



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE MICROALGAS
PSICRÓFILAS PRESENTES EN GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA
PARA LA SÍNTESIS DE BIOCOMBUSTIBLE.**

AUTOR: HUILCA CORREA, EDISON GEOVANNY

DIRECTOR: PROAÑO PÉREZ, FREDDY Ph.D.

SANGOLQUÍ

2017.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación "*Producción de lípidos a partir de Microalgas Psicrófilas presentes en Glaciares de la Antártida para la síntesis de Biocombustible*", realizado por el señor *Edison Geovanny Huilca Correa*, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor *Edison Geovanny Huilca Correa* para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 08 de marzo del 2017.

Freddy Proaño, Ph.D.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Edison Geovanny Huilca Correa*, con cédula de identidad N° 171565880-1 declaro que este trabajo de titulación "*Producción de lípidos a partir de Microalgas Psicrófilas presentes en Glaciares de la Antártida para la síntesis de Biocombustible*", ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 08 de marzo del 2017.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, *Edison Geovanny Huilca Correa*, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación "Producción de lipidos a partir de Microalgas Psicrófilas presentes en Glaciares de la Antártida para la síntesis de Biocombustible", cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 08 de marzo del 2017.

Edison Geovanny Huilca Correa
171565880-1

DEDICATORIA

A mi Mamá Paty y a mi Papá Edi que siempre estuvieron en los buenos y malos ratos. Les agradezco de todo corazón por darme buenos consejos y hacerme caer en cuenta de que todo esfuerzo tiene su recompensa.

Les amo mucho.

A Liss por ser parte de mi vida, mi camino de todos los días y llenarme de alegría el corazón.

Gracias por existir. Te amo.

A mi bisabuela María Mosquera y mi abuelo Hugo Huilca que ahora son mi ejemplo, inspiración y quienes cuidan de mí desde arriba.

A mi familia, profesores y amigos con quienes aprendí y disfrute agradables momentos.

Gracias por aparecer en mi vida.

Edison Geovanny Huilca Correa

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres por todo el apoyo que me han brindado en todo este tiempo, les agradezco infinitamente por darme la vida, la educación y darme la confianza para poder cumplir con mis metas.

Al Laboratorio de Química Sostenible de la Universidad Central del Ecuador especialmente al Dr. Ronny Flores, por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de titulación.

A la Ing. Lisete Licto, quien trabajó junto a mí y tuve el honor de aprender de ella todo su conocimiento. Agradezco su apoyo incondicional, confianza y paciencia a lo largo de este proyecto.

A Freddy Proaño, Ph. D., Investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, quien decidió ser el tutor de mi proyecto de titulación. Su guía, paciencia y colaboración son parte de este trabajo.

A todas las personas que forman parte de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, quienes hicieron de mí un gran profesional y fueron mi motivación para seguir adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA	
CERTIFICADO.....	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN (PUBLICACIÓN BIBLIOTECA VIRTUAL)	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del problema.....	5
1.3. Objetivos.....	6
1.3.1. Objetivo General	6
1.3.2. Objetivos Específicos	6
1.4. Hipótesis.....	6

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Generalidades	7
2.2. Factores de crecimiento de las microalgas.....	10
2.2.1. Luz.....	10
2.2.2. pH y salinidad	11
2.2.3. Nitrógeno y Fósforo	12
2.2.4. Temperatura	12
2.3. Géneros de microalgas.....	12
2.3.1. <i>Chlorella</i> spp.	12
2.3.2. <i>Chlorococcum</i> spp.	14
2.3.3. <i>Stichococcus</i> spp	16
2.4. Estructura, morfología y fisiología.....	16
2.5. Flora de la Antártida	19
2.6. Perfil Lipídico	21
2.7. Características del biocombustible.	23

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Participantes	25
3.1.1. Instituciones	25
3.1.2. Colaboradores Científicos	25
3.2. Periodo de investigación.....	25
3.3. Selección de microalgas psicrófilas antárticas.....	25
3.3.1. Colecta de muestras.	25

3.3.2. Proceso de adaptación.....	25
3.3.3. Aislamiento de microalgas psicrófilas antárticas.	26
3.3.3.1. Aislamiento en medio de cultivo sólido.	27
3.3.4. Preparación del medio de cultivo	27
3.3.4.1. Medio de cultivo M1 modificado	27
3.4. Condiciones del cultivo de microalgas psicrófilas antárticas	29
3.5. Determinación de lípidos.....	29
3.5.1. Método de extracción de Bligh & Dyer	29
3.5.2. Cuantificación de lípidos extraídos por espectrofotometría	31
3.6. Determinación de la curva de crecimiento de <i>Stichococcus</i> spp.....	32
3.6.1. Peso seco	32
3.7. Análisis estadístico.....	33
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1. <i>Chlorella</i> spp, <i>Chlorococcum</i> spp y <i>Stichococcus</i> spp.....	34
4.1.1. Masificación	34
4.1.2. Análisis del crecimiento celular a distintas temperaturas.....	35
4.1.3. Medición de lípidos extraídos.....	43
CAPÍTULO V	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1 Conclusiones	50
5.2 Recomendaciones	51
BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las microalgas	8
Tabla 2. Clasificación de las microalgas según sus características	9
Tabla 3. Número de casos identificados en las muestras recolectadas en la Isla Greenwich e Isla Roberts del Archipiélago Antártico	21
Tabla 4. Adaptación de los géneros del consorcio 15IGa2, 15IGc1 y 15IRe1 a los 21 días.	26
Tabla 5. Composición del medio de cultivo M1 modificado para 1000 mL.....	28
Tabla 6. Materiales utilizados en el Método de Bligh & Dyer	31
Tabla 7. Promedio del crecimiento celular del género <i>Chlorella</i> spp a 4° C	35
Tabla 8. Promedio del crecimiento celular del género <i>Chlorococcum</i> spp a 4° C	36
Tabla 9. Promedio del crecimiento celular del género <i>Stichococcus</i> spp a 4° C	36
Tabla 10. Promedio del crecimiento celular del género <i>Chlorella</i> spp a 24°C	37
Tabla 12. Promedio del crecimiento celular del género <i>Stichococcus</i> spp a 4° C	38
Tabla 13. Concentración de lípidos de los géneros de microalgas a 4° C.....	44
Tabla 14. Concentración de lípidos de los géneros de microalgas a 24° C.....	44
Tabla 15. Análisis de ANOVA o de varianza de los géneros <i>Chlorella</i> spp, <i>Chlorococcum</i> spp <i>Stichococcus</i> spp a distintas temperaturas.....	48
Tabla 16. Prueba de Duncan de los géneros <i>Chlorella</i> spp, <i>Chlorococcum</i> spp <i>Stichococcus</i> spp a distintas temperaturas.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de radiación electromagnética de la luz.....	10
Figura 2 Efecto de la intensidad de la luz sobre la tasa de crecimiento específica de las microalgas	11
Figura 3. División del género <i>Chlorella</i>	13
Figura 4. Morfologías distintas del género <i>Chlorococcum sp.</i>	15
Figura 5. Síntesis de los ácidos grasos	15
Figura 6. Esquematización de la síntesis de lípidos en células eucariotas	19
Figura 7. Muestras recolectadas de los glaciares antárticos	20
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>Chlorella spp</i> cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 4° C	39
Figura 9 Curva de crecimiento de <i>Chlorella spp</i> cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 24° C	39
Figura 10. Curva de crecimiento de <i>Chlorella spp</i> cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 4° C.....	40
Figura 11. Curva de crecimiento de <i>Chlorococcum spp</i> cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 24° C.....	40
Figura 12. Curva de crecimiento de <i>Stichococcus spp</i> cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 4° C.....	41
Figura 13. Curva de crecimiento de <i>Stichococcus spp</i> cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 24° C.....	42
Figura 14. Concentración promedio de lípidos de <i>Chlorella spp</i> , <i>Chlorococcum spp</i> y <i>Stichococcus spp</i> a 4° C.....	45
Figura 15. Concentración promedio de lípidos de <i>Chlorella spp</i> , <i>Chlorococcum spp</i> y <i>Stichococcus spp</i> a 24° C.....	46

RESUMEN

Las microalgas psicrófilas habitan en ambientes extremadamente fríos, su crecimiento aumenta debido a que poseen enzimas en su estructura que solo se adaptan a temperaturas menores a 0 °C. Por este motivo el Laboratorio de Química Sostenible de la Universidad Central del Ecuador junto con el Instituto Ecuatoriana Antártico (INAE) realizó una expedición en las islas Greenwich, Roberts, Dee, Barrientos y Torre de la Antártida donde se recolectaron varios consorcios de microalgas, donde se analizaron 15 muestras provenientes de la isla Greenwich y Roberts a los 21 días a diferentes temperaturas, de las cuales se adaptaron los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp. Posteriormente se realizó un aislamiento en cajas Petri para obtener cultivos monoalgales. Se masificó cada uno de los géneros aislados en un volumen de 5 mL hasta alcanzar un volumen de 250 mL en medio M1 modificado a una temperatura de 4° C y 24° C, 5000 lux y un fotoperíodo 12:12 horas. El método de Bligh & Dyer se utilizó para la extracción de lípidos. Los valores de la concentración lipídica mostraron que el género *Chlorella* spp es el de mayor concentración con un valor de 0,2802 mg/mL a 4° C y un valor de 2,6704 mg/mL a 24° C en e día 22 de su fase exponencial en comparación con los géneros *Chlorococcum* y *Stichococcus* spp. Por lo tanto todas las microalgas psicrófilas producen lípidos para la síntesis de biocombustible, siendo el género *Chlorella* sp el de mayor concentración en mg/mL.

