

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**DETERMINACIÓN DE ACEITES EN ALGAS MARINAS
COMO POTENCIAL MATERIA PRIMA PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

SUBTEMA

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y DESARROLLO DE
BIOMASA DE *Odontella auirta*; *Cocsinodiscuss granii*;
Nitzchia sp; *Bacillaria sp*; *Senedesmus vacuolatus*.
MICROALGAS PROVENIENTES DEL MAR ATLÁNTICO DE
GUATEMALA.**

RODE AIDA RUÍZ MORALES

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, ABRIL 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE ACEITES EN ALGAS MARINAS COMO
POTENCIAL MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIODIESEL**

SUBTEMA

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y DESARROLLO DE BIOMASA DE
Odontella auirta; *Cocsinodiscus granii*; *Nitzchia sp*; *Bacillaria
sp*; *Senedesmus vacuolatus*. MICROALGAS PROVENIENTES DEL
MAR ATLÁNTICO DE GUATEMALA.**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

RODE AIDA RUÍZ MORALES

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, ABRIL 2013

Dedicado a la memoria de mi amada madre Aida Morales de Ruiz quien ha inspirado cada día de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por proveerme la vida, por *haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor, por haberme permitido lograr mi tan anhelada meta.*

A mi amado Padre Iram Ruiz por su ejemplo de perseverancia y constancia, por la fuerza que me ha inspirado siempre y por el valor mostrado para salir adelante a pesar de las circunstancias pero especialmente por todo su amor.

De forma muy especial a mis tíos Luis y Osmary Pérez quienes han sido parte fundamental de este logro, gracias por su amor y apoyo incondicional.

A mi amado Sergio por su paciencia, apoyo y sobre todo por amarme.

A mis abuelitos, hermanos y demás familia por siempre apoyarme.

A mis asesores Lic. Erick Estrada y Licenciada Ana Lucía Mazariegos y a mis dos grandes amigas Nancy Castro y Carolina Valdez.

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdova Audón	Vocal V

INDICE

I.	AMBITO DE LA INVESTIGACION	1
II.	RESUMEN	2
III.	ANTECEDENTES	3
	A. Biocarburantes	3
	1. Generalidades	3
	2. Tipos de biocombustibles	4
	B. Biodiesel	5
	C. Algas	6
	1. Clasificación de las Algas	7
	2. Importancia biológica de las algas	9
	3. Importancia Comercial de las algas	9
	D. Microalgas	10
	1. Ventajas del cultivo de Microalgas para la producción de biodiesel	11
	E. Cultivo de algas	14
	1. Medio de cultivo marino para microalgas	15
IV.	JUSTIFICACION	18
V.	OBJETIVOS	19
VI.	MATERIALES Y METODOS	20
	A. Universo	20
	B. Muestra	20
	C. Recursos	20
	D. Equipo	20
	E. Reactivos	21
	F. Materiales	22
	G. Metodología	22
	1. Recolecta de fitoplancton	22
	2. Aislamiento y purificación de microalgas	24
	3. Preparación de medio de cultivo para microalgas	24
	4. Siembra de muestras	25
	5. Evaluación de la efectividad de los medios	27

	6. Analisis estadístico	27
VII.	RESULTADOS	28
VIII.	DISCUSION DE RESULTADOS	32
IX.	CONCLUSIONES	35
X	RECOMENDACIONES	36
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37

I. AMBITO DE LA INVESTIGACION

Como parte del proyecto de investigación que se lleva a cabo en la escuela de Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, que pretende la determinación de algas marinas como potencial materia prima para la producción de biodiesel, en este estudio se aislaron las especies de microalgas: *Odontella aurita*; *Coscinodiscus granii*; *Nitzschia sp.*; *Bacillaria*; *Scenedesmus vacuolatus*, mediante la técnica de micromanipulación, a partir de muestras tomadas del mar atlántico de Guatemala. Después de su aislamiento y purificación estas serán utilizadas para la producción de biomasa de las especies, para lo cual se trasladaron los cultivos a mayores volúmenes de medio de cultivo contenido en recipientes de vidrio que permitieron la entrada de luz necesaria para el crecimiento de las algas la cual fue controlada por un temporizador, esto con el propósito de obtener de ellas aceites con potencial para producción de biodiesel. Dicho proyecto de investigación fue financiado por CONCYT, se identifica con el No. 03 – 2009. Esta investigación se realizó en las instalaciones del Edificio T 12 de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

II. RESUMEN

Actualmente en muchos países se buscan fuentes alternativas de producción de combustibles que presenten mayor estabilidad en su precio y disponibilidad, el mayor inconveniente de la producción de biocombustibles es la necesidad de extensiones de tierra lo suficientemente grandes para satisfacer la demanda de los mercados. Por lo que el cultivo de algas para la producción de biodiesel puede ser una alternativa para esta problemática. Guatemala cuenta con una amplia variedad de especies de algas las cuales aun no han sido estudiadas como potencial de producción de biodiesel.

Por lo que en este trabajo evaluó la capacidad de crecimiento de cinco especies de microalgas *Odontella aurita*; *Coccolodiscus granii*; *Nitzschia* sp; *Bacillaria* sp; y *Scenedesmus* sp. en cultivos in-vitro y producción de biomasa de las mismas para posteriormente evaluar su capacidad de producción de aceite como materia prima para la producción de biodiesel.

En el presente estudio se hicieron tomas de muestra por duplicado de diez puntos de muestreo del litoral Atlántico de Guatemala, utilizando una red para fitoplancton. Las muestras se transportaron en cadena de frío para el aislamiento de las cinco especies de interés.

Se hicieron siembras repetidas de *Odontella aurita*; *Coccolodiscus granii*; *Nitzschia* sp; *Bacillaria* sp; y *Scenedesmus* sp. por micromanipulación en medio de cultivo para algas F/2 de Guillard en fase sólida y líquida para evaluar el crecimiento de las mismas en ambas fases, determinándose que la fase líquida favoreció el crecimiento y la reproducción de las microalgas sin embargo todas presentaron crecimiento en el medio sólido, algunas más lento que otras, *Nitzschia* sp y *Scenedesmus* sp. presentaron un buen desarrollo comparado a las otras tres especies en fase sólida.

Por lo tanto se recomienda la fase líquida del medio de cultivo F/2 de Guillard para reproducción de estas cinco especies de microalgas y desarrollo de biomasa de las mismas.

III. ANTECEDENTES

A. Biocarburantes

1. Generalidades:

La demanda energética mundial, representada por los combustibles fósiles se incrementó entre los años 1955 y 2005 en un 450%, trayendo como consecuencia crisis energéticas, la más reciente y que se está viviendo no sólo se refiere a la escasez de los hidrocarburos sino que está relacionada con conflictos bélicos y con el calentamiento global que está produciendo un cambio climático.

Ante la problemática planteada, la ciencia, la tecnología y la innovación juegan un papel sumamente importante, para mejorar el nivel de vida de las sociedades del mundo así como la protección del medio ambiente y por consiguiente minimizar el cambio climático mediante la disminución de la emisión de gases de efecto invernadero. Serán de vital importancia la eficiencia y ahorro energético mediante el uso de equipos y fuentes de energía más eficientes y amigables con el ambiente (García, 2008).

Los biocombustibles hoy día son una de las principales alternativas que la humanidad ha encontrado para mitigar y combatir los daños causados por el uso excesivo de los combustibles fósiles, los cuales han venido generando una mayor contaminación al emplearse en actividades como las del sector transporte, comercial e industrial. En conjunto, estas actividades son fuentes de constante emanación de gases de efecto invernadero, y por ello contribuyen a los problemas de contaminación del aire por reacciones fotoquímicas, del calentamiento global y a las lluvias ácidas presentes en las diferentes metrópolis del mundo (Alvear 2010; Yusuf C. 2007).

La materia prima para la producción de biocombustibles por excelencia es la biomasa, la cual posee en estos momentos una gran popularidad gracias a su renovabilidad, además de generar favorables impactos económicos, sociales y ambientales en los sectores

industrial y doméstico, principalmente. Entre los biocombustibles derivados de la biomasa más comunes se encuentra el bioetanol y el biodiesel, siendo este último el de mayor campo investigativo y aplicativo (Alvear 2010).

