies, Prospects, and Sustainability. *Energy & Fuels*, 36 (24): 14584-14612. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.2c02922>.
- Cohn MR, Unnanuntana A, Pannu TJ, Warner SJ, Lane JM. (2017). 7.16 Materials in Fracture Fixation. En Ducheyne P (Ed), *Comprehensive Biomaterials II*: 278–297. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.10109-2>.
- Correa DF, Beyer HL, Fargione JE, Hill JD, Possingham HP, Thomas-Hall SR, Schenka PM. (2019). Towards the implementation of sustainable biofuel production systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 107:250–263. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.005>.
- Cox EJ. (2014). Diatom identification in the face of changing species concepts and evidence of phenotypic plasticity. *Journal of Micropalaeontology*, 33(2): 111–120. <https://doi.org/10.1144/jmpaleo2014-014>

- Cruce JR, Beattie A, Chen P, Quiroz D, Somers M, Compton S, DeRose K, Beckstrom B, Quinn JC. (2021). Driving toward sustainable algal fuels: a harmonization of techno-economic and life cycle assessments. *Algal Research*, 54: 102169. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102169>.
- Cui M, Zhang W, Xie L, Chen L, Xu L. (2020). Chiral mesoporous silica materials: A review on synthetic strategies and applications. *Molecules*, 25(17): 3899. <https://doi.org/10.3390/molecules25173899>.
- Cyanotech (<https://www.cyanotech.com>)
- D' Ippolito G, Sardo A, Paris D., Vella F, Adelfi M, Botte P, Gallo C, Fontana A. (2015). Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1): 28. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0212-4>.
- Damiani C, Popovich CA, Constenla D, Leonardi PI. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 101: 3801-3807. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.136>.
- Damiani MC, Popovich CA, Constenla D, Martínez MA, Freije H, Doria E, Longoni P, Cella R, Nielsen E, Leonardi PI. (2014). Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in *Scenedesmus acutus* PVUW12. *Journal of Applied Phycology*, 26: 1423–1430. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0170-9>.
- Das P, Gundimeda H. (2022). Is biofuel expansion in developing countries reasonable? A review of empirical evidence of food and land use impacts. *Journal of cleaner production* 372: 133501 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133501>.
- Datta A, Marella TK, Tiwari A, Wani SP. (2019). The Diatoms: From Eutrophic Indicators to Mitigators. In Gupta, S.K., Bux, F. (Eds) *Application of Microalgae in Wastewater Treatment*, 19–40. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13913-1_2

- De Castro Araújo, S., & Garcia, V. M. T. (2005). Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture*, 246(1-4): 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.051>.
- De Sanctis S, Wenzler M, Kröger N, Malloni WM, Sumper M, Deutzmann R, Zadavec P, Brunner E, Kremer W, Kalbitzer HR. (2016). PSCD domains of pleuralin-1 from the diatom *Cylindrotheca fusiformis*: NMR structures and Interactions with other biosilica-associated proteins. *Structure*, 24(7), 1178–1191. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.04.021>.
- Delasoie J, Zobi F. (2019). Natural diatom biosilica as microshuttles in drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 11(10): 537. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100537>.
- Demirbas, A. 2009. Production of Biodiesel from Algae Oils. *Energy Sources*, 31,163–168. <https://doi.org/10.1080/15567030701521775>.
- Departamento de Energía de los Estados Unidos. 2024. Alternative Fuel Price Report, January 2024. Recuperado de https://afdc.energy.gov/files/u/publication/alternative_fuel_price_report_january_2024.pdf. Consultado el 20 de mayo de 2024.
- Dias Hornes da Rosa M, Alves CJ, dos Santos FN, de Souza AO, Zavareze EdR, Pinto E, Nosedá MD, Ramos D, de Pereira CMP. (2023). Macroalgae and microalgae biomass as feedstock for products applied to bioenergy and food industry: A brief review. *Energies*, 16(4): 1820. <https://doi.org/10.3390/en16041820>.
- Doan TTY, Sivaloganathan B, Obbard JP. (2011). Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 2534–2544. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.021>.
- Echenique-Subiabre I, Greene JM, Ryan A, Martinez H, Balleza M, Gerber J, Jebali A, Getto S, O'Kelly CJ, Mandal S, Quinn JC, Starkenburg SR, Corcoran AA, Shurin JB. (2023). Site-specific factors override local

climatic conditions in determining microalgae productivity in open raceway ponds. Algal Research 74: 103235.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103235>.

Eivazzadeh-Keihan R, Chenab KK, Taheri-Ledari R, Mosafer J, Hashemi SM, Mokhtarzadeh A, Maleki A, Hamblin MR. (2019). Recent advances in the application of mesoporous silica-based nanomaterials for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 107: 110267.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110267>.

Espinoza Pérez AT, Camargo M, Rincón PCN, Marchant MA. (2017). Key challenges and requirements for sustainable and industrialized biorefinery supply chain design and management: a bibliographic analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69: 350 –359
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.084>.

Farkas A, Pap B, Zsíros O, Patai R, Shetty P, Garab G, Bíró T, Ördög V, Maróti G. (2023). Salinity stress provokes diverse physiological responses of eukaryotic unicellular microalgae. *Algal Research*, 73: 103155.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103155>.

Fayyaz M, Chew KW, Show PL, Ling TC, Ng IS, Chang JS. (2020). Genetic engineering of microalgae for enhanced biorefinery capabilities. *Biotechnology Advances*, 107554.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107554>

Fernández-Linares L, Durán-Páramo E, Guerrero-Barajas C. (2019). A scale-up evaluation of a semicontinuous culture of *Scenedesmus* sp. in a raceway under greenhouse conditions using a commercial fertilizer as culture medium. *Biofuels*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/17597269.2019.1614256>

Flori S, Jouneau PH, Finazzi G, Maréchal E, Falconet D. (2016). Ultrastructure of the periplastidial compartment of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Protist*, 167(3): 254–267.
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.04.001>.

- Foteinis S, Chatzisyneon E, Litinas, A, Tsoutsos T. (2020). Used-cooking-oil biodiesel: Life cycle assessment and comparison with first- and third-generation biofuel. *Renewable Energy*, 153: 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.022>.
- Fridmann J, Wiedenhöver I, Gade A, Baby LT, Bazin D, Brown BA, Campbell CM, Cook JM, Cottle PD, Diffenderfer E, Dinca DC, Glasmacher T, Hansen PG, Kemper KM, Lecouey JL, Mueller WF, Olliver H, Rodriguez-Vieitez E, Terry JR, Tostevin JA, Yoneda K. (2005). “Magic” nucleus ^{42}Si . *Nature*, 435(7044): 922–924. <https://doi.org/10.1038/nature03619>.
- Fu W, Shu Y, Yi Z, Su Y, Pan Y, Zhang F, Brynjolfsson S. (2022). Diatom morphology and adaptation: Current progress and potentials for sustainable development. *Sustainable Horizons*, 2: 100015, <https://doi.org/10.1016/j.horiz.2022.100015>.
- Fusé CB, Villaverde ML, Padín SB, De Giusto M, Juárez MP. (2013). Evaluación de la actividad insecticida de tierras de diatomeas de yacimientos argentinos. Repositorio del Instituto Nacional de Tec. Agropecuaria (INTA) https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/591/RIA_2013_VOLUMEN%2039_N%C2%BA2_p.207-213.pdf. Último acceso: 08/02/2024
- Galarneau A, Cambon H, Di Renzo F, Fajula F. (2001). True microporosity and surface area of mesoporous SBA-15 silicas as a function of synthesis temperature. *Langmuir*, 17(26): 8328–8335. <https://doi.org/10.1021/la0105477>.
- Gallagher BJ. (2011). The economics of producing biodiesel from algae. *Renewable Energy*, 36(1), 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.06.016>.
- Ganguly P, Sarkhel R, Das P. (2021) The second- and third-generation biofuel technologies: comparative perspectives, en Dutta S, Hussain CM (EDS) Sustainable Fuel Technologies Handbook. Academic Press 29–50 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822989-7.00002-0>.