PALABRAS CLAVES:

- **CHLORELLA SPP**
- **MICROALGAS PSICRÓFILAS**
- **ANTÁRTIDA**
- **LÍPIDOS**
- **MÉTODO DE BLIGH & DYER.**

ABSTRACT

Psychophilous microalgae live in extremely cold environments, their growth increased due to the enzymes in their structure that only adapt to temperatures below 0 °C. For this reason the Laboratory of Sustainable Chemistry of the Central University of Ecuador together with the Antarctic Ecuadorian Institute (INAE) carried out an expedition in the Greenwich, Roberts, Dee, Barrientos and Tower Islands where several microalgae consortia were collected, where 15 samples of Greenwich and Roberts Islands were analyzed at 21 days at different temperatures, Of which are adapted to the genus *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp and *Stichococcus* spp. Subsequently, an isolation was performed in Petri boxes to obtain monoalgal cultures. Each of the isolated genera was massified in a volume of 5 ml to a volume of 250 ml in modified M1 medium at a temperature of 4 °C and 24 ° C, 5000 lux and a 12:12 hour photoperiod. The Bligh & Dyer method was used for lipid extraction. The values of the lipid concentration showed that the genus *Chlorella* spp is the one with the highest concentration with a value of 0.2802 mg / mL at 4 °C and a value of 2.6704 mg / mL at 24 °C on day 22 of Exponential phase compared to the genera *Chlorococcum* and *Stichococcus* spp. Therefore, all psychophilic microalgae produce lipids for the synthesis of biofuel, with the genus *Chlorella* spp being the highest concentration in mg/mL.

KEYWORDS:

- **CHLORELLA SPP**
- **PSYCHOPHILOUS MICROALGAE**
- **ANTARCTICA**
- **LIPIDS**
- **BLIGH & DYER METHOD.**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Las microalgas psicrófilas son organismos fotosintéticos que pertenecen al Reino vegetal y se adaptan a temperaturas de - 5 °C (Martínez, 2010). En el Ecuador se han realizado estudios de microorganismos psicrófilos en los Glaciares del Chimborazo (Correa, 2013).

Las microalgas psicrófilas recolectadas en las islas Greenwich, Roberts, Dee, Barrientos y Torre del Archipiélago Antártico han ido sobreviviendo hasta la actualidad, según datos de la Estación Antártica Pedro Vicente Maldonado el tipo de géneros identificados en el consorcio de microalgas ha ido incrementando de 2 en el año 2013 a 6 en el año 2014. Existen 35 muestras recolectadas en total, de las cuales 11 pertenecen a la isla Greenwich y corresponden a la mayor cantidad de muestras recolectadas conteniendo algas psicrófilas hasta el momento. Las colectas que también presentan una elevada abundancia pertenecen a la isla Greenwich con 5 géneros. Las microalgas psicrófilas que presentan menos sobrevivencia pertenecen a la isla Dee (EcuadorAntártico, 2014).

El Laboratorio de Química Sostenible de la Universidad Central del Ecuador es una entidad gubernamental que tiene la finalidad de obtener distintos géneros de microalgas de las muestras recolectadas, así como el aislamiento de los géneros: *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp, para realizar procesos a escala piloto para posteriormente extraer lípidos y sintetizar biodiesel. Las investigaciones se centran en el área de campo y laboratorio para estudiar el aceite esencial extraído de microalgas psicrófilas para dar paso a la síntesis de biocombustible como una fuente alternativa de diesel, así como el aislamiento y la masificación de las microalgas

sobrevivientes (Flores, 2013).

La obtención de biocombustible se extrae de lípidos de las microalgas recolectadas a bajas temperaturas que pertenecen a la división Chlorophyta, Bacillariophyta y Euglenophyta (Amaro, Guedes, & Malcata, 2011). Los géneros de mayor prevalencia son *Haematococcus* spp., *Chlorella* spp., *Stichococcus* spp., *Diatoma* spp., *Navicula* spp. y *Filamentosa* spp, se caracterizan por presentarse en los tres años de muestreo (Molina, 2015).

Las especies marinas y dulceacuícolas que contienen mayor cantidad de lípidos para la producción de biodiesel son *Dunaliella* con 116 mg/L/día y *Nannochloris* con 76.5 mg/L/día, así como el género *Chlorella* spp con 50 mg/L/día (MALGAS, 2013). En nuestro país no se han reportado géneros de microalgas psicrófilos para la síntesis de biodiesel (Flores, 2013).

Los sistemas abiertos para la obtención de microalgas fueron desarrollados entre 1935 y 1940 debido a la escasez de alimentos. La aplicación se realizó a escala industrial con el propósito de obtener una fuente alternativa de proteínas de origen vegetal y animal para reemplazar alimentos para el consumo humano (Colorado, Moreno, & Pérez, 2013).

Las primeras microalgas se masificaron para la obtención de lípidos durante la Segunda Guerra Mundial en Alemania, los estudios fueron realizados por científicos alemanes con el propósito de depurar aguas contaminadas (MALGAS, 2013). En 1953 los cultivos de microalgas son estudiados para la utilización de intercambiadores de gas fotosintéticos empleados en viajes espaciales y como fuentes de proteínas microbianas (BEAM, 2013).

En 1980 el cultivo de microalgas se produce para el mejoramiento del medio ambiente, transformando las muestras orgánicas y sedimentos de las aguas servidas en biomasa y aguas renovadas para su posterior uso en biofertilizantes y agua para riego. En 1982 a nivel mundial el petróleo incremento de valor, dando ideas alternas como la utilización de las microalgas como fuente de energía solar (Colorado, Moreno, & Pérez, 2013).

Desde el año 2013 hasta el 2015, se recolectaron muestras de microalgas

en las islas cercanas a la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado, la diversidad del clima es un factor importante en la síntesis de los ácidos grasos para usarlos como fuente alterna de energía. La muestra recolectada en Punta Figueroa de la isla Greenwich en la Antártida ha garantizado el mejor consorcio de microalgas en la producción de aceites efectivos como el behémico, mirístico, esteárico, palmítico, linoleáidico, oléico, palmitoléico, araquídico y linoleaídico. El género de la microalga y la temperatura de donde se obtuvo la muestra es importante para la obtención de lípidos en peso seco, así como los métodos de extracción utilizados (Flores, 2013).

En la actualidad, la Unión Europea ha implementado ideas para desarrollar energía como biodiesel a partir de consorcios de microalgas con el propósito de reducir derivados de fuentes petroleras y las emisiones producidas por los gases durante el efecto invernadero (Wackett, 2008). Entre los géneros de microalgas identificados con mayor productividad de lípidos se encuentran *Chlorella* spp y *Chlorococcum* spp (Flores, 2013). Pero existen principales inconvenientes a los que se enfrentan los investigadores con el uso de microalgas: la presencia de altas concentraciones de biomasa hace que se requiera de mayor energía, y la moderada cantidad de biocombustible producido por microalgas a escala piloto (AINEnergía, 2015).

Los microorganismos criófilos conocidos comúnmente como psicrófilos, habitan en ambientes extremadamente fríos, su crecimiento aumenta debido a que poseen enzimas en su estructura que solo se adaptan a temperaturas menores a 0 °C. La membrana celular esta conformada por grasas que fluyen hasta llegar al punto de congelación (Barreiro & Sandoval, 2006). Entre las microalgas psicrófilas antárticas se encuentra *Chlorella* spp que presenta un rápido crecimiento en cultivos celulares (Chinnasamy & Bhatnagar, 2010). Su forma es esférica, de color verde debido a que contiene altos niveles de clorofila (Kanno & Kazie, 2005).

Por lo tanto, los investigadores han optado por realizar estudios con microalgas psicrófilas, las cuales podrían representar una alternativa segura

para la producción de lípidos. Entre las microalgas psicrófilas antárticas investigadas se encuentran principalmente: *Pandorina* spp, *Chlorella* spp, *Stichococcus* spp, *Chlamydomona* spp y *Chlorococcum* spp (Molina, 2015). Otros resultados obtenidos en microalgas como *Scenedesmus ovalternus*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* spp e *Isochysis* spp, han determinado la producción de lípidos con un crecimiento de 32,7 mg/L/día, obteniendo un gran cantidad de biodiesel. Estos resultados permiten concluir que algunos géneros de microalgas podrían ser útiles para la producción de lípidos (Bérmudez, 2012).

1.2. Justificación del problema

Las microalgas son organismos que necesitan de luz para su adaptación, requieren de material orgánico y un medio de crecimiento para la producción de lípidos y realizar la síntesis de biocombustible (MALGAS, 2013). En la actualidad se han reportado 27 géneros de microalgas psicrófilas recolectadas de los glaciares de la Antártida entre las cuales se encuentran *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp. (EcuadorAntártico, 2014). En el Ecuador la producción de combustible proviene de derivados del petróleo, lo que hace que nuestro país sea dependiente de las exportaciones de crudo, por esta razón es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que replacen el diesel (BancoMundial, 2013). Ensayos preliminares realizados en el Laboratorio de Química Sostenible de la Universidad Central del Ecuador han demostrado la obtención de biocombustible a partir de la extracción de lípidos de microalgas psicrófilas, por lo tanto el presente estudio plantea realizar producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilas presentes en glaciares de la Antártida para la síntesis de biocombustible, y además constituye una importante contribución en la producción de una fuente alternativa de carburantes.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Producir lípidos a partir de Microalgas Psicrófilas presentes en glaciares de la Antártida para la síntesis de Biocombustible.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la adaptación de las Microalgas Psicrófilas Antárticas en el medio de cultivo M1.
- Masificar las Microalgas Psicrófilas Antárticas adaptadas en el medio de cultivo M1.
- Extraer lípidos de las Microalgas Psicrófilas Antárticas utilizando el método de Bligh & Dyer.
- Determinar cuantitativamente el contenido de lípidos extraídos de las Microalgas Psicrófilas Antárticas.

1.4. Hipótesis

Ho: Las Microalgas Psicrófilas presentes en Glaciares de la Antártida producen lípidos para la síntesis de Biocombustible.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades

Las algas son organismos de origen vegetal, realizan el proceso de fotosíntesis, y se clasifican según su morfología y tamaño en macroalgas y microalgas. Las macroalgas están conformadas por múltiples células que se organizan en estructuras que se asemejan a tallos de raíces y hojas de plantas superiores. Las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos microscópicos, muchos de los cuales están presentes de manera unicelular y se encuentran en diversos entornos (Chen, Min, & Wang, 2009).

Las microalgas tienen una gran importancia en el área industrial, no poseen tallo, hojas ni raíces (Barsanti & Gualtieri, 2006). Son organismos generadores de biomasa (Martínez, 2010).

Se consideran plantas primitivas capaces de transformar la energía solar en química, debido a los nutrientes que estas contienen en su estructura. Participan en el proceso de transferencia energética de un organismo a otro (Albarracín, 2007). La duplicación aumenta cada 3 horas durante la fase exponencial de crecimiento (Chisti, 2007).