2. Tipos de biocombustibles:

- a. **Bioetanol:** Etanol generado a partir de la biomasa o de una fracción biodegradable de residuos.
- b. **Biodiésel:** éster metílico generado a partir de un aceite vegetal, algas o animal de calidad similar al gasóleo.
- c. **Biogás:** combustible gaseoso generado a partir de la biomasa de vegetales y/o a partir de la fracción biodegradable de los residuos.
- d. **Biometanol:** metanol generado a partir de la biomasa de vegetales.
- e. **Biodimetiléter:** dimetiléter generado a partir de la biomasa de vegetales.
- f. **BioMTBE (metil ter-butil éter):** combustible generado a partir del biometanol.
- g. **Biocarburentes sintéticos:** hidrocarburos sintéticos o sus mezclas, generados a partir de la biomasa vegetal.
- h. **Aceite vegetal puro:** obtenido a partir de plantas oleaginosas mediante presión, extracción u otros procedimientos comparables, crudo o refinado, pero sin modificación química (Echeto. 2010).

B. Biodiésel

Uno de los problemas que presenta el biodiesel es su fuente de materias primas; puesto que son productos agrícolas con un mercado muy activo y su cultivo ha empezado a generar un alarmante aumento en la deforestación de los bosques nativos, expansión indiscriminada de la frontera agrícola, desplazamiento de cultivos alimentarios y ganadería, al igual que la destrucción de los ecosistemas y la biodiversidad adyacente al sector de siembra y producción. Sin contar con el desplazamiento de los trabajadores rurales que se ha atribuido a la producción y uso de los biocombustibles consecuencias tales como escasez alimentaria y generación de pobreza (Alvear 2010)

En las plantas se pueden hallar dos tipos de aceites, los esenciales y los fijos, que se diferencian por su función dentro de la planta, sus propiedades físicoquímicas y por la cantidad en la que se encuentran dentro de la misma. El contenido de ácido graso (%), de los aceites mayormente conocido es el siguiente: Mirístico (C14:0) 1.1; Palmítico (C16:0) 42.9; Esteárico (C18:0) 4.6; Oleico (C18:1) 39.3; Linoleico (C18:2) 10.7. (Romero. 2005)

La producción de biodiésel a partir de algas se considera como la forma más eficiente para producir biodiesel. El requisito de la tierra para el cultivo de microalgas para producción de biodiésel es muy pequeño en comparación con otros cultivos. Estudios independientes han demostrado que las algas son capaces de producir 30 veces más aceite por hectárea que los cultivos actuales ya utilizados para la producción de biocombustibles. El biodiésel a partir de algas no contiene azufre, no es tóxico y es altamente biodegradable. Algunas especies de algas son ideales para la producción de biodiesel debido a su alto contenido de aceite, por encima del 50% y tasas de crecimiento muy rápido (Thomas. 2006)

El cultivo de microalgas y la obtención de aceite a partir de este presenta muchas ventajas con respecto a los cultivos terrestres. Por un lado presentan una tasa de crecimiento mucho mayor y por otra lado la producción de aceite por área está estimada entre 4.6 y

18.4 l/m², esto es de 7 a 30 veces mayor que los mayores cultivos terrestres (Echeto. 2010).

La obtención de este combustible se realiza a través de un proceso químico llamado transesterificación. En este proceso los aceites orgánicos son combinados con un alcohol y alterados químicamente para formar éster etílico o metílico, el cual toma el nombre de biodiesel (“Ficha técnica” 2010).

C. Algas

Son un grupo heterogéneo de organismos eucariotes, fotosintéticos, con amplia variedad de formas, tamaño, estructura celular, metabolismo, composición química, ciclos de vida y hábitats (Alarcón, Olivas 2004).

Las algas pueden ser definidas como organismos que realizan fotosíntesis con desprendimiento de oxígeno y que poseen cloroplastos. Algunas de ellas son microorganismos unicelulares, otras son filamentosas, forman colonias o son concéntricas, y otras tienen una estructura semejante a la de una planta, formada a través de un desarrollo multicelular extensivo con poca o ninguna diferenciación de células y tejidos. Contienen orgánulos ricos en clorofila (cloroplastos) y pueden vivir en medios a expensas solo de unos cuantos minerales, CO₂ y luz (Madigan, Martinko, Parquer 2004)

Bajo el concepto de algas se reúnen organismos vegetales muy heterogéneos que comparten características comunes. Dicha heterogeneidad se manifiesta, entre otros, en la variedad de formas, de grupos y de tamaños. A pesar de la gran diversidad de algas, ellas poseen una serie de características propias que las identifican como grupo vegetal, estas son:

- Se consideran plantas talofitas, es decir no poseen raíz, tallo y hojas.
- No desarrollan embrión.
- Son organismos autótrofos, es decir, tienen capacidad de sintetizar su propio alimento (Peña, Palacios, Ospina 2005).

Las algas son fundamentalmente acuáticas y pueden vivir tanto en agua dulce como en agua de mar. También pueden ocupar otros ambientes como el suelo, las rocas, las cortezas de árboles e incluso la nieve. Algunas especies viven asociadas a hongos, constituyendo los líquenes, mientras que otras son simbioses de animales como corales y esponjas (Peña et. al. 2005).

Las algas pueden vivir fijas al sustrato y formar extensos bosques en el agua de mar, como en el caso de las algas gigantes, las que son abundantes en las costas de latitudes templadas. O por otro lado, pueden nadar libremente en la superficie del agua como el fitoplancton, conjunto de algas unicelulares y microscópicas que viven suspendidas en la superficie del agua, cuyo movimiento depende de la acción del oleaje y movimiento del agua (Peña et. al. 2005).

1. Clasificación de las algas

Se pueden clasificar las algas en tres amplios grupos basándose en su pigmentación: pardas (*Pheophyta*), rojas (*Rhodophyta*) y verdes (*Chlorophyta*) (FAO 2004).

La diversidad de formas en las algas obedece a su grado de organización celular y tendencias evolutivas, tanto en sus estructuras del talo o cuerpo como en sus estructuras reproductivas. El grado de organización se puede presentar en varios grupos algales, probablemente como resultado de una evolución paralela. Estos grupos de organización no representan la clasificación de las algas pero sí los tipos de crecimiento en estas plantas:

- a. **Algas unicelulares:** formadas por una sola célula, viven separadas y no hay conexión entre ellas. Usualmente son esféricas o cilíndricas, cada una permanece rodeada de una vaina o cuvilago bien definido. En este grupo se encuentran especies que no presentan motilidad y otras especies que si presentan estructuras para su movimiento como flagelos o vacuolas contráctiles (Peña, et. al. 2005).

Las algas unicelulares se encuentran en los siguientes *Phylum*:

- *Clorophyta* o algas verdes (que también tiene especies pluricelulares).
- *Crysophyta* también se le conoce como algas doradas o diatomeas.
- *Pyrrophyta* son los dinoflagelados, todos unicelulares.
- *Euglenophyta* incluye a todos los euglenas que son unicelulares.

Las algas unicelulares representan un porcentaje notable del fitoplancton de los océanos (y aguas dulces), que es donde se lleva a cabo no menos del 50% del total de la fotosíntesis que se realiza en nuestro planeta. Son muy importantes especialmente las diatomeas, dinoflagelados y clorofitas unicelulares porque son los principales productores de alimentos del ecosistema marino, que es donde se encuentra la principal reserva de alimentos y fuente renovadora de oxígeno de la atmósfera terrestre (Gamma 2004).