- Gannavarapu PK, Ganesh V, Thakkar M, Somenath M, Babu Dandamudi R. (2019). Nanostructured Diatom-ZrO₂ composite as a selective and highly sensitive enzyme free electrochemical sensor for detection of methyl parathion. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288: 611–617. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.036>
- Garcia R, Stevie FA, Giannuzzi L. (2019). FIB Sample Preparation for In Depth EDS Analysis. *Microscopy and Microanalysis*, 25(s2): 914–915. <https://doi.org/10.1017/S1431927619005300>.
- Gebremariam SN, Marchetti JM. (2018). Economics of biodiesel production: Review. *Energy Conversion and Management*, 168: 74–84. <https://doi.org/doi:10.1016/j.enconman.2018.05.002>.
- Georget F, Wilson W, Scrivener KL. (2021). edxia: Microstructure characterisation from quantified SEM-EDS hypermaps. *Cement and Concrete Research*, 141: 106327. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2020.106327>
- Ghobara MM, Mohamed, A. (2019). Diatomite in Use: Nature, Modifications, Commercial Applications and Prospective Trends. En [Seckbach J](#), [Gordon R](#) (Eds) *Diatoms: Fundamentals and Applications*, 471–509. <https://doi.org/10.1002/9781119370741.ch19>.
- Gifuni I, Pollio A, Safi C, Marzocchella A, Olivieri G. (2018). *Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery. Trends in Biotechnology*, 37: 242-252. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.09.006>.
- Gilbert F, Hulth S, Grossi V, Aller RC. (2016) Redox oscillation and benthic nitrogen mineralization within burrowed sediments: an experimental simulation at low frequency. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 482: 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.05.003>.
- Giovanardi M, Ferroni L, Baldisserotto C, Tedeschi P, Maietti A, Pantaleoni L, Pancaldi S. (2013). Morphophysiological analyses of *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyta) grown mixotrophically in a carbon-rich waste

- product. *Protoplasma*, 250(1): 161–174. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0390-x>.
- Gohin, A (2019). *The Land Use Impacts of the EU Biodiesel Policy: Assessing the Direct, Indirect and Induced Effects*. *Journal of Agricultural Economics*, 75: 3–12. <https://doi.org/doi:10.1111/1477-9552.12365>.
- Golubeva A, Roychoudhury P, Dąbek P, Pryshchepa O, Pomastowski P, Pałczyńska J, Piszczek P, Gloc M, Dobrucka R, Feliczak-Guzik A, Nowak I, Buszeuski B, Witkowski A. (2023). Removal of the Basic and Diazo Dyes from Aqueous Solution by the Frustules of *Halamphora cf. salinicola* (Bacillariophyta). *Marine Drugs*, 21(5): 312. <https://doi.org/10.3390/md21050312>.
- González-Fernández C, Le Grand F, Bideau A, Huvet A, Paul-Pont I, Soudant, P. (2020). Nanoplastics exposure modulate lipid and pigment compositions in diatoms. *Environmental Pollution*, 262: 114274. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114274>.
- Goold H, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y. (2014). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Reports*, 34(4): 545–555. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1711-7>.
- Gordon R, Losic D, Tiffany MA, Nagy SS, Sterrenburg FAS. (2009). The Glass Menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends in Biotechnology*, 27(2): 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.003>
- Gozalvez M, Herrmann C, Zappettini E. (2004). *Minerales industriales de la República Argentina*. https://repositorio.segemar.gov.ar/bitstream/handle/308849217/2747/Minerales_Industriales_Argentina.pdf Último acceso: 08/02/2024
- Griffiths MJ, Dicks RG, Richardson C, Harrison ST (2011) Advantages and challenges of microalgae as a source of oil for biodiesel. *Biodiesel-feedstocks and processing technologies*. 9:177–200. <https://doi.org/10.5772/300855>.

- Griffiths MJ, Harrison STL. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493–507. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9392-7>.
- Grobbelaar JU. (2009). Upper limits of photosynthetic productivity and problems of scaling. *Journal of Applied Phycology* 21, 5:519-522. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9372-y>.
- Gu N, Lin Q, Li G, Qin G, Lin J, Huang L. (2012). Effect of Salinity Change on Biomass and Biochemical Composition of *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(1): 97–106. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00538.x>.
- Guillard RRL. (1973). Division rates, in: J.R. Stein (Ed.), *Handbook of Psychological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289–311.
- Guinder VA, Molinero JC, Popovich CA, Perillo GME. (2010). Long-term changes in phytoplankton phenology and community structure in the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Marine Biology* 157: 2703–2716. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1530-54>.
- Gumustas M, Sengel-Turk CT, Gumustas A, Ozkan S A, Uslu B. (2017). Effect of polymer-based nanoparticles on the assay of antimicrobial drug delivery systems. Multifunctional systems for combined delivery. En Grumezescu AM (Ed), *Biosensing and Diagnostics*, 67–108. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-52725-5.00005-8>.
- Gutierrez J, Kwan TA, Zimmerman JB, Peccia J. (2016). Ammonia inhibition in oleaginous microalgae. *Algal Research*, 19: 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.016>.
- Guzha A, Whitehead P, Ischebeck T, Chapman KD. (2023). Lipid Droplets: Packing Hydrophobic Molecules Within the Aqueous Cytoplasm. *Annual Review of Plant Biology*, 74: 195–223 <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070122-021752>.

- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., & Mayfield, S. (2010). Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*, 1(5), 763–784. <https://doi.org/10.4155/bfs.10.44>.
- Harwood DM. (1999). Diatomite. En Stoermer EF, Smol JP (Eds) *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*: 436–446.
- Hegel PE, Martín LA, Popovich CA, Damiani MC, Leonardi PI. (2019) Biodiesel production from *Halamphora coffeaeformis* microalga oil by supercritical ethanol transesterification, *Chemical Engineering and Processing*, 145: 107670. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107670>.
- Heintze C, Formanek P, Pohl D, Hauptstein J, Rellinghaus B, Kröger N. (2020). An intimate view into the silica deposition vesicles of diatoms. *BMC Materials*, 2: 11. <https://doi.org/10.1186/s42833-020-00017-8>.
- Hempt C, Kaiser JP, Scholder O, Buerki-Thurnherr T, Hofmann H, Rippl A, Schuster TB, Wick P, Hirsch C. (2020). The impact of synthetic amorphous silica (E 551) on differentiated Caco-2 cells, a model for the human intestinal epithelium. *Toxicology in Vitro*, 67: 104903. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104903>.
- Henstock JR, Canham LT, Anderson SI. (2015). Silicon: The evolution of its use in biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 11: 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.025>.
- Herrera A, D'Imporzano G, Acién Fernandez FG, Adani F. (2020). Sustainable production of microalgae in raceways: Nutrients and water management as key factors influencing environmental impacts. *Journal of Cleaner Production*, 287: 125005. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125005>
- Hilbert J A, Galligani S. (2014). The Use of Soybean By-Products as a Biofuel: The Argentine Case. En: Rutz D, Janssen R (Eds), *Socio-Economic Impacts of Bioenergy Production*, 131–150. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03829-2_8.