Estas plantas inferiores las podemos encontrar en medios acuáticos marinos y dulces, diferentes tipos de suelo y glaciares. Los crustáceos, moluscos y peces usan a las microalgas como fuente de energía, considerándolos como organismos bentónicos (Martínez, 2010).

Son ricas en almidón, aceites, proteínas, acumulan importantes metabolitos secundarios como carotenoides. Requieren de luz para poder realizar el proceso de fotosíntesis, así como macronutrientes y micronutrientes en el medio de cultivo en el que van a desarrollarse, entre los más importantes son el Nitrógeno y el Fósforo, otros factores a considerar son las vitaminas y

algunos metales. El proceso de adaptación es variable, debido a que pueden sobrevivir a altas y bajas temperaturas como el Archipiélago Antártico. (Chen, Min, & Wang, 2009).

En nuestro país se han identificados microorganismos psicrófilos de los glaciares del Chimborazo (Correa, 2013). Las microalgas se subdividen en cianobacterias procariotas que carecen de estructuras nucleares y algas eucariotas como se indica en la Tabla 1 (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Las especies capaces de producir altos niveles de lípidos podrían ser identificadas a partir de cada una de estas clases de algas eucariotas, a excepción de las cianobacterias debido a que su contenido lipídico es menor al 10 % en peso seco (Chen, Min, & Wang, 2009).

Tabla 1
Clasificación de las microalgas

REINO	CLASE
Eukaryota	Bacillariophyceae (Diatomeas)
	Chlorophyceae (Algas verdes)
	Rhodophyceae (Algas rojas)
	Xanthophyceae (Algas verde amarillas)
	Chrysophyceae (Algas doradas)
	Phaeophyceae (Algas marrones)
	Euglenophyceae
Prokaryota	Cyanophyceae
	Prochlorophyceae

Fuente: (Barsanti & Gualtieri, 2006)

Se cultivan en fotobiorreactores que brindan condiciones y parámetros para su crecimiento, dentro de estos se mejoran varios factores para producir lípidos (Salas, 2015). Existe otra división de las microalgas, en la cual se destacan varias características como se muestra en la Tabla 2 (Santamaría, García, & Roselló, 2010).

Tabla 2**Clasificación de las microalgas según sus características**

División	Morfología	Pigmentación	Reservorio	Pared celular
Chlorophyta	Poseen 2 flagelos	Carotenoides	Almidón	Celulosa
Rhodophyta	Sin flagelo	Ficobilinas	Almidón	Celulosa
Pyrrophyta	Poseen 2 flagelos laterales	Clorofila a y c	Aceites	Sin pared
Phaeophyta	Poseen 2 flagelos en la parte lateral de la zoóspora	Clorofila a y c	Laminaria	Celulosa
Chrysophyta	Poseen 2 flagelos del mismo tamaño	Carotenoides	Crisolaminaria	Pectina
Euglenophyta	Poseen 3 flagelos en la parte lateral.	Clorofila a y b	Paramilón	Sin pared

Fuente: (Santamaría, García, & Roselló, 2010).

2.2. Factores de crecimiento de las microalgas.

2.2.1. Luz

La luz es muy importante para el crecimiento de las microalgas en el proceso fotosintético, pero no pueden utilizar toda la luz, debido a que las microalgas no pueden absorber todos los fotones, el exceso de energía inhibe la capa superficial de las microalgas. La principal fuente de energía de las microalgas es la luz visible, debido a que las microalgas pueden absorber la clorofila, las ficobilinas y los carotenoides en un rango de 400 a 750 nm como se muestra en la Figura 1. (Carvalho, Silva, Baptista, & Malcata, 2011)

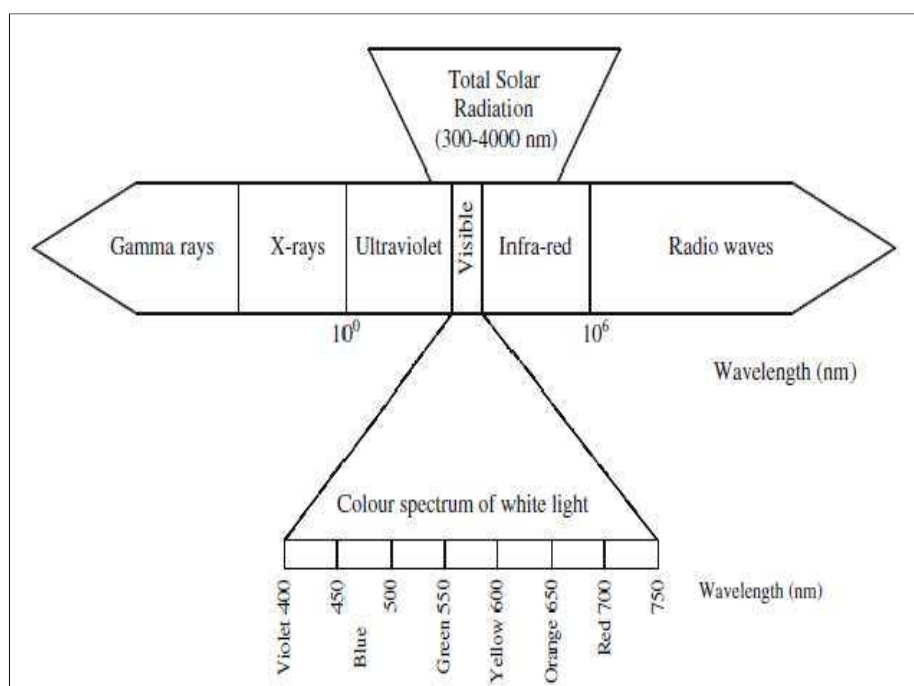


Figura 1 Espectro de radiación electromagnética de la luz.

Fuente: (Carvalho, Silva, Baptista, & Malcata, 2011)

Cuando la intensidad de la luz aumenta, la tasa de crecimiento específica microalgal disminuye, esto se conoce como fotoinhibición. Las microalgas inhiben la fotosíntesis cuando la intensidad de luz es excesiva, esto causará un

daño generalmente reversible al proceso fotosintético. Evitar la fotoinhibición puede ayudar a la tasa de crecimiento específica de las microalgas como se indica en la Figura 2 (Chisti, 2007)

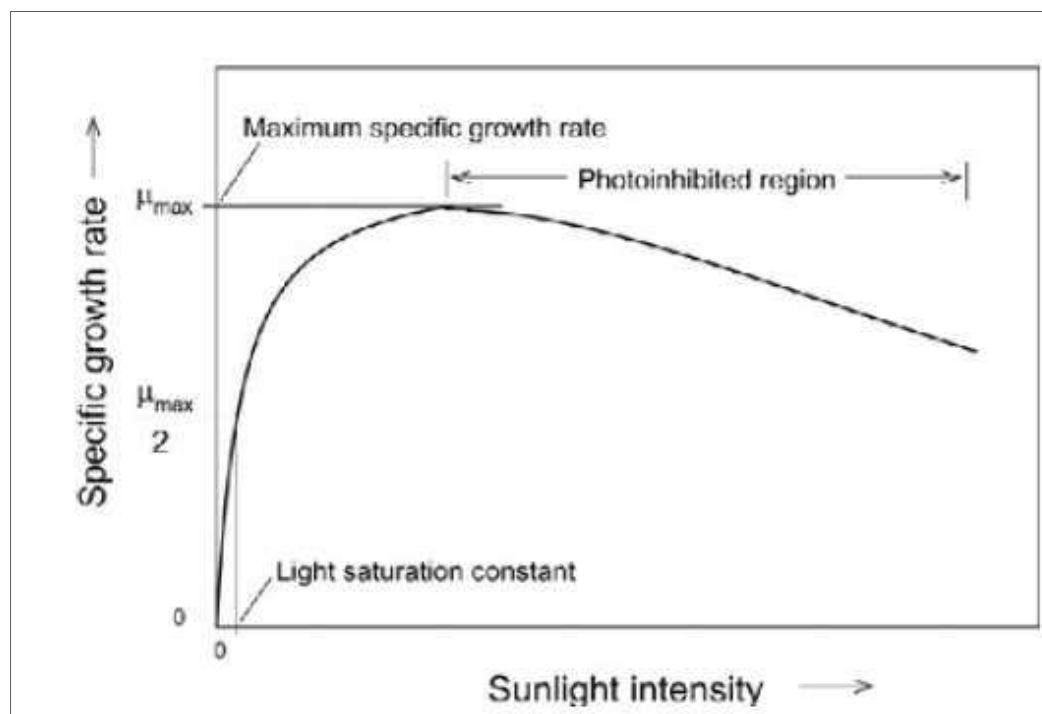


Figura 2 Efecto de la intensidad de la luz sobre la tasa de crecimiento específica de las microalgas

Fuente: (Chisti, 2007)

2.2.2. pH y salinidad

El valor de pH afecta a la tasa de crecimiento de las microalgas, pero a la vez permite la facilidad de capturar CO₂ en la atmósfera cuando la condición de crecimiento sea alcalina, en este caso se puede producir mayor cantidad de biomasa (Zang, Huang, & Wu, 2011). Generalmente, las microalgas de agua de mar pueden tolerar mayor salinidad que las microalgas de agua dulce. En caso de que las microalgas se encuentren en condiciones de crecimiento con baja salinidad, será importante la adición de NaCl y NaSO₄ (Liu, Sun, & Zhu, 2006).

2.2.3. Nitrógeno y Fósforo

El nitrógeno es un elemento esencial en el crecimiento de las microalgas. Varias especies de microalgas fijan el gas nitrógeno en el aire a través del proceso de fijación de nitrógeno para su propio uso. La mayor cantidad de nitrógeno en condiciones de crecimiento aumentará el crecimiento microalgal. La forma de nitrógeno puede ser importante para el crecimiento ya sea $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NH}_3\text{-N}$ y NH , de los mencionados anteriormente el radical $\text{NH}_4\text{-N}$ es más fácil de absorber para las microalgas (Dortch, 1990).

Además del nitrógeno también seleccionan al fósforo como fuente principal de nutrientes, el KH_2PO_4 es el de mayor consumo, lo que significa que esta forma de fósforo es útil para el crecimiento de microalgas (Zang, Huang, & Wu, 2011). La relación de nitrógeno y fósforo (N / P) afecta directamente al crecimiento de las microalgas, la composición de las células y la absorción de nutrientes (Anderson & Katja, 2003).