- b. Algas coloniales:** sus células se encuentran embebidas en una matriz gelatinosa o unidas por un mucílago. Pueden considerarse como individuos reunidos en agregados puesto que este conjunto no alcanza ninguna diferenciación. Pueden formar distintos tipos y formas agregados como cubo, forma laminar, forma esférica, entre otros (Gamma 2004).
- c. Algas filamentosas:** son multicelulares cuyas células están conformadas por un talo (cuerpo) que se presentan en forma ordenada en filas y unidas después de la división celular mediante paredes comunes. Su crecimiento puede darse de forma intercalar o por la actividad de células localizadas en la parte superior del filamento, llamadas células apicales. Esta es una morfología común en las algas rojas, pardas y algunas especies de algas verde. El nivel filamentoso constituye el tipo más elemental del cuerpo multicelular de las algas (Peña et. al. 2005).
- d. Algas multicelulares de talo complejo:** este tipo de organización es típico en algas y corresponde a un grado evolutivo en algas filamentosas, donde el talo presenta zonas especiales de crecimiento. Esto permite tener diferentes tipos de ramificaciones en el

cuerpo del alga e incluso presentar cierto tipo de pseudo-tejido con cierto grado de especialización (Peña et. al. 2005).

Las algas multicelulares se encuentran en los grupos de los *Phaeophytas* o algas pardas y de los *Rhodophytas*, que también tienen unas cuantas especies unicelulares (Peña et. al. 2005).

2. Importancia biológica de las algas

La importancia biológica de las algas radica en que son los organismos fotosintéticos principales de ríos, lagos y mares, producen oxígeno, materia orgánica y son la base de la cadena alimenticia de los ecosistemas acuáticos (Peña et. al. 2005).

Las algas son por lo tanto los productores primarios de una superficie equivalente al 70% del planeta. Otro hecho biológicamente importante son las relaciones que establecen las algas con otros seres vivos, animales y vegetales (Peña et. al. 2005).

3. Importancia comercial de las algas

La importancia de las algas radica en su utilización como alimento y medicinas. Las algas tienen un alto contenido de carbohidratos y proteínas. En las civilizaciones orientales tradicionalmente se ha reconocido su importancia como alimento para fortalecer la sangre, el corazón y el sistema circulatorio (Peña et. al. 2005).

Las algas almacenan varios productos de reserva, como manitol, almidones, aceites y grasas. Además de la clorofila, las algas poseen otros pigmentos fotosintéticos que son responsables de los colores característicos (Alarcón, Olivas 2004)

Los principales derivados de las algas son los ficocoloides, compuestos orgánicos o polisacáridos de la pared celular de algas rojas y pardas como el agar, carrageno y ácido algínico. Estos productos biológicos tienen una gran aplicación en la industria alimenticia,

farmacéutica, de cosméticos y otras aplicaciones industriales, como la producción de biodiesel (Peña et. al. 2005).

Las diatomeas son un tipo de algas verdes unicelulares sin ningún tipo de flagelo y su principal característica es la presencia de un esqueleto de sílice que rodea la célula y le confiere una dureza especial (Peña et. al. 2005).

Los grandes depósitos de las cubiertas de las diatomeas muertas que se han acumulado por miles de años, llamados “tierras de diatomeas” como son de sílice, tienen aplicaciones comerciales como abrasivos en el pulimento de metales y pasta de dientes, en filtración de líquidos, en el control de temperatura de hornos industriales y como material inerte en la fabricación de dinamita (Gamma 2004).

Actualmente se estudia el potencial de las microalgas para ser utilizadas en acuicultura, farmacología, genética y biotecnología, de allí la importancia de conocer y saber aplicar las técnicas para el cultivo, la purificación y el aislamiento de las microalgas (Barrientos R. C., López S. 2005)

D. Microalgas

Las microalgas están presentes en todos los ecosistemas de la tierra existentes, no sólo acuáticos, sino también terrestres, y representan una gran variedad de especies que viven en una amplia gama de condiciones ambientales. Se estima que existen más de 50.000 especies, pero sólo un número limitado de alrededor de 30.000 han sido estudiados.

Durante las últimas décadas, extensas colecciones de microalgas han sido creadas por investigadores de distintos países, un ejemplo de ello es la colección de microalgas de agua dulce de la Universidad de Coimbra (Portugal) considerado uno de los más grandes del mundo, tiene más de 4,000 cepas y 1,000 especies. Esta colección da testimonio de la gran variedad de microalgas diferentes disponibles para ser seleccionados para su uso en una amplia diversidad de aplicaciones (Caetano et. al. 2009)

1. Ventajas del cultivo de Microalgas para la producción de biodiesel

Las microalgas se reproducen utilizando la fotosíntesis, es decir convierten la energía solar en energía química, completando un ciclo de crecimiento cada pocos días. Además, pueden crecer casi en cualquier lugar, lo que requieren es la luz solar y algunos alimentos simples, aunque las tasas de crecimiento se pueden acelerar mediante la adición de determinados nutrientes y aireación suficiente. Las diferentes especies de microalgas pueden adaptarse para vivir en una gran variedad de condiciones ambientales. Por lo tanto, es posible encontrar las mejores especies adaptadas a los entornos locales o de las características específicas de crecimiento, que no se puede hacer con otras materias primas de biodiesel actual (por ejemplo, aceite de soja, colza, girasol y palma). Las microalgas tienen mayores tasas de crecimiento y productividad en comparación con el sector forestal convencional, los cultivos agrícolas, y requieren áreas de tierra menores que otras materias primas de origen agrícola, hasta 49 a 132 veces menos que en comparación con los cultivos de colza o soja, por un 30% (v/v) de aceite contenido en la biomasa de algas. Por lo tanto, la competencia por tierras cultivables con otros cultivos, en particular para el consumo humano, se reduce considerablemente. Las microalgas pueden proporcionar materia prima para diferentes tipos de combustibles renovables como el biodiesel, metano, hidrógeno, etanol, entre otros (Caetano et. Al. 2009).

La utilización de microalgas para la producción de biocombustibles también puede servir a otros fines. Algunas de las posibilidades que actualmente se están considerando son enumerados a continuación.

- La eliminación de CO₂ por los gases de combustión industriales mediante la biofijación por microalgas.
- La reducción de las emisiones de gases del efecto invernadero por una empresa mientras se produce biodiesel.
- Eliminación de amoníaco, nitrato, y fosfato, mediante el tratamiento de aguas residuales con algas., puesto que estos pueden ser utilizados como nutrientes por las algas y luego de la extracción de aceites para producción de biodiesel, la biomasa puede ser procesada en etanol, metano, alimento para ganado.
- Por la combinación de su capacidad para crecer en condiciones mas duras, y sus requerimientos nutricionales pueden ser cultivadas en las zonas no aptas para la agricultura, independientemente de los cambios estacionales del tiempo, por lo tanto no compiten con las tierras de uso para cultivo. En la tabla 1 se presenta una comparación de producción de aceites a partir de diferentes especies de microalgas, entre ellas diferentes especies de *Scenedesmus* y *Nitzschia* sp.
- Pueden utilizarse aguas residuales como medio de cultivo, no requieren específicamente del uso de agua dulce.
- Comparado con otras fuentes de aceites para producción de biodiesel, puede obtenerse mayor cantidad de este producto en menor tiempo con el uso de cultivos de microalgas, como se muestra en la tabla 2 (Caetano et. al. 2009)