- Hildebrand M, Davis AK, Smith SR, Traller JC, Abbriano R. (2014). The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels* 3(2):221–240. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.157>.
- Hirani AH, Javed N, Asif M, Basu SK, Kumar A. (2018). A Review on First- and Second-Generation Biofuel Productions. En: Kumar A, Ogita S, Yau YY. (Eds), *Biofuels: Greenhouse Gas Mitigation and Global Warming*, 141–154 https://doi.org/10.1007/978-81-322-3763-1_8.
- Hisatake K, Tanaka S, Aizawa Y (1993) Evaporation rate of water in a vessel. *J Applied Physics*, 73: 7395–7401. <https://doi.org/10.1063/1.354031>.
- Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Cenicerros E, Natarajan M. (2012). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16(1): 143–169. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.143>.
- Holechek JL, Geli HME, Sawalhah MN, Valdez R. (2022). A Global Assessment: Can Renewable Energy Replace Fossil Fuels by 2050? *Sustainability* 14(8): 4792. <https://doi.org/10.3390/su14084792>.
- Hsieh CC, Felby C. (2017). Biofuels for the marine shipping sector. An overview and analysis of sector infrastructure, fuel technologies and regulations. IEA Bioenergy: Task 39. <http://task39.sites.olt.ubc.ca/files/2013/05/Marine-biofuel-report-final-Oct-2017.pdf>. Accessed 12 Oct 2021.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4): 621–639, <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2008.03492.x>.
- Huang J, Gogarten J. (2007). Did an ancient chlamydial endosymbiosis facilitate the establishment of primary plastids? *Genome Biology*, 8(6): R99. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-6-r99>

- Huntley ME, Johnson ZI, Brown SL., Sills DL., Gerber L, Archibald I, Machesky SC, Granados J, Beal C, Greene CH. (2015). Demonstrated large-scale production of marine microalgae for fuels and feed. *Algal Research*, 10: 249–265. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.016>.
- Indrayani I, Moheimani NR, Borowitzka MA. (2019). Long-term reliable culture of a halophilic diatom, *Amphora* sp. MUR258, in outdoor raceway pond, *Journal of Applied Phycology*. 31. 2771–2778: <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01803-y>.
- Ishika T, Bahri PA, Laird DW, Moheimani NR (2018) The effect of gradual increase in salinity on the biomass productivity and biochemical composition of several marine, halotolerant, and halophilic microalgae. *Journal of Applied Phycology* 30(3): 1453–1464. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1377-y>.
- Ishika, T., Moheimani, N. R., & Bahri, P. A. (2017). Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.110>.
- Ivanov, D.S., Lević, J.D., Sredanović, S.A. (2010). Fatty acid composition of various soybean products. *Food and Feed Research*. 37 (2): 65–70.
- Iyer, R. (2016). The issue of reducing or removing phospholipids from total lipids of a microalgae and an oleaginous fungus for preparing biodiesel. *Biofuels*, 7(1): 37–47. <https://doi.org/10.1080/17597269.2015.1118778>.
- Jain R, Dhali S, Nigam H, Malik A, Malik HK, Satyakam R. (2022). Recovery of diatom bio-silica using chemical, thermal, and plasma treatment. *Bioresource Technology Reports*, 18: 101035. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101035>.
- Jiang W, Luo S, Liu P, Deng X, Jing Y, Bai C, Li J. (2013). Purification of biosilica from living diatoms by a two-step acid cleaning and baking method. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1511–1518. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0192-3>

- Jorquera O, Kiperstok A, Sales EA, Embiruçu M, Ghirardi ML. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101(4), 1406–1413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.038>.
- Kadam DM, Thunga M, Wang S, Kessler MR, Grewell D, Lamsal B, Yu C. (2013). Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.046>.
- Kadam, D. M., Thunga, M., Wang, S., Kessler, M. R., Grewell, D., Lamsal, B., & Yu, C. (2013). Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.046>.
- Kannan DC, Venkat D. (2018). An open outdoor algal growth system of improved productivity for biofuel production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.5768>.
- Kašanin-Grubin M, Vergari F, Troiani F, Della Seta M. (2018). The role of lithology. En: E. Nadal-Romero, J.F. Martínez-Murillo, N.J. Kuhn (Eds.), *Badlands dynamics in a context of global change*: 61–109. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813054-4.00003-4>.
- Khoo KS, Ahmad I, Chew KW, Iwamoto K, Bhatnagar A, Show PL. (2023). Enhanced microalgal lipid production for biofuel using different strategies including genetic modification of microalgae: A review. *Progress in Energy and Combustion Science* 96: 101071. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2023.101071>.
- Kirst GO. (1990). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. Annual review of plant physiology and plant molecular *Biology*, 41(1): 21–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.000321>.

- Knothe G (2010) Biodiesel derived from a model oil enriched in palmitoleic acid, macadamia nut oil. *Energy & Fuels* 24(3): 2098–2103. <https://doi.org/10.1021/ef9013295>.
- Knothe G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology* 86 (10): 1059– 1070. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2004.11.002>.
- Knothe G. (2008). “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy & Fuels* 22(2): 1358– 1364. <https://doi.org/10.1021/ef700639e>.
- Kohane DS. (2006). Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(2), 203–209. <https://doi.org/10.1002/bit.21301>.
- Koley S, Mathimani T, Bagchi SK, Sonkar S, Mallick N. (2019). Microalgal biodiesel production at outdoor open and polyhouse raceway pond cultivations: A case study with *Scenedesmus accuminatus* using low-cost farm fertilizer medium. *Biomass and Bioenergy*, 120: 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.11.002>.
- Korsunsky AM, Bedoshvili YD, Cvjetinovic J, Aggrey P, Dragnevski KI, Gorin DA, Salimon AI, Likhoshway YV. (2020). Siliceous diatom frustules – A smart nanotechnology platform. *Materials Today: Proceedings*, 33: 2032–2040 <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.571>.
- Koutra, E., Tsafrakidou, P., Sakarika, M., & Kornaros, M. (2020). Microalgal Biorefinery. En Yousuf A (Ed) *Microalgae cultivation for biofuels production*: 163–185. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817536-1.00011-4>.
- Kumar K, Mishra SK, Shrivastav A, Park MS, Yang JW. (2015). Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51: 875–885. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.033>.