2.2.4. Temperatura

La temperatura es un factor ambiental que afecta indirectamente al crecimiento de las microalgas (Huang, Chen, & Liu, 2008). Si las microalgas se encuentran en medio líquido y su temperatura es inferior a 4 °C existe fotoinhibición. Cuando la temperatura está entre 11 °C y 12 °C, la fotosíntesis se inhibe sustancialmente, luego de superar los 11 °C, la relación entre la temperatura y el crecimiento de las microalgas es lineal. La temperatura determina la actividad y las tasas de reacción de la enzima intracelular, que tendrá influencia sobre la fotosíntesis y afectará el crecimiento de las microalgas (Tan, Kong, & Yu, 2009).

2.3. Géneros de microalgas.

2.3.1. *Chlorella* spp.

Es un género de algas de color verde con una sola célula pertenecientes al filo Chlorophyta. Posee la forma circular, su diámetro mide entre 2 y 10 μm ,

no presenta flagelos (Scheffler, 2007). Fue descubierto en 1890 por Beyerinck, cuyo nombre significa verde de *Chloros* y pequeño de *ella*. (Infante, Angulo, Zárate, Florez, Barrios, & Zapata).

La unión celular presenta el mismo tamaño al formar la colonia microalgal, manteniendo su forma esférica, no llegan a comprimirse como es el caso del género *Chlorococcum* spp. En ocasiones se las puede confundir de manera equivocada con los géneros *Micractinium* y *Golenkinia*. En la formación de nuevas células (A), la célula madre (B) se divide en 4 células hijas (C). (Wackett, 2008). Las células madre pueden convertirse en gametos o esporas, porque presentan un plasto voluminoso que contiene un pirenóide. Las células jóvenes son de menor tamaño también se las conoce como autoesporas, se liberan de manera espontánea de la pared celular de las células aisladas o células madre (D), como se indica en la Figura 3. (Des Abbayes, Chadefaud, Grassé, Feldmann, & Prévot, 1989)

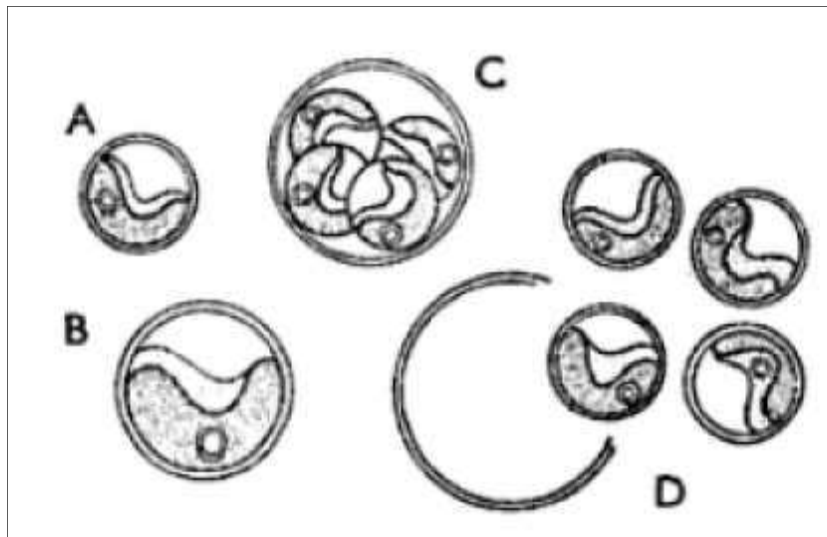


Figura 3 División del género *Chlorella*

Fuente: (Des Abbayes, Chadefaud, Grassé, Feldmann, & Prévot, 1989)

El cloroplasto es parietal, posee la forma de una taza (Wackett, 2008). Este contiene pigmentos fotosintéticos de color verde como son la clorofila a y clorofila b (Scheffler, 2007)

Las microalgas realizan el proceso de fotosíntesis de manera rápida, necesitando minerales, CO₂, luz y agua (Scheffler, 2007). El género *Chlorella* spp es una fuente alimenticia de suma importancia, en varias ocasiones puede suplementar a otros alimentos como la caña de azúcar debido a que su eficiencia en el proceso de fotosíntesis puede llegar a ser mayor del 8% (Zang, Huang, & Wu, 2011).

Este género puede habitar en aguas que contengan materia orgánica o minerales. Se utilizan en lagunas de estabilización, son resistentes a condiciones elevadas de salinidad, cuando se reproducen muy rápidamente forman un olor a moho en medios acuáticos. Algunas especies obstruyen filtros de arena (Wackett, 2008). Se cultiva en pozos de agua para el consumo diario en las personas debido a que contiene actividad proteica y puede ser utilizada como un analgésico en el tratamiento de tumores (Alvear, Castillo, & Henao, 2011).

2.3.2. *Chlorococcum* spp.

Su color es verde, son similares al género *Chlorella* spp (Zang, Huang, & Wu, 2011). Forma parte de la familia Chlorococcaceae y filo Chlorophyta (Carvajal, Cadena, Molina, Romero, Gavilanez, & Morales, 2013). En ciertos casos esta microalga se asemeja con el género *Phytoconis* (Carvajal, Cadena, Molina, Romero, Gavilanez, & Morales, 2013). La formación de sus células es de forma irregular, debido a que presentan diferentes tamaños en su diámetro. Cuando dos células se ponen en contacto, su superficie es plana, en ciertas ocasiones se comprimen (Wackett, 2008).

Su morfología es ovalada o elíptica (a) (Carvajal, Cadena, Molina, Romero, Gavilanez, & Morales, 2013). También pueden adoptar una forma esférica (b) (Wackett, 2008). El cloroplasto es parietal urceolado que cubre a la

membrana celular en su totalidad (c) (Zang, Huang, & Wu, 2011). Pueden presentar un pirenoide o varios de ellos (d) (Abd El-Baky & El-Baroty, 2013). Al momento de reproducirse forman esporas los cuales contienen flagelos con propio movimiento (e) como se indica en la Figura 4 (Carvajal, Cadena, Molina, Romero, Gavilanez, & Morales, 2013).

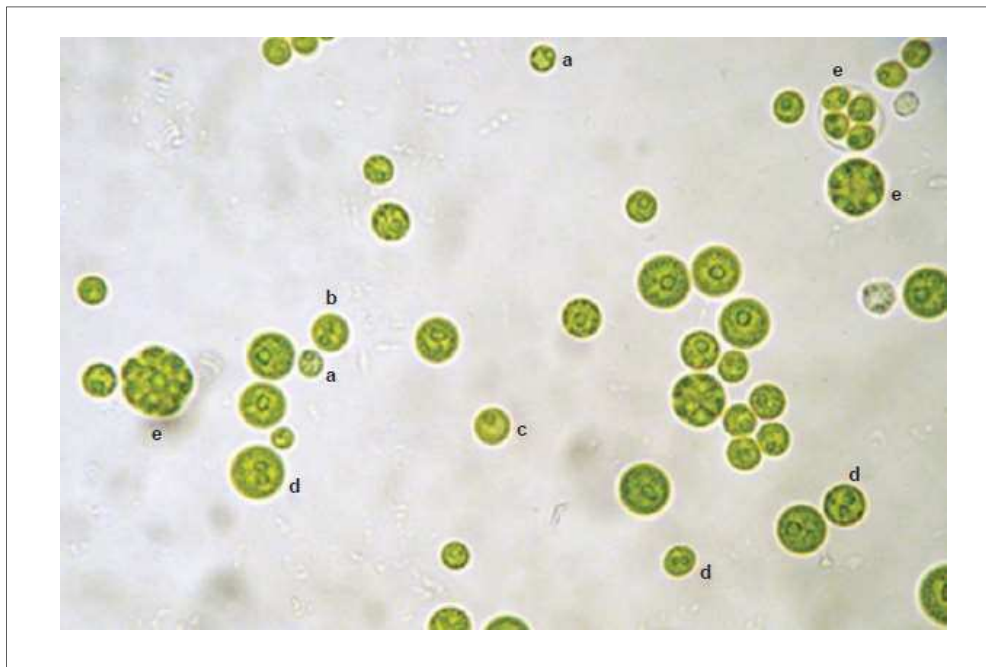


Figura 4 Morfologías distintas del género *Chlorococcum* sp.

Fuente: (Carvajal, Cadena, Molina, Romero, Gavilanez, & Morales, 2013).

Se reproducen de manera asexual por aplanospóras y zoósporas, pero hay casos donde *Chlorococcum* spp su reproducción es sexual debido a la unión de isogametos (Carvajal, Cadena, Molina, Romero, Gavilanez, & Morales, 2013).

Habitan en aguas con alto nivel de salinidad, resisten la polución, abundan mayormente en el suelo (Wackett, 2008). Se adaptan a sequías y poseen un pH de 2 a 9 (Klochkova, Kang, Cho, Pueschel, & Kim, 2006). Algunas especies son heterótrofas, y pueden vivir en ambientes que no contengan luz, sin cambiar su pigmentación verde. Soportan compuestos químicos como el sulfato de cobre (Wackett, 2008). Añaden carotenoides en su estructura cuando presentan

condiciones de estrés, se masifican en fotobiorreactores con luminosidad (Abd El-Baky & El-Baroty, 2013).

2.3.3. *Stichococcus* spp

Es una microalga de color verde, que abarca 14 especies. Las células tienen aproximadamente 2 a 3 μm de diámetro. El estado de las estructuras filamentosas o unicelulares depende de la salinidad. Su ciclo de vida es corto y es tolerante a diferentes rangos de pH. Más del 30% de su masa seca se puede producir como aceite que puede convertirse fácilmente en biocombustible. Puede llegar a producir altos porcentajes de ácidos grasos de carbono C16 a C18. Varias especies pueden crecer tanto en agua dulce y agua de mar con diferente cinética de crecimiento, se adapta a bajas temperaturas y se encuentra en áreas libres de hielo en la Antártida. Tiene una organización única de microtúbulos en la profase. Es importante para la producción de biodiesel (Sivakumar, Jeong, & O Lay, 2014).