Tabla No. 1

Contenido de aceites y productividad en diferentes especies de microalgas

Marine and freshwater microalgae species	Lipid content (% dry weight biomass)	Lipid productivity (mg/L/day)	Volumetric productivity of biomass (g/L/day)	Areal productivity of biomass (g/m ² /day)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24.0–31.0	–	–	11.5–17.4
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0–75.0	–	0.02	3.0
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	21.8	0.07	–
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6–16.4/39.8	17.6	0.04	–
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0–63.0	10.3–50.0	0.036–0.041	0.91–0.97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6–57.8	1214	2.00–7.70	–
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0–22.0	44.7	0.23–1.47	–
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0–58.0	11.2–40.0	0.02–0.20	0.57–0.95
<i>Chlorella</i> sp.	10.0–48.0	42.1	0.02–2.5	1.61–16.47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0	–	2.90–3.64	72.5/130
<i>Chlorella</i>	18.0–57.0	18.7	–	3.50–13.90
<i>Chlorococcum</i> sp.	19.3	53.7	0.28	–
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20.0–51.1	–	10	–
<i>Dunaliella salina</i>	6.0–25.0	116.0	0.22–0.34	1.6–3.5/20–38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1	–	0.09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7–71.0	–	0.12	–
<i>Dunaliella</i> sp.	17.5–67.0	33.5	–	–
<i>Ellipsoidium</i> sp.	27.4	47.3	0.17	–
<i>Euglena gracilis</i>	14.0–20.0	–	7.70	–
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	–	0.05–0.06	10.2–36.4
<i>Isochrysis galbana</i>	7.0–40.0	–	0.32–1.60	–
<i>Isochrysis</i> sp.	7.1–33	37.8	0.08–0.17	–
<i>Monodus subterraneus</i>	16.0	30.4	0.19	–
<i>Monallanthus salina</i>	20.0–22.0	–	0.08	12
<i>Nannochloris</i> sp.	20.0–56.0	60.9–76.5	0.17–0.51	–
<i>Nannochloropsis oculata</i> .	22.7–29.7	84.0–142.0	0.37–0.48	–
<i>Nannochloropsis</i> sp.	12.0–53.0	37.6–90.0	0.17–1.43	1.9–5.3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0–65.0	90.0–134.0	–	–
<i>Nitzschia</i> sp.	16.0–47.0	–	–	8.8–21.6
<i>Oocystis pusilla</i>	10.5	–	–	40.6–45.8
<i>Pavlova salina</i>	30.9	49.4	0.16	–
<i>Pavlova lutheri</i>	35.5	40.2	0.14	–
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.0–57.0	44.8	0.003–1.9	2.4–21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9.0–18.8/60.7	34.8	0.36–1.50	25
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0–55.0	–	0.004–0.74	–
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9–18.4	35.1	0.19	–
<i>Scenedesmus</i> sp.	19.6–21.1	40.8–53.9	0.03–0.26	2.43–13.52
<i>Skeletonema</i> sp.	13.3–31.8	27.3	0.09	–
<i>Skeletonema costatum</i>	13.5–51.3	17.4	0.08	–
<i>Spirulina platensis</i>	4.0–16.6	–	0.06–4.3	1.5–14.5/24–51
<i>Spirulina maxima</i>	4.0–9.0	–	0.21–0.25	25
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20.6	17.4	0.08	–
<i>Tetraselmis suecica</i>	8.5–23.0	27.0–36.4	0.12–0.32	19
<i>Tetraselmis</i> sp.	12.6–14.7	43.4	0.30	–

Fuente: Caetano S., Mata T., Martins A., 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications. Faculty of Engineering. University of Porto, Editorial Elsevier. Portugal

Tabla 2

Comparación de microalgas con otras fuentes de biodiesel

Plant source	Seed oil content (% oil by wt in biomass)	Oil yield (L oil/ha year)	Land use (m ² year/kg biodiesel)	Biodiesel productivity (kg biodiesel/ha year)
Corn/Maize (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soybean (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola/Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Castor (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Palm oil (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalgae (low oil content)	30	58,700	0.2	51,927
Microalgae (medium oil content)	50	97,800	0.1	86,515
Microalgae (high oil content)	70	136,900	0.1	121,104

Fuente: Caetano S., Mata T., Martins A., 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications. Faculty of Engineering. University of Porto, Editorial Elsevier. Portugal

E. Cultivo de Algas

Muchos de los métodos que se utilizan hoy en día para el cultivo de algas fueron desarrollados a finales de 1800 y principios de 1900. Los métodos para el cultivo de algas han sido descritos en muchos libros y artículos (Andersen R. A., Preising H. R. 2005).

El primer reporte de cultivo puro de algas data desde 1890 cuando el microbiólogo Beijerick, adaptó técnicas bacteriológicas introducidas por Robert Koch 10 años antes y mezclando la muestra de agua con el medio de cultivo con gelatina. Beijerinck (1890-1893) fue el primero en aislar y obtener cultivos de *Clorella* y *Scenedesmus*,

supuestamente libres de bacterias, después también obtuvo cultivos supuestamente puros de otras especies de algas, incluyendo cianobacterias y diatomeas. (Andersen R. A., Preising H. R. 2005)

Igual de importante fueron las aportaciones de Miquel (1890/92, 1892, 1892/93/98), primer microbiólogo en aislar y establecer cultivos puros de diatomeas de agua dulce y marina. Además al introducir el uso de nuevos métodos, como el uso de micropipeta para aislar algas unicelulares, el uso de maceración orgánica como suplemento de origen orgánico al medio mineral. Usando micropipetas y microscopio aisló células individuales y las colocó en recipientes que contenían el medio de cultivo mineral enriquecido para obtener así sus cultivos puros (Andersen R. A., Preising H. R. 2005).

En el siglo XX se dieron importantes contribuciones al estudio de las microalgas, los métodos de purificación, aislamiento y cultivo de ellas (Andersen R. A., Preising H. R. 2005).

El descubrimiento de la penicilina, estreptomicina y otros antibióticos rápidamente dio lugar a la aplicación en los cultivos para actuar contra las bacterias. Algunos reportes de cultivos axénicos de algas usando antibióticos incluyen a Goldweig-Shelubsky (1951), quien obtuvo cultivos libres de bacterias de *Scenedesmus*, *Navicula* y *Euglena* siguiendo el tratamiento con penicilina. Spenser (1952), se dedicó a la purificación de *Phaeodactylum* y Reich y Kahn (1954) a la de *Primnesium parvum*. Droop en 1967 proporcionó un nuevo método que vino a sumarse al tratamiento con antibióticos para el cultivo de algas (Andersen R. A., Preising H. R. 2005).

1. Medio de cultivo marino para algas

El agua de mar es un medio complejo que contiene un largo y variable número de componentes orgánicos, por lo que puede ser usada para el cultivo de algas en laboratorio si se le adicionan soluciones de enriquecimiento de nutrientes, metales traza y vitaminas (Harrison 2005).

2. Tipos de algas que se cultivan para producir biodiésel

Las algas están compuestas básicamente por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y ácidos grasos. Los ácidos grasos se encuentran en las membranas, en los productos de almacenamiento, metabolitos, etc. El porcentaje de ácidos grasos varía según la especie, aunque hay especies cuyos ácidos grasos representan el 40% de su peso seco. Estos son los ácidos grasos que luego son convertidos en biodiésel. Para la producción de estos se buscan algas que contengan un alto contenido en lípido y que sean fácilmente cultivables (Echeto 2010)

- *Scenedesmus dimorphus*: Esta es una de las preferidas por el alto rendimiento de aceites para biodiésel, pero uno de los problemas es que produce gruesos sedimentos si al cultivo no se lo agita con frecuencia.
- *Dunaliella tertiolecta*: Esta cepa produce cerca de 37 % de aceites. Es una cepa que crece rápido lo que significa que tiene una alta tasa de absorción de CO₂.
- *Bacilliarophyta*: (diatomea) Es una de las favoritas para este fin. El problema es que necesita silicona en el agua, mientras que las Clorofita necesitan nitrógeno para crecer.
- *Chlorofita*: Algas verdes tienden a producir almidón, en vez de lípidos. Tienen tasas de crecimiento muy altas a 30 °C con alta intensidad de la luz (Echeto. 2010).

Se han realizado importantes estudios sobre la producción de biodiesel a partir de microalgas alrededor del mundo. En el estudio "Obtención y comparación de los aceites de microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella nativ*", realizado en Cartagena en el año 2010 se resalta los niveles bajos de ácidos grasos libres con relación a las propiedades de los aceites obtenidos. Lo cual permite producir un mayor rendimiento de biodiesel al presentarse un menor producción de glicerol en el proceso de transesterificación (Alvear 2010).