- Lechner CC, Becker CFW. (2015). Silaffins in Silica Biomineralization and Biomimetic Silica Precipitation. *Marine Drugs*, 13(8): 5297-5333. <https://doi.org/10.3390/md13085297>.
- Lee J, Lee HA, Shin M, Juang LJ, Kastrup CJ, Go GM, Lee H. (2020). Diatom frustule silica exhibits superhydrophilicity and superhemophilicity. *ACS Nano*. <http://doi.org/10.1021/acsnano.0c00621>.
- Leonardi, PI, Popovich, CA, Damiani, MC. (2011). Feedstocks for second generation biodiesel: microalgae's biology and oil composition. En: M. A. dos Santos Bernardes (Ed.), *Economic Effects of Biofuel Production*. InTech Publisher. Luxemburgo, pp: 318-346. (ISBN 978-953-307-178-7).
- Leone, G., Vona, D., De Giglio, E., Bonifacio, M. A., Cometa, S., Fiore, S., Palumbo F, Ragni R, Farinola GM, Cicco, S. R. (2019). Data from in vivo functionalization of diatom mesoporous biosilica with bisphosphonates. *Data in Brief*, 24: 103831. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103831>.
- Leong WH, Lim JW, Lam MK, Uemura Y, Ho YC. (2018). Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.066>.
- Lepetit B, Goss R, Jakob T, Wilhelm C. (2012). Molecular dynamics of the diatom thylakoid membrane under different light conditions. *Photosynthesis Research*, 111(1-2): 245–257. <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9633-5>.
- Levitan O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG. (2014). Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends in Biotechnology*, 32(3): 117–124, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.01.004>.
- Ley 27640/2021, Marco regulatorio de biocombustibles, Art. 8., Argentina, 2021. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-27640-352587/texto> consultado el 20 de mayo de 2024

- Leyland B, Boussiba S, Khozin-Goldberg I. (2020). A Review of Diatom Lipid Droplets. *Biology*, 9(2): 38. <https://doi.org/10.3390/biology9020038>
- Leyland B, Boussiba S, Khozin-Goldberg I. (2020). A review of diatom lipid droplets. *Biology*, 9(2): 38. <https://doi.org/10.3390/biology9020038>
- Li L, Yu X, Aleem AR, ZhangX, ZhaoY, WangX, Zhang Y, Wang Y, Shen W, Inganäs O, Tang J. (2021). UV-protection and fluorescence properties of the exoskeleton obtained from a living diatom modified by an Eu³⁺-complex. *Journal of Materials Chemistry C*, 9(31): 10005–10012. <https://doi.org/10.1039/d1tc01700d>.
- Li M, Liu D, Wang S, Guo H, Losic D, Deng L, Wu S, Yuan P. (2023). Efficient removal of Cd²⁺ by diatom frustules self-modified in situ with intercellular organic components. *Environmental Pollution*, 319: 121005 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121005>.
- Li Y, Zhang C, Hu Z. (2020). Selective removal of pharmaceuticals and personal care products from water by titanium incorporated hierarchical diatoms in the presence of natural organic matter. *Water Research*, 189: 116628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116628>.
- Li Z, Zhang Y, Feng N. (2019). Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, classification, drug loading, pharmacokinetics, biocompatibility, and application in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16(3): 219–237. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1575806>.
- Liao J, Gao P, Xu L, Feng J. (2018). A study of morphological properties of SiO₂ aerogels obtained at different temperatures. *Journal of Advanced Ceramics*, 7(4): 307–316. <https://doi.org/10.1007/s40145-018-0280-6>.
- Liu H, Liu TJ, Guo HW, Wang YJ, Ji R, Kang LL, Wang YT, Guo X, Li JG, Jiang LQ, Fang Z. (2024). A review of the strategy to promote microalgae value in CO₂ conversion-lipid enrichment-biodiesel production. *Journal of Cleaner Production* 436: 140538. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.140538>.

- Llinàs M. & Sánchez-García D. (2013). Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Revistes Catalanes amb Accés Obert.*: 20–31. [oai:raco.cat:article/276498](https://doi.org/10.1002/raco.2013.276498)
- Losic D, Mitchell JG, Voelcker NH. (2009). *Diatomaceous Lessons in Nanotechnology and Advanced Materials*. *Advanced Materials*, 21(29), 2947–2958. <https://doi.org/10.1002/adma.200803778>.
- Lupette J, Jaussaud A, Seddiki K, Morabito C, Brugiere S, Schaller H, Kuntz M, Putaux JL, Jouneau PH, Rebelle F, Falconet D, Coute Y, Jouhet J, Tardif M, Salvaing J, Marechal E. (2019) The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*, 38: 101415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101415>..
- Mal N, Srivastava K, Sharma Y, Singh M, Rao KM, Enamala MK, Chandrasekhar K, Chavali M. (2021). Facets of diatom biology and their potential applications. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12: 1959–1975. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01155-5>.
- Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., Wincker P, Iudicone D, de Vargas C, Bittner L, Zingone A Bowler, C. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), E1516–E1525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509523113>.
- Manciu M, Manciu FS, Ruckenstein E. (2017). On the surface tension and Zeta potential of electrolyte solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 244, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.06.006>.
- Maréchal E, Lupette J. (2019). Relationship between acyl-lipid and sterol metabolisms in diatoms. *Biochimie*, 169: 3–11 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.005>.
- Marella TK, Tiwari A. (2020) Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin. *Bioresource Technology*, 307: 123245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123245>.

- Martin KR. (2013). Silicon: the health benefits of a metalloid. En: Sigel A, Sigel H, Sigel R (Eds), *Interrelations Between Essential Metal Ions and Human Diseases*, 451–473. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7500-8_14.
- Martin LA, Popovich CA, Martinez AM, Damiani MC, Leonardi PI. (2016). Oil assessment of *Halamphora coffeaeformis* diatom growing in a hybrid two-stage system for biodiesel production. *Renewable Energy* 92: 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.01.078>.
- Martín LA, Popovich CA, Martínez AM, Scodelaro-Bilbao PG, Damiani MC, Leonardi PI. (2018). Hybrid two-stage culture of *Halamphora coffeaeformis* for biodiesel production: growth phases, nutritional stages and biorefinery approach. *Renewable Energy* 118:984–992. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.10.086>.
- Martin-Jézéquel V, Hildebrand M, Brzezinski MA. (2000). Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *Journal of Phycology*, 36(5): 821–840. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.00019.x>
- Matsumoto M, Nojima D, Nonoyama T, Ikeda K, Maeda Y, Yoshino T, Tanaka T (2017). Outdoor cultivation of marine diatoms for year-round production of biofuels. *Marine Drugs* 15(4): 94. <https://doi.org/10.3390/md15040094>.
- MAyDS, 2020. Segunda Contribución Determinada a Nivel Nacional de la República Argentina. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, República Argentina.
- McLachland JL, Growth media-marine, en: J.R. Stein (Ed.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge University Press, Cambridge, 1973, pp. 26–47.
- Mehariya S, Goswami RK, Verma P, Lavecchia R, Zuurro A. (2021). Integrated Approach for Wastewater Treatment and Biofuel Production in Microalgae Biorefineries. *Energies* 14(8): 2282. <https://doi.org/10.3390/en14082282>.
- Mendoza-Guzman H, Valido AJ, Duarte LC, Presmanes KF (2011), Analysis of interspecific variation in relative fatty acid composition: use of flow

cytometry to estimate unsaturation index and relative polyunsaturated fatty acid content in microalgae, *Journal of Applied Phycology*. 23:7–15, <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9526-6>.

Menegazzo ML, Nascimento VM, Hestekin CN, Hestekin JA, Fonseca GG. (2020). Evaluation of *Chlorella sorokiniana* cultivated in outdoor photobioreactors for biodiesel production. *Biofuels*: 13 483–488, <https://doi.org/10.1080/17597269.2020.1763094>.

Miller TE, Beneyton T, Schwander T, Diehl C, Girault M, McLean R, Chtel T, Claus P, Cortina NS, Baret JC, Erb, T.J. (2020). Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts. *Science*, 368(6491):649–654. <https://doi.org/10.1126/science.aaz6802>.