2.4. Estructura, morfología y fisiología.

Las microalgas contienen en su membrana pigmentos como la clorofila y la xantofila, además de carotenoides, como la astaxantina y la fucoxantina, se destacan también los componentes químicos entre los cuales se encuentran la luteína y la piridina, por último se destacan las proteínas como las ficobilinas que son capaces de captar la luz (Gavilanez, Morales, & Molina, 2013). Las ficobilinas se encuentran en abundancia en estos microorganismos debido a la presencia de metionina y cisteína ya que forman parte de las reservas de energía. Otras fuentes de suplemento son el glicerol y los almidones (Garbisu, Blanco, Alkorta, Llama, & Serra, 1999). Estas características estructurales son utilizadas de suma importancia en los procesos alimenticios (Gavilanez, Morales, & Molina, 2013). En los géneros de *microalgas* *Lyngbya* spp, *Diatomea* spp y *Chladophora* spp se han encontrado 50% de proteínas, 30% de hidratos de carbono y 20% de lípidos (Ahmad, Khan, & Yasar, 2012). Las microalgas en su totalidad presentan dos formas: 1) unicelulares y 2) multicelulares. Los microorganismos unicelulares

poseen dos o más flagelos en la parte lateral o apical, en este grupo se encuentran las chlorphytas de color verde, chrysopytas de color dorado o marrón, pyrrophytas o dinoflageladas y euglenophytas o euglenoides. Las microalgas multicelulares contienen pigmentos rojos que no poseen flagelo pero en microalgas pardas como las phaeophytas se presentan flagelos en la zoóspora (Santamaría, García, & Roselló, 2010).

Las microalgas unicelulares contienen flagelos en su estructura, luego de dividirse varias veces, los microorganismos detienen la separación de las zoosporas, las células se juntan y el ADN se replica, las microalgas adquieren una estructura esférica inmóvil debido a la carencia de flagelos (Santos & Mesquita, 1984). Las microalgas realizan el Ciclo de Calvin donde se producen procesos bioquímicos en los estromas del cloroplasto. Las moléculas de dióxido de carbono generan glucosa, uniéndose a la 1-5 bifosfato ribulosa, posteriormente se dividen en dos moléculas de 3 fosfoglicerato para llegar a obtener piruvato. Una vez que el piruvato llega a descarboxilarse, la acetil coenzima A forma la malonil coenzima A, que es llevada hacia la proteína transportadora del grupo Acilo donde se origina la molécula beta cetoacil, de esta se remueve el grupo cetona y empieza la síntesis de los ácidos grasos. En el segundo ciclo de la síntesis de ácidos grasos se añaden acetilos provenientes de la malonil coenzima A para ampliar el número de átomos de carbono a 16. Finalmente se separa la proteína trasportador de acilo como se muestra en la Figura 5. (Voet, Voet, & Pratt, 2007).

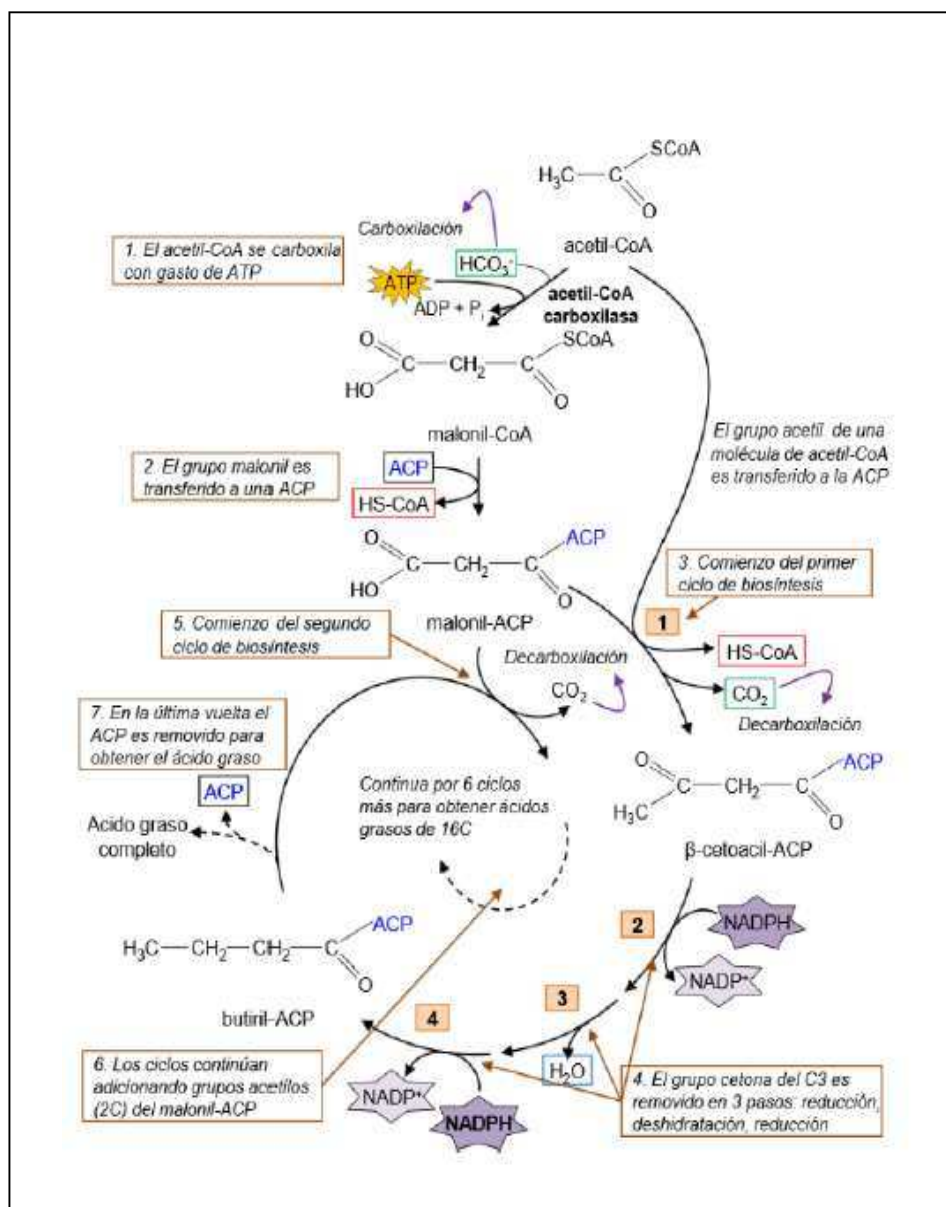


Figura 5 Síntesis de los ácidos grasos

Fuente: (Voet, Voet, & Pratt, 2007)

Posteriormente el acetato restante se añade al palmitato, a través de elongasas, forma triglicéridos en el retículo endoplasmático como se indica en la Figura 6 (Garibay, Vásquez, Sánchez, Serrano, & Martínez, 2009).

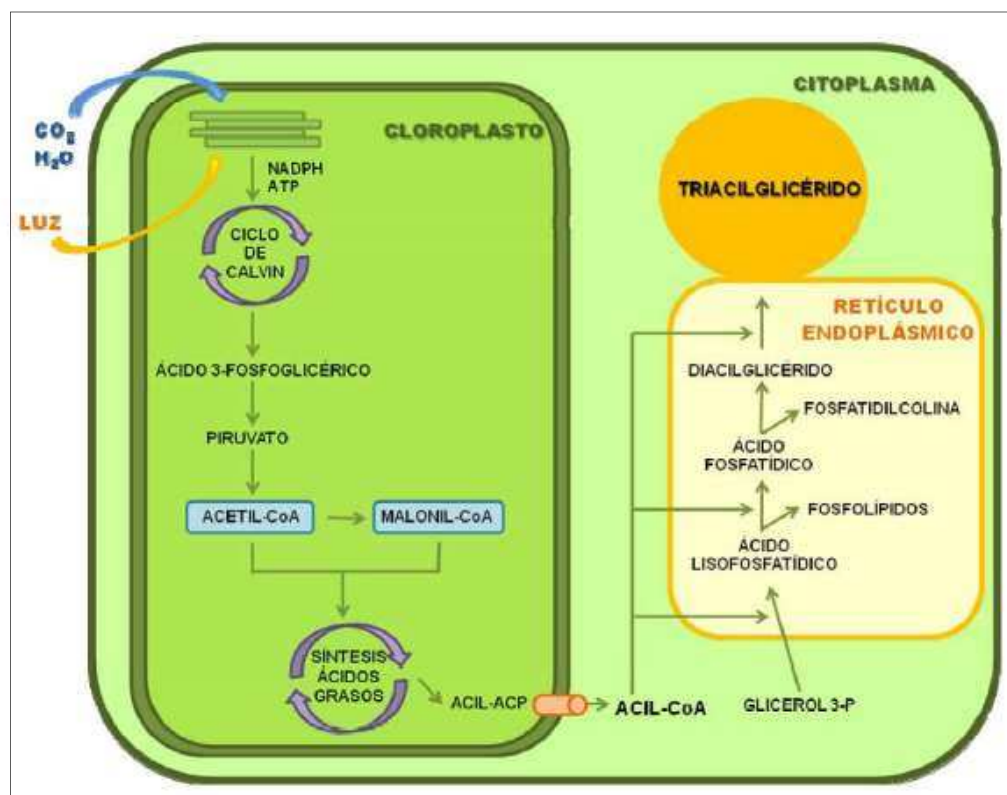


Figura 6. Esquemización de la síntesis de lípidos en células eucariotas

Fuente: (Garibay, Vásquez, Sánchez, Serrano, & Martínez, 2009)

Las desaturasas provocan insaturaciones entre el carbono 9 y el carbono 10, formando el ácido oléico y palmitoléico, los cuales son fuentes de reserva en la célula (Madigan, Martinko, & Parker, 2003).

2.5. Flora de la Antártida

El Archipiélago Antártico se encuentra al sur del continente Americano, el clima es frío con temperaturas por debajo de los $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, se encuentran en él diferentes tipos de animales como aves, peces y mamíferos. Principalmente su flora está llena de microalgas y líquenes, que han desarrollado su morfología según las variaciones del medio ambiente. Las microalgas crecen en ambientes de agua marina y dulce además pueden acondicionarse en la nieve y en los glaciares. Los microorganismos psicrófilos se los recolectan entre los meses de

noviembre, diciembre, enero y febrero, aquí se dan las estaciones de Verano y Primavera. Su crecimiento es elevado debido a la absorción de nutrientes y la captación de la luz solar, en los glaciares se observan manchas verdes y rojas, lo que hace una fácil identificación de las microalgas al momento de recolectar muestras como se indica en la Figura 7 (ASOCAE, 2011). Los géneros identificados en la recolección de microalgas de la Isla Greenwich y la Isla Roberts fueron utilizados para realizar la investigación, pertenecen a diferentes clases de plantas inferiores como se indica en la Tabla 3 (Salas, 2015).