En Guatemala los estudios actuales se han enfocado al estudio de la especie *Hydrilla verticillata* y a la calidad del agua en diferentes puntos como los conducidos por la Autoridad para el Manejo Sostenible de la Cuenca del Lago de Izabal –AMASURLI, y por proyectos de investigación del Departamento de Análisis Inorgánico de la Universidad de San Carlos (Dix et al, 1999; Bol, 2002 y Herrera, 1999). Los estudios marinos para las costas guatemaltecas se han enfocado a estudios de pesquerías y ecología marina (Cazali, 1998; Arrivillaga et al, 2004; Fonseca et al, 2003; Prado, 1990 y Torrentera et al 1989). Un estudio en el Océano Atlántico guatemalteco reportó la presencia de 20 especies pertenecientes a 15 géneros de algas verdes (Cuevas, 1984).

El centro de Estudios del Mar y Acuicultura de la Universidad de San Carlos de Guatemala ha establecido un laboratorio para el aislamiento y cultivo de microalgas. El enfoque básico de este laboratorio es el cultivo de especies con aplicaciones en la acuicultura, como la producción de alimento vivo para la crianza de peces, moluscos y crustáceos. Se han realizado estudios sobre diversidad de microalgas marinas en las costas de los océanos Pacífico y Atlántico, comportamiento de la marea roja entre otros, pero la investigación en relación al uso de la biomasa de microalgas para la producción de biocombustibles se encuentra en una fase de iniciación en el país y requiere ser evaluada biológica, ecológica, económica y socialmente previo a ser implementada una tecnología de producción de masa.

En Guatemala se tiene la experiencia de trabajos para producción de biocombustibles. La empresa Guatebiodiesel se dedica a la producción e investigación de biocombustibles en Guatemala.

En el proyecto FODECYT 43-2007 se realizaron muestreos en todo el litoral Atlántico con la intención de identificar las diferentes cepas de microalgas presentes. En este proyecto se aislaron, purificaron e identificaron cepas de microalgas del Litoral Atlántico del País, cuatro de estas especies con gran potencial para tecnificar su cultivo. (FODECYT 43-2007)

IV. JUSTIFICACION

La problemática energética mundial, obliga a países subdesarrollados como el nuestro a buscar fuentes alternativas de combustibles que presenten mayor estabilidad en su precio y disponibilidad por lo que el desarrollo de biocombustibles es imprescindible. El mayor inconveniente lo representa el hecho de que se requieren grandes extensiones de tierra para satisfacer la demanda del mercado local, y Guatemala no debe perder la biodiversidad de plantas para darle lugar al desarrollo de monocultivos. Es por ello que el cultivo de microalgas puede representar en el futuro una alternativa que resuelva parcialmente los problemas de inestabilidad en los precios de los derivados del petróleo.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Desarrollar la biomasa de las especies de microalgas *Odontella aurita*; *Cocsinodiscus granii*; *Nitzchia sp*; *Bacillaria sp*; *Scenedesmus sp.* para la producción de biodiesel.

B. Específicos

1. Aislar e identiicar las especies de microalgas *Odontella aurita*; *Cocsinodiscus granii*; *Nitzchia sp*; *Bacillaria sp*; *Scenedesmus sp.* mediante micromanipulación.
2. Cultivar microalgas en fase líquida y sólida para aumento de biomasa.
3. Describir el crecimiento de las especies de microalgas *Odontella aurita*; *Cocsinodiscus granii*; *Nitzchia sp*; *Bacillaria sp*; *Scenedesmus sp.* en medio de cultivo para algas F/2 de Guillard en fase líquida y sólida.
4. Comparar el crecimiento de las diferentes especies de microalgas en el medio de cultivo en fase sólida y líquida

VI. MATERIALES Y METODOS

A. Universo: Microalgas presentes en el Litoral Atlántico de Guatemala

B. Muestra: Fitoplancton de 10 puntos de muestreo en el Litoral Atlántico de Guatemala.

C. Recursos

1. Recursos humanos

Investigadora: Rode Aida Ruiz Morales: Investigadora

Asesores: Lic. Erick Giovany Estrada: Asesor

Licda. Ana Lucia Mazariegos: Asesora

2. Recursos Institucionales

La parte experimental se llevará a cabo en el edificio T-12 en el departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, a demás se realizará en las instalaciones del BIOTERIO de dicha facultad.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

D. Equipo:

- i. Filtro de manta para fitoplancton
- ii. Pipetas calibradas de 1, 2, 5, 10, 25 ml
- iii. Microscopio invertido
- iv. Campana de flujo laminar
- v. Mechero
- vi. Bombas de oxígeno para pecera

E. Reactivos:

- i. Lugol al 1%
- ii. NaNO_3 , 75g. para 1 litro de solución stock ($8.82 \times 10^{-4} \text{M}$)
- iii. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 gr, para 1 litro de solución stock ($3.62 \times 10^{-5} \text{M}$)
- iv. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 30 gramos para 1 litro de solución stock ($1.06 \times 10^{-4} \text{M}$)
- v. Solución de metales trasa
 - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1.17 \times 10^{-5} \text{M}$)
 - $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1.17 \times 10^{-5} \text{M}$)
 - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($9.10 \times 10^{-7} \text{M}$)
 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($7.65 \times 10^{-8} \text{M}$)
 - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($4.21 \times 10^{-8} \text{M}$)
 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($3.93 \times 10^{-8} \text{M}$)
 - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($2.60 \times 10^{-8} \text{M}$)
- vi. Solución de vitaminas
 - Thiamina . HCL ($2.96 \times 10^{-7} \text{M}$)
 - Biotina ($2.5 \times 10^{-9} \text{M}$)
 - Cyanocobalamina ($3.69 \times 10^{-10} \text{M}$)
- vii. Antibióticos
 - Penicilina G
 - Sulato de dihidroestreptmicina
 - Sulfato de gentamicina

F. Materiales:

- i. Frascos plásticos estériles de 500 ml.
- ii. 3 marcadores permanentes color negro
- iii. Pipetas Pasteur de 3 ml.
- iv. Asas bacteriológicas en punta
- v. Asas bacteriológicas en argolla
- vi. Agua de mar filtrada 200 Litros
- vii. Frascos de vidrio estériles de 500 ml.
- viii. Cajas de petri estériles
- ix. agar-agar
- x. Tubos de ensayo de 15 ml.
- xi. Capilares sin heparina
- xii. Mangueras de 1mm de diámetro interno
- xiii. Láminas portaobjetos
- xiv. Tubos de ensayo con 10ml de medio f/2 de Guillard líquido.
- xv. Tubos de ensayo con 10ml de medio F/2 de Guillard en slant.
- xvi. Manguera para aireación

G. Metodología

1. Recolecta de fitoplancton

- a. Se usaron redes para la filtración *in situ* del plancton, consistentes en una red de forma cónica que lleva un recipiente colector en su extremo más delgado. Se recolectaron las muestras desplazando las mismas en una trayectoria horizontal mientras el agua se filtra a través de la malla.
- b. Se concentraron los organismos retenidos en la malla en el recipiente terminal que cuenta con una red de fitoplancton con una porosidad de 20 micras.
- c. Se tomaron dos muestras por cada punto, manteniendo el filtro bajo la superficie del agua alrededor de 10 minutos.

- d. Se realizaron tomas de muestras en diez puntos diferentes en el mar Atlántico de Guatemala.
- e. Las muestras fueron refrigeradas una muestra con lugol y en frasco oscuro de 2 – 8°C, por tiempo indefinido para observar las estructuras de las especies.
- f. Se refrigeraron muestra en fresco de 2 a 8 °C por un período menor a 48 horas para ser procesadas.
- g. Se observaron al microscópio las muestras para Identificar especies de microalgas presentes en las mismas, mediante claves dicotómicas.



Figura No. 1 Toma de muestras en Litoral Atlántico de Guatemala.