MINCyT (2013). www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar

Mohan S, Guan X, Liang M, Karakoti A, Vinu A. (2023). Stimuli-responsive silica silanol conjugates: strategic nanoarchitectonics in targeted drug delivery. *Small*, 4: 2301113. <https://doi.org/10.1002/sml.202301113>.

Monteiro MR, Kugelmeier CL, Pinheiro RS, Batalha MO, da Silva CA. (2018). Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 88, 109–122 <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.019>.

Morales M, Aflalo C, Bernard O. (2021). Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass and Bioenergy*, 150: 106108. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106108>.

Morelli L, Torres-Montilla S, Glauser G, Shanmugabalaji V, Kessler F, Rodríguez-Concepción M. (2023). Novel insights into the contribution of plastoglobules and reactive oxygen species to chromoplast differentiation. *N. Phytologist*, 237: 1696–1710. <https://doi.org/10.1111/nph.18585>.

Morrison WR Smith LM. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Lipid Research*, 5: 600-608.

- Moshood TD, Nawanir G, Mahmud F. (2021). Microalgae biofuels production: A systematic review on socioeconomic prospects of microalgae biofuels and policy implications. *Environmental Challenges*, 5: 100207. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100207>.
- Mourya M, Khan MJ, Ahirwar A, Schoefs B, Marchan J, Rai A, Varjani S, Rajendran K, Banu JR, Vinayak V. (2022). Latest trends and developments in microalgae as potential source for biofuels: the case of diatoms. *Fuel*, 314: 122738. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122738>.
- Muralidhar A, Shabala L, Broady P, Shabala S, Garrill A. (2015). Mechanisms underlying turgor regulation in the estuarine alga *Vaucheria erythrospora* (Xanthophyceae) exposed to hyperosmotic shock. *Plant, Cell & Environment*, 38(8): 1514–1527 .
- Murison V, Hérault J, Côme M, Guinio S, Lebon A, Chamot C, Bénard M, Galas L, Schoefs B, Marchand J, Bardor M, Ulmann L. (2023). Comparison of two *Phaeodactylum tricornutum* ecotypes under nitrogen starvation and resupply reveals distinct lipid accumulation strategies but a common degradation process. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1257500. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1257500>.
- Murphy DJ. (2011). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*, 249(3): 541–585. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0329-7>.
- Naderi, M. (2015). Surface Area. *Progress in Filtration and Separation*, 585–608. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384746-1.00014-8>.
- Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK (2010) Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2): 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>.
- Nanda S, Rana R, Sarangi PK, Dalai AK, Kozinski JA. (2018). A Broad Introduction to First-, Second-, and Third-Generation Biofuels. *Recent*

Advancements in Biofuels and Bioenergy Utilization, 1–25.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-1307-3_1.

Nascimento IA, Marques SSI, Cabanelas ITD, Pereira SA., Druzian JI, de Souza CO, Vich DV, de Carvalho GC, Nascimento, M. A. (2012). Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *BioEnergy Research*, 6(1): 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9222-2>.

Natrass C, Horwell CJ, Damby DE, Kermanizadeh A, Brown DM, Stone V. (2015). The global variability of diatomaceous earth toxicity: a physicochemical and in vitro investigation. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 10(1): 23. <https://doi.org/10.1186/s12995-015-0064-7>.

Navarro FE, Damiani MC, Leonardi PI, Popovich CA. (2022). Temperature and salinity effect on tolerance and lipid accumulation in *Halamphora coffeaeformis*: an approach for outdoor bioenergy cultures. *Bioenergy Research*, 15: 1545–1554. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10349-2>.

-Navarro FE, Leonardi PI, Damiani MC, Martín LA, Martínez AM, Popovich C.A. (2023) Outdoor culture of *Halamphora coffeaeformis* in the semi-arid Pampa of Argentina: A comprehensive analysis of triacylglycerol production for biodiesel. *Algal Research*, 74: 103170. (2023)

Niculescu, V.-C. (2020). Mesoporous Silica Nanoparticles for Bio-Applications. *Frontiers in Materials*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00036>

Noguchi T, Hayashi Y. (2014). Vacuoles and storage organelles. Noguchi T, Kawano S, Tsukaya H, Matsunaga S, Sakai A, Karahara I, Hayashi Y (Eds), *Atlas of Plant Cell Structure*, 89–106. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54941-3_5.

Nonoyama T, Kazamia E, Nawaly H, Gao X, Tsuji Y, Matsuda Y, Bowler C, Tanaka T, G. Dorrell R. (2019). Metabolic innovations underpinning the

- origin and diversification of the diatom chloroplast. *Biomolecules*; 9(8):322. <https://doi.org/10.3390/biom9080322>.
- Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH, Wijffels RH. (2011). Microalgal production — A close look at the economics. *Biotechnology Advances*, 29(1): 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>.
- OCDE-FAO. 2023. OECD-FAO Agricultural Outlook. <https://doi.org/10.1787/08801ab7-en>
- Panichelli L, Dauriat A, Gnansounou E. (2008). Life cycle assessment of soybean-based biodiesel in Argentina for export. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 14(2): 144–159. <https://doi.org/10.1007/s11367-008-0050-8>.
- Popovich CA, Gayoso A. (1999). Effect of irradiance and temperature on the growth rate of *Thalassiosira curviseriata* Takano (Bacillariophyceae), a bloom diatom in Bahia Blanca estuary (Argentina). *Journal of Plankton Research*, 21(6): 1101–1110. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.6.1101>.
- Popovich CA, Damiani MC, Constenla D, Leonardi PI. (2012a). Lipid quality of the diatoms *Skeletonema costatum* and *Navicula gregaria* from the South Atlantic Coast (Argentina): evaluation of its suitability as biodiesel feedstock. *Journal of Applied Phycology*, 24: 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9639-y>.
- Popovich CA; Damiani MC; Constenla D; Martinez AM; Freije RH; Giovanardi M; Pancaldi S; Leonardi PI. (2012b). Evaluation of growth and biochemical composition of *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 114: 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.121>.
- Popovich CA, Faraoni MB, Sequeira A, Daglio Y, Martín LA, Martínez AM, Damiani MC, Matulewicz MC, Leonardi PI. (2020). Potential of the marine diatom *Halamphora coffeaeformis* to simultaneously produce omega-3 fatty acids, chrysolaminarin and fucoxanthin in a raceway pond. *Algal Res.* 51: 102030, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102030>

- Popovich CA, Guinder VA, Pettigrosso RE. (2008). Composition and dynamics of phytoplankton and aloricate ciliate communities in the Bahía Blanca Estuary. En Neves R, Baretta JW, Mateus M (Eds.), Perspectives on integrated coastal zone management in South America: 257 - 272
- Popovich CA, Marcovecchio JE. (2008). Spatial and temporal variability of phytoplankton and environmental factors in a temperate estuary of South America (Atlantic coast, Argentina). *Continental Shelf Research* 28(2): 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2007.08.001>.
- Popovich CA, Pistonesi M, Hegel P, Constenla D, Barnech Bielsa GB, Martin LA, Damiani MC, Leonardi PI (2019) Unconventional alternative biofuels: quality assessment of biodiesel and its blends from marine diatom *Navicula cincta*. *Algal Research*, 39: 101438. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101438>.
- Potapov, V. V., & Zhuravlev, L. T. (2005). Temperature dependence of the concentration of silanol groups in silica precipitated from a hydrothermal solution. *Glass Physics and Chemistry*, 31(5): 661–670. <https://doi.org/10.1007/s10720-005-0111-z>.
- Pradhan A, Mbohwa C. (2014). *Development of biofuels in South Africa: Challenges and opportunities*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 1089–1100. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.13>.
- Priscu JC, Priscu LR, Palmisano AC, Sullivan CW. (1990). Estimation of neutral lipid levels in Antarctic Sea ice microalgae by Nile red fluorescence. *Antarctic Science*, 2(2): 149–155. <https://doi.org/10.1017/S0954102090000190>.
- Pryshchepa O, Pomastowski P, Buszewski B. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284: 102246. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102246>.
- Puricelli S, Cardellini G, Casadei S, Faedo D, van den Oever AEM, Grosso M. (2021). A review on biofuels for light-duty vehicles in Europe. *Renewable*

and Sustainable Energy Reviews, 137: 110398.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110398>.