Figura 7. Muestras recolectadas de los glaciares antárticos
Fuente: (ASOCAE, 2011).

Tabla 3

Número de casos identificados en las muestras recolectadas en la Isla Greenwich e Isla Roberts del Archipiélago Antártico

Clase	Género
Bacillariophyceae	<i>Coconeis</i>
	<i>Cymbella</i>
	<i>Diatoma</i>
	<i>Gomphonema</i>
	<i>Hantzschia</i>
	<i>Surirellya</i>
	<i>Pinnularia</i>
	<i>Nitzchia</i>
	<i>Synedra</i>
	<i>Navicula</i>
Chlorophyceae	Chlorella
	<i>Haematococcus</i>
	<i>Chlorococcum</i>
	<i>Pandorina</i>
	<i>Chlamydomona</i>
Cyanophyceae	<i>Stichococcus</i>
	<i>Oscillatoria</i>
	<i>Leptolyngbya</i>
	<i>Pseudoanabaena</i>

Fuente: (Salas, 2015)

2.6. Perfil Lipídico

Los lípidos son moléculas conformadas por átomos de carbono e hidrógeno, en pocas cantidades de oxígeno y en ocasiones de nitrógeno, fosforo y azufre. Son insolubles en agua y solubles en compuestos orgánicos como el

cloroformo, éter, benceno. Las microalgas poseen lípidos que contienen triglicéridos que son producidos por varias moléculas de ácido graso y una molécula de 1, 2, 3 – propanotriol o glicerol. Las cadenas cortas de los ácidos grasos le dan volatilidad y un bajo punto de ebullición, mientras que las cadenas largas presentan un punto de ebullición elevado y no son volátiles. Los ácidos grasos que contienen en su estructura enlaces dobles son más reactivos y su punto de fusión aumenta, esto hace que se puedan mantener a temperaturas bajas en estado líquido. Los lípidos se encuentran conformados por grasas, aceites, terpenos, ceras, esteroides y en algunos casos por lípidos complejos (Salas, 2015).

Las grasas son ésteres que se encuentran conformados por glicerol y ácidos grasos en saturación, contienen enlaces simples en sus cadenas de átomos de carbono (Monthieu, 2010). Los aceites se forman por una molécula de glicerol y ácidos grasos que pueden tener enlaces simples o dobles, conocidos también como insaturados. Mantienen su estado líquido a una temperatura de 24 °C y se originan de vegetales. Los terpenos son hidrófobos, se forman a partir del isopreno, provienen de los aceites vegetales (Madigan, Martinko, & Parker, 2003).

Las ceras son ésteres originados por la adición de ácidos grasos con un peso molecular elevado a moléculas distintas a la glicerina o glicerol, en los animales las ceras actúan como capas de protección (Garibay, Vásquez, Sánchez, Serrano, & Martínez, 2009). Los esteroides se derivan del esterano, compuestos por átomos de hidrógeno y carbono, forman cuatro anillos, un pentagonal y tres hexagonales, su origen puede ser vegetal como los fitoesteroides y animal como el colesterol. Los lípidos complejos son saponificables conocidos también como lípidos de membrana, son anfipáticas conformadas por átomos de hidrogeno, carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre y fosforo. La molécula de glicerol se encuentra en el centro y puede ser remplazada por el grupo fosfato y los ácidos grasos (Salas, 2015).

2.7. Características del biocombustible.

Los biocombustibles sintetizados de la extracción de lípidos a partir de microalgas pueden proporcionar una opción viable a los combustibles fósiles. Sin embargo, esta nueva alternativa debe superar una serie de obstáculos antes de que pueda competir en el mercado de los combustibles y de ser desplegado ampliamente. Esto incluye la identificación de la cepa del género microalgal y su mejoramiento en términos de productividad de petróleo, además de la protección de los medios de cultivos, adición de nutrientes para mejorar la producción de biocombustible y la economía de nuestro país. A nivel mundial se requiere de la obtención de biodiesel a partir microalgas para proporcionar la energía necesaria para iluminación, calefacción y transporte. El petróleo es un recurso limitado que con el tiempo se agotará. Estos factores están impulsando el desarrollo de fuentes alternas de energía renovables que pueden suplantar combustibles fósiles (Hannon, Gimpel, Tran, Rasala, & Mayfield, 2010).

En la actualidad las microalgas son la única forma renovable para generar biocombustibles, tienen un impacto mucho menor sobre el medio ambiente. Se pueden seleccionar varios géneros para optimizar la producción de diferentes biocombustibles, ofreciendo una gama variada de productos alimenticios como ácidos grasos omega-3 y fuentes de energía como combustible para aviones, gas de aviación, biodiesel, gasolina y bioetanol (Gouveia, 2011).

El biodiesel esta formado por aceites originados de microalgas mediante extracción o compresión. Es un carburante derivado de microorganismos cuya transformación produce ésteres con grupos alquilo que pueden ser utilizados en vehículos con motor a diesel sin alterar las partes de la carrocería. También el biodiesel se puede añadir a los combustibles derivados del petróleo, reduciendo las emisiones de dióxido de carbono producido por los gases del efecto invernadero, así como la disminución de smog y malos olores. Presenta un punto de inflamación mucho mas elevado que el diesel por lo que nos brinda mayor facilidad de almacenarlo (Cárdenas, 2010).

Las microalgas son una fuente suplementaria a la producción de biocombustibles debido a que tiene propiedades mucho más benéficas que el diesel común. La densidad del biodiesel es de 0,864 kg/L mientras que la del carburante es de 0,838 kg/L lo que hace que el biocombustible incremente la energía térmica del vehículo brindando un mejor rendimiento al motor. La viscosidad del biodiesel es de $5,2 \times 10^{-4}$ Pa/s mucho menor a la de la gasolina que es de $1,9 \times 10^{-4}$ Pa/s, evitando que se originen fugas al momento de encender el vehículo (Barraza, Collao , Espinoza, Moya , & Thun, 2009).

El biocombustible tiene un punto de inflamación de 115 °C, lo que significa que puede ser utilizado industrialmente debido a que si un carburante supera los 65 °C en su punto de inflamación es considerado como combustible. El ácido graso que presente un número de cetano próximo a 100 es el más óptimo para la síntesis de biodiesel. El ácido esteárico tiene un número de cetano de 85,9 por lo que este es el más utilizado al momento de ver la volatilidad y la inflamación del combustible (Sánchez, Piloto, Goyos , & Ferrer, 2012).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Participantes

3.1.1. Instituciones

El proyecto fue realizado en el Laboratorio de Biología Química Sostenible de la Universidad Central del Ecuador, en convenio con la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

3.1.2. Colaboradores Científicos

Freddy Proaño, Ph.D., ESPE (Director del Proyecto de Titulación).

Ronny Flores, Dr., Universidad Central del Ecuador (Tutor Científico y Director externo del Proyecto de Titulación)

3.2. Periodo de investigación

La investigación fue desarrollada en un periodo de 4 meses, desde agosto hasta diciembre de 2016.

3.3. Selección de microalgas psicrófilas antárticas.

3.3.1. Colecta de muestras.

Las muestras fueron otorgadas por el Laboratorio de Química Sostenible de la Universidad Central del Ecuador como parte del proyecto del Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE). Estas fueron tomadas de la Isla Greenwich y la Isla Roberts ubicadas en la Antártida, posteriormente se trasladaron al Ecuador en diferentes tubos de ensayo con su respectiva tapa.

3.3.2. Proceso de adaptación

Se tomaron varias muestras de biomasa de los tubos originales, en donde

los consorcios 15IGa2 con coordenadas 35° 59' 36" S y 48° 27' 27" O, consorcio 15IGc1 con coordenadas 35° 53' 30" S y 76° 43' 17" O y el consorcio 15IRe1 con coordenadas 35° 43' 40" y 72° 13' 27" O se adaptaron a distintas temperaturas en el laboratorio luego de pasar por un proceso de adaptación de 21 días en función del medio de cultivo M1 modificado como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Adaptación de los géneros del consorcio 15IGa2, 15IGc1 y 15IRe1 a los 21 días.

Consorcio	Muestra Original	Adaptación 4° C	Adaptación 24°C
15IGa2	<i>Haematococcus</i> spp.	<i>Chlorella</i> spp. <i>Chlorococcum</i> spp.	No sobrevivieron
	<i>Chlorococcum</i> spp.		
	<i>Chlorella</i> spp.		
	<i>Stichococcus</i> spp.		
	<i>Diatoma</i> spp.		
15IGc1	<i>Chlorella</i> spp.	<i>Chlorella</i> spp. <i>Stichococcus</i> spp. <i>Chlorococcum</i> spp.	No sobrevivieron
	<i>Stichococcus</i> spp.		
	<i>Chlorococcum</i> spp.		
	<i>Chlorella</i> spp.		
15IRe1	<i>Haematococcus</i> spp.	<i>Chlorococcum</i> spp. <i>Chlorella</i> spp.	<i>Chlorococcum</i> spp. <i>Chlorella</i> spp. <i>Stichococcus</i> spp.
	<i>Chlorococcum</i> spp.		
	<i>Chlorella</i> spp.		
	<i>Stichococcus</i> spp.		

3.3.3. Aislamiento de microalgas psicrófilas antárticas.

Se procedió a realizar el aislamiento de tres géneros de microalgas con el fin

de obtener cultivos monoalgales es decir de un tipo de género.

3.3.3.1. Aislamiento en medio de cultivo sólido.

Se utilizó esta técnica para separar los tres géneros de microalgas seleccionados luego del proceso de adaptación en este caso fueron *Chlorella* spp perteneciente al consorcio 15IGa2, *Chlorococcum* spp perteneciente al consorcio 15IGe1 y *Stichococcus* spp perteneciente al consorcio 15IRe1.

Se añadió agar al medio M1 modificado y se repartieron 40 mL en tres cajas Petri, luego se inocularon dos gotas de cada consorcio en cada una de las cajas y se esparció con un asa bacteriológica estéril. Se colocó su respectiva tapa y se cubrió la caja con papel parafilm, se invirtieron las cajas Petri y se colocaron a 24° C con un fotoperíodo de 24 horas, iluminación de 4500 lux durante dos semanas. Las microalgas fueron observadas en el microscopio invertido.