2. Aislamiento y purificación de microalgas

Se preparó medio de cultivo para algas F/2 de Guillard

- a. Se filtro agua de mar, con una red de filtración que permitió eliminar los residuos o materia orgánica de mayor tamaño que tuviera el agua,
- b. Se colocó 1 ml de cada solución (solución de macro y micronutrientes) por cada litro de medio F/2 de Guillard que se preparó,
- c. Se esterilizó el medio de cultivo mediante el uso de autoclave: dejando 15 minutos a 121°C a una presión de 103 KPa.
- d. Se agregaron la solución de antibióticos y vitaminas cuando el medio estuvo a 25°C la solución stock se preparó previamente de la siguiente manera: a 950ml de H₂O destilada se le agrega 200mg de Tiamina . HCL mas 1g de biotina y cyanocobalamina. Agregar 1 ml de solución stock por litro de medio de cultivo.

3. Preparar medio de cultivo para algas F/2 de Guillard en fase sólida

- a. Se preparó el medio de cultivo líquido.
- b. Se colocó en la estufa a una temperatura moderada y se agregaron 10 g de agar-agar por litro de medio de cultivo, se prepararon 1700 ml de agar. en tres lotes diferentes.
- c. Se agito mediante agitador magnético y se esperó a que el agar estuviera disuelto por completo.
- d. Se trato en autoclave 15 minutos a 121 °C, a una presión de 103 KPa se agregó la solución stock de vitaminas y antibióticos, se sirvió en cajas de petri plásticas.
- e. Se hizo un control de esterilidad por cada lote de medio de cultivo en fase sólida.

4. Siembra de muestras en medio de cultivo para algas F/2 de Guillard:

- a. Tomando una alícuota de 1 ml de cada muestra se sembró por duplicado en frascos de medio F/2 de Guillard.
- b. Se colocaron los frascos con aireación y expuestos a la luz que fue controlada por temporizadores hasta observar crecimiento en los mismos.
- c. Cuatro semanas después fueron analizadas muestras a partir de las diez muestras originales para determinar la presencia de las cinco especies de interés en condiciones de laboratorio.
- d. Por micromanipulación se extrajeron las 5 especies de microalgas en estudio a partir de las muestras originales y fueron colocadas individualmente en tubos que contenían 15 ml de medio de cultivo estéril. Se sembraron 20 tubos de cada especie.
- e. Se sembraron 20 cajas de medio de cultivo solido por cada especie, 10 de ellas por micromanipulación y 10 de ellas por estriación a partir de los cultivos puros contenidos en tubos de ensayo de 15 ml, descrito en el inciso anterior.



Figura No. 2 Siembra cinco especies de microalgas en tubos de ensayo de 15 ml y en cajas de petri de medio de cultivo para microalgas F/2 de Guillard

- f. Se observo el crecimiento de las microalgas en medio líquido y sólido.
- g. Se sembraron cultivos de microalgas purificadas y aisladas en frascos de medio líquido con mayor volumen para aumentar biomasa.



Figura No. 3 Siembra de microalgas frascos de mayor volumen de medio de cultivo a partir de cultivos en placa y en tubo de ensayo de 15 ml.

5. Evaluación de la efectividad de los medios.

La evaluación de la efectividad del medio de cultivo se realizó mediante la observación contante de los medios de cultivo, mediante el uso de microscopio invertido pudo observarse contantemente el desarrollo de biomasa dentro de los tubos de ensayo. Y mediante la observación de muestras se pudo determinar el aumento contante del número de microalgas que fueron sembradas por micromanipulación.

El crecimiento de microalgas en medio de cultivo en fase sólida pudo determinarse mediante la observación de colonias aisladas de microalgas.

6. Análisis estadístico

Análisis estadístico descriptivo.

Muestra: *Odontella aurita*; *Coocidinodiscus granii*; *Nitzschia sp.*, *Bacillaria*, *Senedesmus vacuolatus*, obtenidas mediante muestreo con filtro para fitoplancton en 10 puntos de muestreo en el litoral Atlántico de Guatemala.

Diseño de muestreo: Se tomaron 2 muestras de cada punto de muestreo con filtro para fitoplancton colocado a 50 cm de profundidad, que fueron transportadas en cadena de frío para su análisis.

Se hicieron repeticiones de siembras de cultivo de las cinco especies de microalgas de forma individual en fase sólida y líquida del medio de cultivo para microalgas F/2 de Guillard y se observó el crecimiento de las algas en ambas fases para determinar que fase es efectiva para la producción de biomasa, mediante el método descriptivo, teniendo como variables el crecimiento y no crecimiento de microalgas en el medio de cultivo F/2 de Guillard.

Se hicieron 20 réplicas de siembras individuales de las 5 especies de microalgas en las dos fases del medio de cultivo.

VII. RESULTADOS

Luego de obtener muestras por duplicado de 10 puntos de muestreo del litoral Atlántico de Guatemala, estas fueron transportadas par ser analizadas e identificar las especies de microalgas contenidas en las mismas. Logrando identificar alrededor de 15 especies distribuidas en todas las muestras.

Tabla No. 3 Especies de microalgas encontradas en 10 puntos de muestreo en el litoral Atlántico de Guatemala.

No. De muestra	Especies de microalgas encontradas encontradas
1	<i>Tetraselmis sp.</i> <i>Bacillaria sp.</i> <i>Coscinodiscuss granii</i> , <i>Coscinodiscuss radiatus</i> , <i>Nannochloris sp.</i> , <i>Ceratium furca</i> , <i>Ceratium horridum</i> , <i>Ceratium fusus</i> , <i>Navicula sp.</i> <i>Chaetoceros sp.</i>
2	<i>Scenedesmus vacuolatus</i> , <i>Melosira sp.</i> ; <i>Navicula sp.</i> ; <i>Coscinodiscuss radiatus</i> ; <i>Ceratium furca</i> ; <i>Pediastrum dúplex</i> ; <i>Chaetoceros sp.</i>
3	<i>Tetraselmis sp.</i> <i>Navicula sp.</i> <i>Melosira sp.</i> <i>Ceratium furca</i> ; <i>Bacillaria sp.</i> ; <i>Coscinodiscuss radiatus</i> ; <i>Coscinodiscussgranii</i> ; <i>Chorella sp.</i>
4	<i>Thalassionema pseudonitzschioides</i> , <i>Melosira sp.</i> <i>Navicula sp.</i> ; <i>Coscinodiscuss radiatus</i> ; <i>Ceratium sp.</i> ; <i>Coscinodiscuss granii</i> ; <i>Chaetoceros sp.</i>
5	<i>Clorella sp.</i> ; <i>Bacillaria sp.</i> ; <i>Ceratium sp.</i> ; <i>Tetrasemis sp.</i> <i>Thalassionema sp.</i> ; <i>Navicula sp.</i> ; <i>Nannochloris sp.</i> ; <i>Odontella aurita</i> ; <i>Chaetoceros sp.</i>
6	<i>Odontella aurita</i> , <i>Navicula sp.</i> ; <i>Ceratium furca</i> ; <i>Coscinodiscuss radiatus</i> ; <i>Coscinodiscuss granii</i> ; <i>Nitzchia sp.</i> ; <i>Melosira sp.</i> ; <i>Tetrasemis sp.</i> ; <i>Thalasionema sp.</i>
7	<i>Nannochloris sp.</i> <i>Coscinodiscuss Radiatus</i> ; <i>Tetraselmis sp.</i> ; <i>Ceratium sp.</i> <i>Coscinodiscuss granii</i> ; <i>Scenedesmus vacuolatus</i> ; <i>Nannochloris sp.</i> ; <i>Melosira sp.</i>
8	<i>Odntella longicuris</i> , <i>odontella aurita</i> , <i>Pediastrum dúplex</i> , <i>Thalassionema pseudonitzschioides</i> ; <i>Ceratium sp.</i> ; <i>Melosira sp.</i> ; <i>Navicula Sp.</i> ; <i>Chaetoceros sp.</i> ; <i>Tetrasemis sp.</i> ; <i>Coscinodiscuss granii</i> ;
9	<i>Pediastrum dúplex</i> , <i>Melosira sp.</i> ; <i>Nitzchia sp.</i> ; <i>Nannochloris sp.</i> . <i>Tetraselmis sp.</i> ; <i>Coscinodiscuss radiatus</i> ; <i>Coscinodiscuss granii</i> ; <i>Bacillaria sp.</i> <i>Odontella longicuris</i> ;
10	<i>Chlorella sp.</i> ; <i>Coscinodiscuss granii</i> <, <i>Chaetoceros sp.</i> ; <i>Ceratium furca</i> ; <i>Odontella aurita</i> , <i>Melosira sp.</i> <i>Scenedesmus vacuolatus</i> ; <i>Navicula sp.</i> ; <i>Nannochloris sp.</i> ;

Fuente: Datos experimentales

Luego de haber identificado las especies contenidas en las diez muestras, se aislaron las cinco especies de interés para este estudio *Odontella aurita*; *Coccolodiscus granni*; *Nitzschia sp.*; *Bacillaria sp.*; *Scenedesmus vacuolatus*, por el método de micromanipulación que fueron colocadas de forma individual en tubos de ensayo de 15 mL de medio de cultivo para microalgas, de los cuales se obtuvo un crecimiento de cuatro de las especies en estudio, siendo la microalga *Nitzschia sp.* la que no se desarrolló en estas condiciones.