Rajaram M, Nagaraj S, Manjunath M, Boopathy A, Kurinjimalar C, Rengasamy R, Jayakumar T, Sheu JR, Li JY. (2018). Biofuel and biochemical analysis of *Amphora coffeaeformis* RR03, a novel marine diatom, cultivated in an open raceway pond. *Energies* 11 (6): 1341.
<https://doi.org/10.3390/en11061341>

Rajendran S, Sheena TS, Radhakrishnan A, Perumal S, Jeganathan K. (2019). Characterizations and Analysis of Marine Diatom, Amphora Genus Frustules: A Resource of Biomaterial. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, 1–7: 224–230. <http://doi.org/10.1680/jbibn.18.00026>.

Rayen F, Behnam T, Dominique P. (2019). Optimization of a raceway pond system for wastewater treatment: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 39: 1–14. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1571007>.

Redfield AC. (1958). The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 46(3): 230–221

Reid A, Buchanan F, Julius M, Walsh PJ. (2021). A review on diatom biosilicification and their adaptive ability to uptake other metals into their frustules for potential application in bone repair. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(34): 6728–6737. <https://doi.org/10.1039/d1tb00322d>.

Reshmy R, Paulose TAP, Philip E, Thomas D, Madhavan A, Sirohi R. Binod P, Awasthi MK, Pandey A, Sindhu R. (2022). Updates on high value products from cellulosic biorefinery. *Fuel*, 308: 122056.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122056>.

Reynolds ES. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17(1): 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>.

Rodríguez-Miranda E, Guzmán JL, Acién FG, Berenguel M, Visioli A. (2020). Indirect regulation of temperature in raceway reactors by optimal

management of culture depth. *Biotechnology and Bioengineering*, 118: 1186–1198 <https://doi.org/10.1002/bit.27642>.

Rogers JN, Rosenberg JN, Guzman BJ, Oh VH, Mimbela LE, Ghassemi A, Betenbaugh MJ, Oyler GA, Donohue MD. (2014). *A critical analysis of paddlewheel-driven raceway ponds for algal biofuel production at commercial scales. Algal Research*, 4, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.007>.

Rojas-Flores S, De La Cruz Noriega M, Benites SM, Aguirre Gonzales G, Salvador Salinas A, Silva Palacios F. (2020). Generation of bioelectricity from fruit waste. *Energy Reports*, 6, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.10.025>.

Rosa CM, Mereles SM, Rigacci MF, Colimodio DC. (2020). Hemoglobina libre en plasma por espectrofotometría directa. *Revista Hematología*, 24(2): 91-96.

Rottet S, Besagni C, Kessler F. (2015). The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1847(9): 889–899. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.002>.

Round FE, Crawford RM, Mann DG. (1990). The diatoms: biology and morphology of the genera, ix, 747p. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 70(4): 924-924. <https://doi.org/10.1017/S0025315400059245>.

Ruan R, Zhang Y, Chen P, Liu S, Fan L, Zhou N, Ding K, Peng P, Addy M, Cheng Y, Anderson E, Wang Y, Liu Y, Lei H, Li B. (2019). Biofuels: Introduction, en Pandey A, Larroche C, Dussap CG, Gnansounou E, Khanal SK, Ricke S, (Eds) *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels*, 3–43. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816856-1.00001-4>.

- Russo D, Dassisti M, Lawlor V, Olabi AG. (2012). State of the art of biofuels from pure plant oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4056–4070. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.024>.
- Saadattalab Z, Zarei M, Mohammadsaleh F, Abdi G. (2023) A biogenic extracellular synthesis of Ag nanoparticles using live *Chaetoceros* sp. diatom and application as optical ammonia sensor in solution. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14, 7373–7385. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03957-9>
- Sala SE, Vouilloud AA, Popovich CA, Sanchez-Puerta MV, Almandoz GO, Coy BM, Montoya NG, Leonardi P. (2020). Molecular, morphological and toxinological characterization of an Argentinean strain of *Halamphora coffeaeformis* with potential biotechnological applications. *Journal of Applied Phycology* 32: 799–806. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02353-4>.
- Saladini F, Patrizi N, Pulselli FM, Marchettini N, Bastianoni S. (2016). Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.073>.
- Sanchez Rizza L, Sanz Smachetti ME, Do Nascimento M, Salerno GL, Curatti L. (2017). Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. *Algal Research*, 22, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.021>.
- Saranya G, Ramachandra TV. (2020). Novel Biocatalyst for Optimal Biodiesel Production from Diatoms. *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.053>.
- Sardo A, Orefice I, Balzano S, Barra L, Romano G. (2021). Mini-Review: Potential of Diatom-Derived Silica for Biomedical Applications. *Applied Sciences*, 11(10), 4533. <https://doi.org/10.3390/app11104533>.

- Sardo A, Orefice I, Balzano S, Barra L, Romano G. (2021). Mini-review: potential of diatom-derived silica for biomedical applications. *Applied Sciences*, 11(10): 4533. <https://doi.org/10.3390/app11104533>
- Sarma S, Sharma S, Rudakiya D, Upadhyay J, Rathod V, Patel A, Narra M. (2021). Valorization of microalgae biomass into bioproducts promoting circular bioeconomy: a holistic approach of bioremediation and biorefinery. *3 Biotech*, 11(8). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02911-8>.
- Sarthou G, Timmermans KR, Blain S, Tréguer P. (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research*. 53: 25–42. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2004.01.007>.
- Sato R, Maeda Y, Yoshino T, Tanaka T, Matsumoto M. (2014). Seasonal variation of biomass and oil production of the oleaginous diatom *Fistulifera* sp. in outdoor vertical bubble column and raceway-type bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(6): 720–724. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.11.017>.
- Sayanova O, Mimouni V, Ulmann L, Morant-Manceau A, Pasquet V, Schoefs B, Napier JA. (2017). Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728): 20160407. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0407>.
- Scarsini M, Marchand J, Manoylov KM, Schoefs B. (2019). Photosynthesis in Diatoms. En: Seckbach J, Gordon R (Eds), *Diatoms: Fundamentals and Applications*, 191–211. <https://doi.org/10.1002/9781119370741.ch8>
- Serôdio J., Lavaud J. (2022). Diatoms and Their Ecological Importance. En: Leal Filho, W., Azul, A.M., Brandli, L., Lange Salvia, A., Wall, T. (Eds) *Life Below Water. Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98536-7_12.
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. (1998). Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out Report. United States. <https://doi.org/10.2172/15003040>.