3.3.4. Preparación del medio de cultivo

Se utilizaron 3 tubos de ensayo con 5 mL de medio M1 modificado y se colocó una pequeña cantidad de cada microalga aislada de su respectiva caja Petri con un fotoperíodo de 24 horas a 24° C con iluminación de 4500 lux, colocando un tapón en la parte superior del tubo para que este tenga aireación por dos semanas. El medio de cultivo usado para el crecimiento microalgal fue el medio M1 modificado.

3.3.4.1. Medio de cultivo M1 modificado

Se preparó el medio en tres frascos diferentes de acuerdo a la cantidad de volumen requerida, se midió el volumen de agua destilada con una pipeta de 1000 mL, posteriormente se autoclavaron los tres frascos durante 90 minutos a una presión de 15 PSI y una temperatura de 121° C. La composición del medio M1 modificado se muestra en la Tabla 5 (Salas, 2015).

Tabla 5

Composición del medio de cultivo M1 modificado para 1000 mL

SALES	CONCENTRACIÓN
Stock I	(g/L)
KH ₂ PO ₄	0.3
K ₂ HPO ₄	0.18
Stock II	(g/L)
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.002
Stock III	(g/L)
NaCl	0.1
CaCl ₂	0.02
MgSO ₄	2.65
FeSO ₄	0.002
KNO ₃	0.7025
KCl	0.30
ZnSO ₄	0.0007
H ₃ BO ₃	0.034
EDTA	0.03
MnSO ₄	0.003
	0.02 mg
CoCl ₂	0.3 µg
	0.04 mg

Fuente: (Salas, 2015)

3.4. Condiciones del cultivo de microalgas psicrófilas antárticas

Una vez que se obtuvo crecimiento en cada tubo de ensayo, se procedió a masificar en 18 frascos de 250 mL. Los géneros *Chlorella* spp *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp se inocularon en el medio M1 modificado en tres frascos de 250 mL por cada género a temperaturas de 4° C y 24° C. A cada uno de los frascos se le añadió un sistema para proporcionar aireación de 0,5 L/min, se unió un vidrio fusible con un diámetro de 0.6 mm a una manguera, este sistema se encontraba conectado a una Bomba 5000 Power de 60 Hz, 5 W y 110 V con 2 salidas. Se colocó iluminación utilizando lámparas a 5000 lux con un fotoperíodo 12:12 horas.

Se monitoreo los frascos cada día. Se realizó un conteo celular utilizando la cámara de Neubauer cada 3 días. Se llevó un registro de los datos durante 28 días para obtener valores en la gráfica de absorbancia vs concentración de lípidos, utilizando el programa Excel 2008.

3.5. Determinación de lípidos

3.5.1. Método de extracción de Bligh & Dyer

Se colocó 5 mL de cada frasco con su respectiva microalga a distintas temperaturas en 18 tubos de ensayo, colocando papel aluminio en la parte superior para evitar la contaminación, se colocaron en la estufa a 80° C en un período de 48 horas.

Luego de transcurrir este tiempo se adicionó 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo metanol (1:2).

Se sonicaron los tubos de ensayo (Tubo 1) en 3 ciclos de 15 minutos añadiendo agua destilada y hielo.

Se incubaron los tubos a 4° C por 24 horas protegiéndolos de la luz con papel aluminio.

Al día siguiente se sonicaron los tubos en 3 ciclos de 15 minutos añadiendo agua destilada y hielo.

Se centrifugaron a 4700 rpm durante 20 minutos a 24° C, se procede a recuperar los extractos con una pipeta Pasteur, para traspasar el sobrenadante a nuevos tubos de 15 mL (Tubo 2).

Se agregaron 1.5 mL de una mezcla de solventes cloroformo metanol (1:2) a la biomasa residual del (Tubo 1), este paso se realiza para la extracción de mas lípidos de biomasa seca de las microalgas.

Se volvió a centrifugar a 4700 rpm durante 20 minutos a 24° C recuperando más extracto del (Tubo 1) para colocarlo en el (Tubo 2).

Se agregó 2 mL de agua destilada del (Tubo 2) que contiene el extracto y se agitó en el vortex.

Se eliminó el exceso de agua con una pipeta Pasteur, y se realizó la última centrifugación a 4700 rpm durante 10 minutos a 24° C para separar la fase inferior formada por cloroformo y lípidos.

Luego se añadió 1 mL de cloroformo para separar aún más la fase inferior, se introdujo una pipeta Pasteur con mucho cuidado, se burbujeó aire hasta el fondo del tubo.

Se pasó la fase de cloroformo y lípidos del (Tubo 2) al (Tubo 3), y se midió cuanto volumen se tomó.

Se lavó la fase acuosa con 1 mL de cloroformo, se mezcló en el vortex y se procedió a centrifugar a 4700 rpm durante 10 minutos a 24° C, se recuperó la fase inferior y se colocó en (Tubo 3).

Se dejó en baño maría toda la noche con agitación a 37° C sin tapa.

Al siguiente día, luego que el cloroformo se evaporó, se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Se sellaron los tubos con papel aluminio con el fin de evitar contaminación, se preparó un blanco (Tubo con ácido sulfúrico).

Se calentaron los tubos en una estufa a 200° C por 15 minutos sin tapas.

Se colocaron los tubos en el refrigerador a 4° C para que se enfríen, se añadió 3 mL de agua destilada.

Se sonicaron los tubos por 15 minutos y se mezcló con vortex hasta que la muestra quedó homogénea y sin residuos de materia orgánica.

Se pasó las muestras a las celdas y se realizó la lectura de la absorbancia a 375 nm en el espectrofotómetro. Los materiales utilizados se observan en la Tabla 6.

Tabla 6

Materiales utilizados en el Método de Bligh & Dyer

Equipos	Materiales	Reactivos
Refrigeradora	Tubos de ensayo	Agua destilada
Sonicador	Papel aluminio	Hielo
Centrífuga	Frascos de vidrio	Cloroformo
Vortex	Probeta de 100 mL	Metanol
Balanza digital	Pipetas	Ácido sulfúrico
	Cajas Petri	
	Estufa	

3.5.2. Cuantificación de lípidos extraídos por espectrofotometría

La cantidad de lípidos extraídos de los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp fue obtenida en el

espectrofotómetro. Para realizar la cuantificación se desarrollaron todos los pasos mencionados anteriormente en el Método de extracción de Bligh & Dyer para medir la absorbancia a 375 nm. La concentración de lípidos obtenidos de cada género a diferente temperatura se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{Lípidos}] = \left(\frac{Ab - 0.0126}{2.8311} \right) \times \frac{3.5}{V_{ext}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde: Ab (Absorbancia), Vext (Volumen extraído de la muestra). La concentración de lípidos nos indicó la producción lipídica en el tiempo. Estos datos se calcularon a través del programa SPSS 15.0

La ecuación de la recta se obtuvo con experimentos previamente realizados en la Universidad Central del Ecuador.

$$y = 2.831 + 0.0126 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$R^2 = 0.999$$

3.6. Determinación de la curva de crecimiento de *Stichococcus* spp.

3.6.1. Peso seco

Para la obtención del peso seco del género *Stichococcus* spp. en la fase estacionaria para determinar de la curva de crecimiento, primero se pesaron los tubos de ensayo en la balanza analítica antes de colocar el volumen de cada frasco, luego se colocó 5 mL de cada frasco a temperatura de 4° C y 24° C en los 6 tubos de ensayo medidos anteriormente, se utilizó papel aluminio en la parte superior para evitar contaminación en la muestra, luego se colocaron los tubos en la estufa a 80° C en un período de 48 horas. Una vez obtenida la biomasa seca dentro de cada tubo, se volvió a pesar en la balanza analítica, los resultados fueron llevados en un registro y se analizaron utilizando el programa Excel 2008.

3.7. Análisis estadístico

Mediante el análisis de ANOVA y Test de Duncan se determinó el factor temperatura y género en la producción de lípidos para la síntesis de biocombustible a través del programa SPSS 15.0

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp.

Los tres géneros de microalgas psicrófilas presentes en los glaciares de la Antártida producen lípidos para la síntesis de biocombustible, siendo el género *Chlorella* sp el de mayor concentración con un valor de 0,2802 mg/mL a una temperatura de 4° C y un valor de 2,6704 mg/mL a una temperatura de 24° C en e día 22 de su fase exponencial.

Todas las muestras de microalgas obtenidas de los consorcios 15IGa2, 15IGc1 y 15IRe1 de la Isla Greenwich y la Isla Roberts del archipiélago Antártico fueron masificadas inicialmente a un volumen de 5 mL, de los cuales se aislaron los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp hasta alcanzar un volumen de 250 mL, en un fotoperíodo de 24 horas con aireación e iluminancia de 4500 lux. Luego se realizó la extracción de lípidos a partir de las microalgas psicrófilas antárticas utilizando el método de Bligh & Dyer para la síntesis de biocombustible.

Los géneros *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp generaron poca cantidad de lípidos a distintas temperaturas, tomando en cuenta que la concentración lipídica es baja, no se descarta que otros factores hayan influido en la producción de lípidos.

4.1.1. Masificación

Las muestras de microalgas obtenidas de los consorcios 15IGa2, 15IGc1 y 15IRe1 de la Isla Greenwich y la Isla Roberts del archipiélago Antártico fueron conservadas en 3 tubos de ensayo, con medio M1 modificado, en un fotoperíodo de 24 horas a una temperatura de 24° C con aireación e iluminancia de 4500 lux.

Luego del transcurso de dos semanas de realizar el aislamiento, se observaron las microalgas aisladas en su respectiva caja Petri, y se procedieron a inocular los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp. en el medio M1 modificado con tres repeticiones de cada uno en frascos de 250 mL a 4° C y 24° C en un fotoperíodo 12:12 horas, con aireación moderada y con iluminancia de 5000 lux.

4.1.2. Análisis del crecimiento celular a distintas temperaturas

Los valores que se indican en la Tabla 7 y Tabla 8 en relación al crecimiento celular a la temperatura de 4° C, indicaron que en tres repeticiones (A, B y C), el número promedio de células de *Chlorella* spp por cada mL en la fase exponencial en el día 22 fue de 285´000 000 cel/mL, en comparación con el género *Chlorococcum* spp que fue de 95´100 000 cel/mL, ambas microalgas se encontraban a la misma temperatura, fase, iluminación, fotoperíodo y aireación.