Tabla No. 4 Crecimiento de 5 especies de microalgas en medio de cultivo en fase líquida. (tubos de ensayo de 15 ml, medio de cultivo F/2 de Guillard) 10 réplicas por especie.

Microalga	Crecimiento en tubo de medio de cultivo F/2 de Guillard	No crecimiento en tubo de medio F/2 de Guillard
<i>Coccolodiscus granni</i>	X	
<i>Odontella aurita</i>	X	
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	X	
<i>Nitzschia sp.</i>		X
<i>Bacillaria sp.</i>	X	

Fuente: Datos experimentales.

A partir de estos cultivos puros de microalgas se inocularon cantidades mayores de medio de cultivo, que fueron colocadas con aireación e iluminación controladas para la obtención de biomasa, las cinco especies crecieron y permitieron aumentar el volumen de cultivo cada vez.

A demás de sembrar las cinco especies de microalgas en medio de cultivo F/2 de Guillard en tubo, también se sembraron en caja de petrí. Se hicieron 10 siembras en caja de petri por micromanipulación a partir de muestras originales y 10 por estriación a partir de cultivos puros en tubo de ensayo, del paso anterior.

De esto se obtuvo que la especie de microalga *Coscinodiscus granii* no creció en medio de cultivo F/2 de Guillard en fase sólida, y por el método de micromanipulación únicamente *Odontella aurita* y *Scenedesmus vacuolatus* pudieron ser aisladas y cultivadas en placa.

Tabla No. 5 Cultivo de cinco especies de microalgas en fase sólida de medio de cultivo F/2 de Guillard.

Microalga	Crecimiento en placa de medio de cultivo F/2 de Guillard por micromanipulación	Crecimiento en placa de medio de cultivo F/2 de Guillard por estriación
<i>Coscinodiscus granii</i>	No	No
<i>Odontella aurita</i>	Si	Si
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Si	Si
<i>Nitzchia sp.</i>	No	Si
<i>Bacillaria sp.</i>	No	Si

Fuente: Datos experimentales

Scenedesmus vacuolatus presento un crecimiento en fila alineado muy ordenado, que lleno la totalidad de la placa de agar, pero solamente la superficie de la misma

Odontella aurita y *Nitzchia sp* se desarrollaron formando colonias grandes, de color café.

Bacillaria solo se desarrollo en placa a partir de cultivos puros, creció en forma de colonias planas, de color café adheridas al medio de cultivo y las microalgas se encontraban agrupadas.

No fue posible el crecimiento de *coscinodiscus granii* en placa.

Cuatro semanas después de haber sembrado las muestras originales en medio de cultivo líquido se observaron al microscopio buscando la presencia de las cinco especies de interés en condiciones de laboratorio, es decir con aireación y luz controladas. Las especies en estudio aun se encontraban en algunas muestras, como se describe en la siguiente tabla.

Tabla No. 6. Especies de algas en estudio que se encuentran aun en cultivos originales bajo condiciones controladas de luz y aireación, cuatro semanas después de haber sido sembradas.

<div style="text-align: center;">Especies en estudio</div> <div style="text-align: left;">No. De muestra</div>	<i>Odontella aurita</i>	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	<i>Bacillaria sp.</i>	<i>Navicula sp.</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>
Muestra 1			X	X	X
Muestra 2		X		X	
Muestra 3			X	X	
Muestra 4					X
Muestra 5	X		X		
Muestra 6	X			X	X
Muestra 7		X			
Muestra 8	X			X	
Muestra 9			X	X	
Muestra 10	X				X

Fuente: Datos experimentales.

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

La gran variedad y versatilidad de los organismos fotosintéticos y de sus productos suministran las bases para el desarrollo de sistemas bioconvertidores de energía solar de alta eficacia complementarios y/o alternativos a los ya explotados sistemas en agricultura para la generación de diferentes productos de interés. Las microalgas constituyen uno de los sistemas considerados actualmente como fuente de energía, estas al ser organismos unicelulares o pluricelulares capaces de funcionar de forma independiente, realizando todas las funciones vitales, pudieron ser cultivadas en condiciones invitro.

Las algas convierten eficientemente la energía solar en energía química empleando el agua como donador inicial de electrones y los bioelementos primordiales oxidados (carbono, nitrógeno y azufre) como aceptores terminales. Las microalgas planctónicas son responsables de más del 40 por ciento de la fotosíntesis que se lleva a cabo en la tierra. El medio de cultivo para microalgas utilizado en este estudio contiene nutrientes básicos (macronutrientes: nitrógeno, amoníaco, fosforo y Silicio; y metales traza: zinc, manganeso, molibdeno, cobalto, cobre y el hierro) para el adecuado desarrollo de las microalgas (Harrison 2005).

Se realizó un muestreo en 10 puntos del litoral Atlántico de Guatemala, del cual se obtuvieron alrededor de 15 especies de microalgas entre ellas las cinco especies de interés para este estudio *Odontella auirta*; *Cocsinodiscus granii*; *Nitzchia sp*; *Bacillaria sp*; y *Senedesmus vacuolatus*, (Tabla No. 3) las cuales fueron aisladas por micromanipulación y cultivadas utilizando medio de cultivo para microalgas F/2 de Guillard en fase líquida y solida, el cual fue preparado y esterilizado previo a su uso. Se sembraron 20 réplicas de cada microalga en las dos fases del medio de cultivo y se observó el crecimiento de las mismas.

La mayoría de Diatomeas hacen fotosíntesis y presentan clorofila a, clorofila c, y pigmentos accesorios como B-caroteno, fucoxantina, diadinoxantina, diatoxantina. Las

sustancias de reserva son gotas lipídicas y un hidrato de carbono soluble. Algunas diatomeas son capaces de vivir en medios donde llega poca luz, y en donde hay altas concentraciones de materia orgánica. En las tablas 4 y 5 se muestra la capacidad de las diferentes diatomeas en estudio *Odontella aurita*, *Bacillaria sp.*, *Cosciniscus granii* y *Nitzschia sp.* para vivir y desarrollarse en el medio de cultivo líquido y sólido.

Entre los diversos factores a considerar en el cultivo de microalgas se tienen la densidad celular y la agitación. (Guerrero y Loscada 1991). El crecimiento de las microalgas se encuentra limitado por la luz, por lo que la densidad es muy importante, así como la agitación del mismo, puesto que permite la rotación de las microalgas a la exposición a la luz, al encontrarse estáticas frente a la luz como sucedió en los cultivos en tubo de ensayo estos tres factores estuvieron limitados, sin embargo se obtuvo un buen resultado en las especies de diatomeas en estudio no así *Scenedesmus vacuolatus* ver tabla No. 4. *Scenedesmus* es un alga verde que suele vivir en aguas estancadas o de curso lento, aunque a veces vive aislada. Lo más frecuente es que se asocie a otras hermanas de generación dando lugar a formaciones que casi siempre tienen un número de individuos constante y una forma característica para cada especie (Tomas 1997). Debido a esto fue posible el crecimiento de esta especie en placa sin ningún problema.