- Shikata T, Nagasoe S, Oh S, Matsubara T, Yamasaki Y, Shimasaki Y, Oshihima, Y, Honjo T. (2008) Effects of down- and upshocks from rapid changes of salinity on survival and growth of estuarine phytoplankters. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 53: 81–87. <https://doi.org/10.5109/10075>.
- Shimamatsu H. (2004) Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia* 512, 1-3: 39-44. <https://doi.org/10.1023/b:hydr.0000020364.23796.04>.
- Simmons M. (2015). Climates and microclimates: challenges for extensive green roof design in hot climates. En: R. Sutton (Ed.), *Green Roof Ecosystems*. Ecological Studies vol. 223, Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14983-7_3
- Simonsen R. (1979). The diatom System: Ideas on Phylogeny. *Bacillaria*, 2: 9-71.
- Singh P, Kumari S, Guldhe A, Misra R, Rawat I, Bux F. (2016). Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.001>.
- Singh D, Gonzales-Calienes G. (2021). Liquid Biofuels from Algae. En: Mandotra SK, Upadhyay AK, Ahluwalia AS (Eds), *Algae*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7518-1_11.
- Sipila M, Berndt T, Petaja T, Brus D, Vanhanen J, Stratmann F, Patokosky J, Mauldin RL, Hyvärinen HK, Lihavainen H, Kulmala M. (2010). The Role of Sulfuric Acid in Atmospheric Nucleation. *Science*, 327(5970): 1243–1246. <https://doi.org/10.1126/science.1180315>.
- Smith SR, Glé C, Abbriano RM, Traller JC, Davis A, Trentacoste E, Vernet M, Allen AE, Hildebrand M. (2016) Transcript level coordination of carbon pathways during silicon starvation-induced lipid accumulation in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *New Phytologist*, 210(3): 890–904, <https://doi.org/10.1111/nph.13843>.

- Soleimani M, Rutten L, Maddala SP, Wu H, Eren ED, Mezari B, Schreur-Piet I, Friedrich H, van Benthem, RATM. (2020). Modifying the thickness, pore size, and composition of diatom frustule in *Pinnularia* sp. with Al³⁺ ions. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76318-5>.
- Sonkar S, Deb D, Mallick N. (2020). Outdoor cultivation of the green microalga *Chlorella minutissima* in mini pond system under batch and fed-batch modes integrating low-dose sequential phosphate addition (LDSPA) strategy for biodiesel production. *Biomass Bioenergy* 138: 105596. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.10559>.
- Stansell GR, Gray VM, Sym SD. (2011). Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *Journal of Applied Phycology*, 24(4): 791–801. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9696-x>.
- Steele DJ, Franklin DJ, Underwood GJC. (2014). Protection of cells from salinity stress by extracellular polymeric substances in diatom biofilms. *Biofouling*, 30(8): 987–998. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.960859>.
- Steele DJ, Franklin DJ, Underwood GJC. (2014). Protection of cells from salinity stress by extracellular polymeric substances in diatom biofilms. *Biofouling*, 30(8): 987–998. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.960859>.
- Strickland JDH, Parsons TR. (1972) A practical handbook of seawater analysis, second. *Bulletin / Fisheries Research Board*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5439-4_19.
- Sunday Okeke ES, Ejeromedoghene O, Okoye CO, Ezeorba TPC, Nyaruaba R, Ikechukwu CK, Oladipo A, Orege JI. (2022). Microalgae biorefinery: An integrated route for the sustainable production of high-value-added products. *Energy Conversion and Management*: X, 16: 100323. <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2022.100323>.
- Suparmaniam U, Lam MK, Lim JW, Yusup S, Tan IS, Lau SY, Kodgire P, Kachhwaha SS. (2023). Influence of environmental stress on microalgae growth and lipid profile: a systematic review. *Phytochemistry Reviews*, 22: 879–901. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09810-7>.

- Suzuki Y, Takahashi M. (1995). Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature. *Journal of Phycology*, 31(6): 880–888. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00880.x>.
- Talebi AF, Mohtashami SK, Tabatabaei M, Tohidfar M, Bagheri A, Zeinalabedini M, Mirzaei HH, Mirzajanzadeh M, Shafaroudi SM, Bakhtiari S. (2013). Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*, 2 (3): 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.04.003>.
- Townley, H. E. (2011). Diatom Frustules: Physical, Optical, and Biotechnological Applications. En: Seckbach J, Kociolek P. (Eds), *The diatom world. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* (19): 273–289. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7_12
- Tramontano C, Chianese G, Terracciano M, de Stefano L, Rea I. (2020). Nanostructured Biosilica of Diatoms: From Water World to Biomedical Applications. *Applied Sciences*, 10(19): 6811. <https://doi.org/10.3390/app10196811>.
- Tramontano C, Chianese G, Terracciano M, de Stefano L, Rea I. (2020). Nanostructured biosilica of diatoms: from water world to biomedical applications. *Applied Sciences*, 10(19): 6811. <https://doi.org/10.3390/app10196811>.
- Tyagi R, Rastogi RP, Babich O, Awasthi MK, Tiwari A. (2024). New perspectives of omega-3 fatty acids from diatoms. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 4: 528–541. <https://doi.org/10.1007/s43393-023-00202-2>
- Umemura K, Noguchi Y, Ichinose T, Hirose Y, Kuroda R, Mayama S. (2008). Diatom cells grown and baked on a functionalized mica surface. *Journal of Biological Physics*, 34(1-2): 189–196. <https://doi.org/10.1007/s10867-008-9086-z>.
- Uusitalo V, Väisänen S, Havukainen J, Havukainen M, Soukka R, Luoranen M (2014). Carbon footprint of renewable diesel from palm oil, jatropha oil and

- rapeseed oil, *Renewable Energy*, 69: 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.03.020>.
- Van Creveld SG, Rosenwasser S, Schatz D, Koren I, Vardi A. (2014). Early perturbation in mitochondria redox homeostasis in response to environmental stress predicts cell fate in diatoms. *The ISME Journal*, 9(2): 385–395. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.136>
- Van Eynde E, Lenaerts B, Tytgat T, Verbruggen SW, Hauchecorne B, Blust R, Lenaerts S. (2014). Effect of pretreatment and temperature on the properties of *Pinnularia biosilica* frustules. *RSC Advances*, 4(99): 56200–56206. <https://doi.org/10.1039/c4ra09305d>.
- Van Grinsven A, Van den Toorn E, van der Veen E, Kampman B. (2020). Used cook oil (UCO) as biofuel feedstock in the EU. <https://cedelft.eu/publications/used-cooking-oil-uco-as-biofuel-feedstock-in-the-eu/>. Consultado el 21 de junio de 2024
- Walther TC, Chung J, Farese RV. (2017). Lipid Droplet Biogenesis. Annual Review of Cell and Developmental *Biology*, 33(1): 491–510. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060608>.
- Walton KS, Snurr RQ. (2007). Applicability of the BET Method for Determining Surface Areas of Microporous Metal–Organic Frameworks. *Journal of the American Chemical Society*, 129(27): 8552–8556. <https://doi.org/10.1021/ja071174k>
- Wang J, Azam W. (2024). Natural resource scarcity, fossil fuel energy consumption, and total greenhouse gas emissions in top emitting countries. *Geoscience Frontiers* 15: 101757. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2023.101757>.
- Wang JK, Seibert M. (2017). Prospects for commercial production of diatoms. *Biotechnology for Biofuels*, 10: 16. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0699-y>.