En la tabla No. 6 se puede observar que los cultivos que provienen de las muestras originales y que se mantuvieron con aireación e iluminación controlada conservan las especies de interés.

El medio de cultivo F/2 de Guillar resultó ser efectivo para el crecimiento de las cinco especies en estudio dependiendo de los requerimientos de iluminación densidad y movimiento específico para cada especie se observó la efectividad de las dos fases del medio.

IX. CONCLUSIONES

1. Las cinco especies de interés en este estudio se encuentran distribuidas en el Litoral Atlántico de Guatemala, con un predominio de especies pertenecientes a la clase Bacillariophyceae o diatomeas.
2. Las Diatomeas son algas que tienen gran capacidad de sobrevivir a condiciones de poca luz y con altas concentraciones de materia orgánica, por lo tanto en condiciones de laboratorio que podrían ser desfavorables para el crecimiento de otras especies de microalgas estas se desarrollaron de buena manera.
3. *Senedesmus Vacuolatus* es una Cloroficea que se desarrolla en presencia de luz, se desarrolla en agua con poco movimiento, su forma de crecimiento fue alineado ordenado abarcando toda la superficie del agar.
4. La presencia de luz es indispensable para el desarrollo de biomasa, así como el constante movimiento y la aireación de los cultivos.
5. El medio de cultivo F/2 de Guillard es efectivo para el crecimiento de *Odontella aurita*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Coscinodiscus granii*, *Nitzchia sp.* y *Bacillaria sp.* en fase líquida.
6. El medio de cultivo F/2 de Guillard es efectivo para el crecimiento de *Odontella aurita*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Nitzchia sp.* y *Bacillaria sp.* en fase sólida.

X. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la realización de un atlas de especies de microalgas presentes en el litoral Atlántico de Guatemala en posteriores estudios.
2. El estudio de diatomeas presente en Guatemala con potenciales aplicables a varias ramas de la industria.
3. Ampliar el estudio en busca de especies de microalgas con presencia de ácidos grasos con potencial para la producción de biodiesel.
4. Establecer que medio de cultivo es más eficiente variando la concentración de nutrientes para el cultivo de microalgas.
5. Realizar un perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases para determinar, tipo y presencia de ácidos grasos en las microalgas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alarcón, L. R., Olivas, E. (2004). Programa de Nutrición. Manual de prácticas de microbiología básica y microbiología de alimentos. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México.
- Alvarado, P. (2007) Biodiesel from algae and the biofuels discussion in Anrgentina. Bussines and Politics. Recuperado recuperado el 09 de noviembre del 2010 en http://www.treehugger.com/files/2007/03/biodiesel_from_1.php
- Alvear, M. (2010). Obtención y comparación de los aceites obtenidos de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella nativa* como materia prima para la producción de biodiesel. Ingenieria Química, Universidad de Cartagena.
- Andersen R A. (2005) Algal culturing techniques. Phycological Society of America Editorial El Sevier 578p (p). 1-6 y 507.
- Andersen R. A., Preising H. R., (2005) Historical Reveew of algal culturing techniques. Ed. Elsevier Academic Press. London
- Arrivillaga, A. (2002) Evaluación de la Presencia de *Hydrilla Verticillata* .en la region de Río Dulce y el Lago de Izabal; diagnóstico general e identificación de medidas de control. Oficina Técnica de Biodiversidad. Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Y Fondo Nacional para la Conservación de la Naturaleza.
- Barrientos R. C., López S. 2005. Colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. México. 55p. (p). 11-21.
- Bold H C. (1978) Introduccion to the algae,. Editorial Prentice-Hall INC, New Jersey. 707p. (p). 1-16.

“boletín de la sociedad española de ficología” DICIEMBRE 2008 ALGAS 40 Editorial
Francisco Arenas 23-24p Disponible en:
http://www.sefalgas.org/algas/sef_algas.html

Bol M. (2002) Análisis de la Contaminación presente en la Cuenca del Río Dulce y Lago de Izabal. Tesis para optar al grado de Licenciatura Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Caetano S., Mata T., Martins A., 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications. Faculty of Engineering. University of Porto, Editorial Elsevier. Portugal.

Cazali, G. (1998). Informe Final de Tesis. Inventario de los pelecípedos de la Costa Atlántica Guatemalteca con énfasis en especies comestibles. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Dix, A., et. al. (1999) El impacto de la Cuenca del Río Polochic sobre la integridad biológica del Lago de Izabal. Informe Final –Proyecto No. 4. Universidad del Valle de Guatemala. Centro de Estudios Ambientales, Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYT, Fundación Defensores de la Naturaleza. 148 p.

Etcheto, G. A. (08 de octubre 2010) Proceso de producción de biodiesel utilizando algas. Biodiésel de algas. Energías renovables. Recuperado el 08 de noviembre del 2010 de: <http://www.biodisol.com/biocombustibles>.

Ficha técnica (2010) Biodiesel. Soluciones Prácticas, tecnologías desafiando la pobreza. Recuperado el 09 de noviembre del 2010 en www.solucionespracticas.org.pe

Gama M A. 2004. Biología; biogenesis y microorganismos. 2ª ed. Ed. Pearson Prentice hall. México. 175-179p

García, R. (2008) Informe de Tesis. Caracterización Energética de Guatemala. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Guerrero M., Loscada M. (1991). Producción fotosintética de compuestos de interés práctico por microalgas. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Universidad de Sevilla. España.
- Harrison, P. (2005). Marine Culture Media. Phycological Society of América Editorial El Sevier (p) 21-31
- López J. G. (1991). Fijación y movilización Biológica de Nutrientes. Vol. 1. Ed. CSIC. España, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 169 – 185p.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2004) Brock. Biología de los microorganismos. 10ª. Ed. Madrid, España. Pearson Educación, S.A. pag. 23, 35, 469, 487-490.
- Organización Mundial para la Pesca y la Acuicultura FAO. (2004). El estado mundial de la Pesca y la Acuicultura. Roma.
- Peña, J. E., Palacios, M. L., Ospina, N. (2005) Algas como indicadores de contaminación. (1ª. Ed.). Cali, Colombia. Universidad del Valle.
- Prado, L. (1990) Informe Final de Tesis. Colecta, Clasificación y distribución de las especies de gasterópodos en la Costa Atlántica de Guatemala. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Romero, R. 2005. Informe de Tesis. Elaboración, Análisis y Comparación de Biodiesel a partir del aceite de Palma usado (*Elaeis guineensis*) mediante dos procesos, a nivel de Planta Piloto. Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Round F.E. (1973) The biology of the algae 2a ed. Bristol, London. Universidad of Bristol. 278p.
- Sunda, W., Price, N., Morel, F. (2005). Trace metal ion buffers and their use in culture studies. Phycological society of America (p) 35 - 37

- Stein J R. Handbook of phycological methds. Cambridge. Editorial Cambridge University, 1975. 446p.
- Stanier P R, et al. 1996 Microbiología. 2ª ed. España: Editorial Reverte, 1996. 765p. (p). 562-565.
- Thomas, J. (26 Junio del 2006) New Company to produce biodiesel from algae. Science and technology. Recuperado el 08 de noviembre del 2010 en: http://www.treehugger.com/files/2006/06/new_company_to.php
- Tomas C. (1997). Identifing Marine Phytoplankton. Florida Department of Enviromental Protection. St. Petensburg. Florida. 858p.
- Xiaoling H. 2006. High quality biodiesel production from microalga *Clorella prototrhcides* by heterotrophic growth in fermeners. <jurnal of Biotechnology. Editorial Elsevier. Tsinghua University, Beijing China.
- Yusuf C. (2007) Biodiesel from Microalgae. Biotechnology Advances. Editorial Elsevier. Massey University. New Zealand. Pages 294-306.

F) Rode Aida Ruiz Morales
Investigadora

F) Lic. Erick Giovany Estrada
Asesor

F) Licda. Ana Lucia Mazariegos
Asesora

F) Licda. Maria Eugenia Paredes
Revisora