- Wang K, Khoo KS, Leong HY, Nagarajan D, Chew KW, Ting HY, Selvarajoo A, Chang JS, Show, P. L. (2022). How does the Internet of Things (IoT) help in microalgae biorefinery? *Biotechnology Advances*, 54: 107819. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107819>.
- Wang K, Khoo KS, Leong HY, Nagarajan D, Chew KW, Ting HY, Selvarajoo A, Chang JS, Show PL. (2021). How does the Internet of Things (IoT) help in microalgae biorefinery? *Biotechnology Advances* 54 :107819. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107819>.
- Wang L, Pan K, Li J, Li Y, Zhu B, Wang Y, Feng C, Han, J. (2019). Influence of physicochemical characteristic of diatom frustules on hemorrhage control. *Biomaterials Science*. <https://doi.org/10.1039/c9bm00099b>.
- Wang L, Pan K, Zhang L, Zhou C, Li Y, Zhu B, Han J. (2021). Tentative identification of key factors determining the hemostatic efficiency of diatom frustule. *Biomaterials Science*, 9(6): 2162–2173. <https://doi.org/10.1039/d0bm02002h>.
- Wang S, Mukhambet Y, Esakkimuthu S, Abomohra AEF. (2022). Integrated microalgal biorefinery – Routes, energy, economic and environmental perspectives, *Journal of Cleaner Production*, 348: 131245 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131245>
- Wantzen KM, Mol JH. (2013). Soil Erosion from Agriculture and Mining: A threat to tropical stream ecosystems. *Agriculture*, 3(4): 660-683. <https://doi.org/10.3390/agriculture3040660>.
- White RL, Ryan RA. (2015). Long-term cultivation of algae in open-raceway ponds: lessons from the field. *Industrial Biotechnology*, 11(4), 213–220. <https://doi.org/10.1089/ind.2015.0006>.
- Wiesenthal T, Leduc G, Christidis P, Schade B, Pelkmans L, Govaerts L, Georgopoulos P. (2009). Biofuel support policies in Europe: lessons learnt for the long way ahead. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13(4): 789–800, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.01.011>.

- Wu S, Zhang B, Huang A, Huan L, He L, Lin A, Niu J, Wang G. (2013). Detection of intracellular neutral lipid content in the marine microalgae *Prorocentrum micans* and *Phaeodactylum tricornutum* using Nile red and BODIPY 505/515. *Journal of Applied Phycology*, 26(4): 1659–1668. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0223-0>.
- Xu F, Pan J. (2020). Potassium channel KCN11 is required for maintaining cellular osmolarity during nitrogen starvation to control proper cell physiology and TAG accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1): 129. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01769-x>.
- Xu H, Shi Z, Zhang X, Pang M, Pan K, Liu H. (2021). Diatom frustules with different silica contents affect copepod grazing due to differences in the nanoscale mechanical properties. *Limnology and Oceanography*, 9: 3408–3420. <https://doi.org/10.1002/lno.11887>.
- Xu J, Yin K, Ho AYT, Lee JHW, Anderson DM, Harrison PJ (2009) Nutrient limitation in Hong Kong waters inferred from comparison of nutrient ratios, bioassays and ³³P turnover times. *Marine Ecology - Progress Series*, 388: 81–97. <https://doi.org/10.3354/meps08098>.
- Yang C, Feng C, Li Y, Cao Z, Sun Y, Li X, Zhang L, Zhou C, Han J. (2023). Morphological and physicochemical characteristics, biological functions, and biomedical applications of diatom frustule. *Algal Research* 72: 103104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103104>
- Yang C, Feng C, Li Y, Cao Z, Sun Y, Li X, Zhang L, Zhou C, Han J. (2023). Morphological and physicochemical characteristics, biological functions, and biomedical applications of diatom frustule. *Algal Research*, 72: 103104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103104>.
- Yang R, Wei D, Xie J. (2020). Diatoms as cell factories for high-value products: chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7): 993–1009. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805402>.

- Yang R, Wei D, Xie J. (2020). Diatoms as cell factories for high-value products: chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805402>
- Yang Y, Ge S, Pan Y, Qian W, Wang S, Zhang J, Zhuang LL. (2023). Screening of microalgae species and evaluation of algal-lipid stimulation strategies for biodiesel production. *Science of The Total Environment*, 857: 159281 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159281>.
- Yang ZK, Niu YF, Ma YH, Xue J, Zhang MH, Yang WD, Liu JS, Lu SH, Guan Y, Li HY. (2013). Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1): 67. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-67>.
- Yao Y, Lu Y, Peng KT, Huang T, Niu YF, Xie WH, Yang WD, Liu JS, Li HY. (2014). Glycerol and neutral lipid production in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* promoted by overexpression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biotechnol Biofuels* 7(1): 110. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-110>.
- Ya-wen LIU. (2021). Bp Statistical Review of World Energy 2021 edition published: the energy market suffered a huge shock. *China's Petrochemical and Chemical Industry* 8 32–33.
- Yin Z, Zhu L, Li S, Hu T, Chu R, Mo F, Hu D, Liu C, Li B. (2020). A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: environmental pollution control and future directions. *Bioresource Technology*, 301: 122804. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>.
- Yu J, Wang P, Wang Y, Chang J, Deng S, Wei W. (2018). Thermal constraints on growth, stoichiometry and lipid content of different groups of microalgae with bioenergy potential. *Journal of Applied Phycology* 30: 1503–1512. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1358-1>.
- Yu Y, Addai-Mensah J, Losic D. (2012). Functionalized diatom silica microparticles for removal of mercury ions. *Science and technology of*

advanced Materials, 13(1): 015008. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/13/1/015008>.

Zhang H, Yu S, Shao L, He P. (2018). Estimating source strengths of HCl and SO₂ emissions in the flue gas from waste incineration. *Journal of Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.ies.2018.05.019>.

Zhang J, Ding T, Zhang Z, Xu L, Zhang C. (2015). Enhanced adsorption of trivalent arsenic from water by functionalized diatom silica shells. *PLOS ONE*, 10(4): e0123395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123395>.

Zheng X, Streimikiene D, Balezentis T, Mardani A, Cavallaro F, Liao H. (2019). A review of greenhouse gas emission profiles, dynamics, and climate change mitigation efforts across the key climate change players. *Journal of Cleaner Production* 234: 1113–1133. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.140>.

Zhou Y, Pavlenko N, Rutherford D, Osipova L, Comer B. (2020). The potential of liquid biofuels in reducing ship emissions. ICCT Working Paper 2020-21, International Council on Clean Transportation. <https://theicct.org/sites/default/files/publications/Marinebiofuels-sept2020.pdf>. Consultado el 12 octubre de 2021.

Zhuang LL, Yu D, Zhang J, Liu F, Wu YH, Zhang TY, Dao GH, Hu HY. (2018). The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94: 1110–1119. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.06.006>.

Zuccaro G, Yousuf, A, Pollio A, Steyer JP. (2020). Microalgae cultivation systems. En Yousuf A (Ed) *Microalgae cultivation for biofuels production*, 11–29. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817536-1.00002-3>.

Zulu NN, Zienkiewicz K, Vollheyde K, Feussner I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research*, 70: 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001>.