Tabla 7
Promedio del crecimiento celular del género *Chlorella* spp a 4° C

Chlorella/mL				
DÍAS	A	B	C	PROMEDIO
0	0	0	0	0
4	1,40E+06	1,38E+06	1,39E+06	1,39E+06
11	3,10E+06	3,09E+06	3,11E+06	3,10E+06
15	2,80E+07	2,90E+07	2,84E+07	2,85E+07
18	1,00E+08	1,04E+08	1,08E+08	1,04E+08
22	2,90E+08	2,81E+08	2,85E+08	2,85E+08
25	2,60E+08	2,55E+08	2,67E+08	2,61E+08

Tabla 8**Promedio del crecimiento celular del género *Chlorococcum* spp a 4° C**

Chlorococcum/mL				
DÍAS	A	B	C	PROMEDIO
0	0	0	0	0
4	4,67E+05	4,60E+05	4,63E+05	4,63E+05
11	1,03E+06	1,03E+06	1,04E+06	1,03E+06
15	9,33E+06	9,67E+06	9,47E+06	9,49E+06
18	3,33E+07	3,47E+07	3,60E+07	3,47E+07
22	9,67E+07	9,37E+07	9,50E+07	9,51E+07
25	8,67E+07	8,50E+07	8,90E+07	8,69E+07

Las tres repeticiones (A, B y C) del género *Stichococcus* spp a una temperatura de 4° C indicaron un valor promedio de células por cada gramo en el día 22 de su fase exponencial de 0,88 cel/g, en este caso se realizó el conteo por peso seco, debido a que no se puede ejecutar un conteo celular en la Cámara de Neubauer debido a su morfología. Los valores se observan en la Tabla 9.

Tabla 9**Promedio del crecimiento celular del género *Stichococcus* spp a 4° C**

Stichococcus/g				
DÍAS	A	B	C	PROMEDIO
0	0	0	0	0
4	0,02	0,02	0,02	0,02
11	0,16	0,17	0,16	0,16
15	0,38	0,36	0,36	0,37
18	0,65	0,68	0,68	0,67
22	0,88	0,90	0,88	0,88
25	0,74	0,78	0,78	0,76

Los datos que se indican en la Tabla 10 y Tabla 11 en relación al crecimiento celular a 24° C, mostraron que en tres repeticiones (D, E y F) el número celular promedio de *Chlorella* spp por cada mL en la fase exponencial en el día 22 fue de 604'000 000 cel/mL en comparación con el género *Chlorococcum* spp que fue de 201'000 000 cel/mL, ambos géneros se encontraban en iguales condiciones.

Tabla 10

Promedio del crecimiento celular del género *Chlorella* spp a 24°C

Chlorella/mL				
DÍAS	D	E	F	PROMEDIO
0	0	0	0	0
4	1,35E+06	1,36E+06	1,34E+06	1,35E+06
11	1,38E+08	1,48E+08	1,52E+08	1,46E+08
15	3,53E+08	3,05E+08	3,11E+08	3,23E+08
18	4,70E+08	4,75E+08	4,80E+08	4,75E+08
22	6,00E+08	6,02E+08	6,10E+08	6,04E+08
25	5,26E+08	4,78E+08	5,18E+08	5,07E+08

Tabla 11

Promedio del crecimiento celular del género *Chlorococcum* spp a 24°C

DÍAS	Chlorococcum/mL			
	D	E	F	PROMEDIO
0	0	0	0	0
4	4,50E+05	4,53E+05	4,47E+05	4,50E+05
11	4,60E+07	4,94E+07	5,05E+07	4,86E+07
15	1,18E+08	1,02E+08	1,04E+08	1,08E+08
18	1,57E+08	1,58E+08	1,60E+08	1,58E+08
22	2,00E+08	2,01E+08	2,03E+08	2,01E+08
25	1,75E+08	1,59E+08	1,73E+08	1,69E+08

Las tres repeticiones (D, E y F) del género *Stichococcus* spp a 24° C presentaron un valor promedio de células por cada gramo en el día 22 de su fase exponencial de 1,18 cel/g, el conteo celular se lo realizó mediante peso seco. Los valores se indican en la Tabla 12.

Tabla 12

Promedio del crecimiento celular del género *Stichococcus* spp a 4° C

Stichococcus/g				
DÍAS	D	E	F	PROMEDIO
0	0	0	0	0
4	0,13	0,15	0,15	0,14
11	0,30	0,30	0,29	0,30
15	0,60	0,63	0,63	0,62
18	0,80	0,83	0,80	0,81
22	1,15	1,18	1,20	1,18
25	0,85	0,78	0,78	0,80

Los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp crecieron en el medio M1 modificado que contenía varios macronutrientes y micronutrientes para aportar en el crecimiento microalgal (Salas, 2015).

En la Figura 8 Y Figura 9 se observa que la microalga *Chlorella* spp tuvo mayor crecimiento celular a los 28 días en sus tres repeticiones a 4° c y 24° C en relación con el género *Chlorococcum* spp que se indica en la Figura 10 y Figura 11.

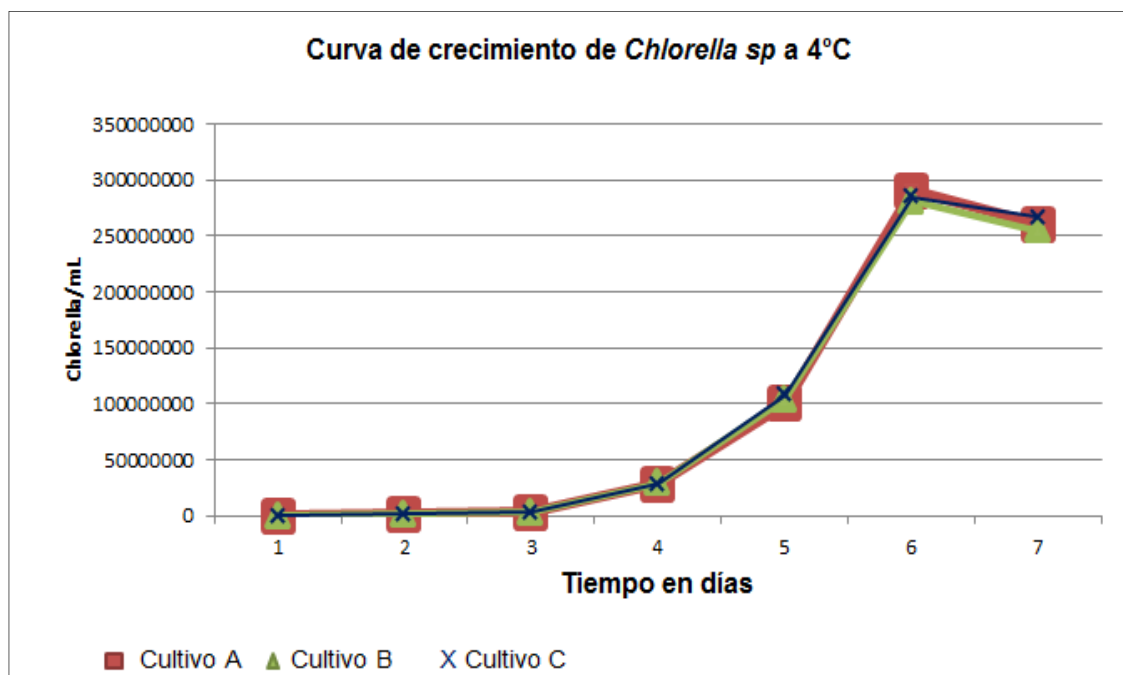


Figura 8 Curva de crecimiento de *Chlorella spp* cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 4° C

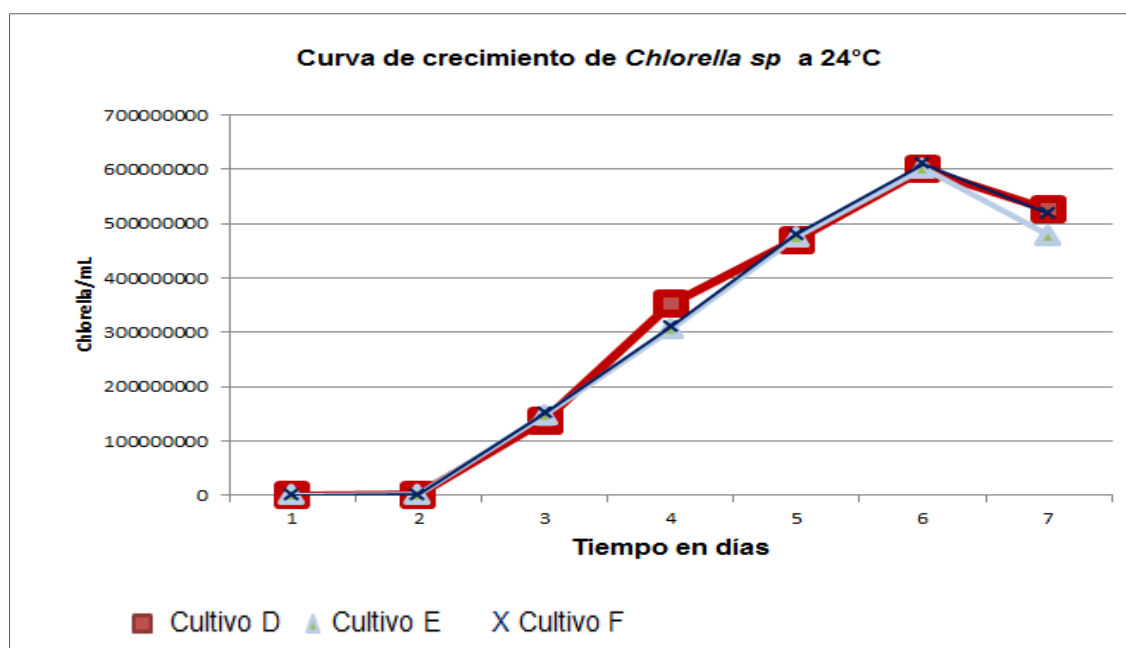


Figura 9 Curva de crecimiento de *Chlorella spp* cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 24° C

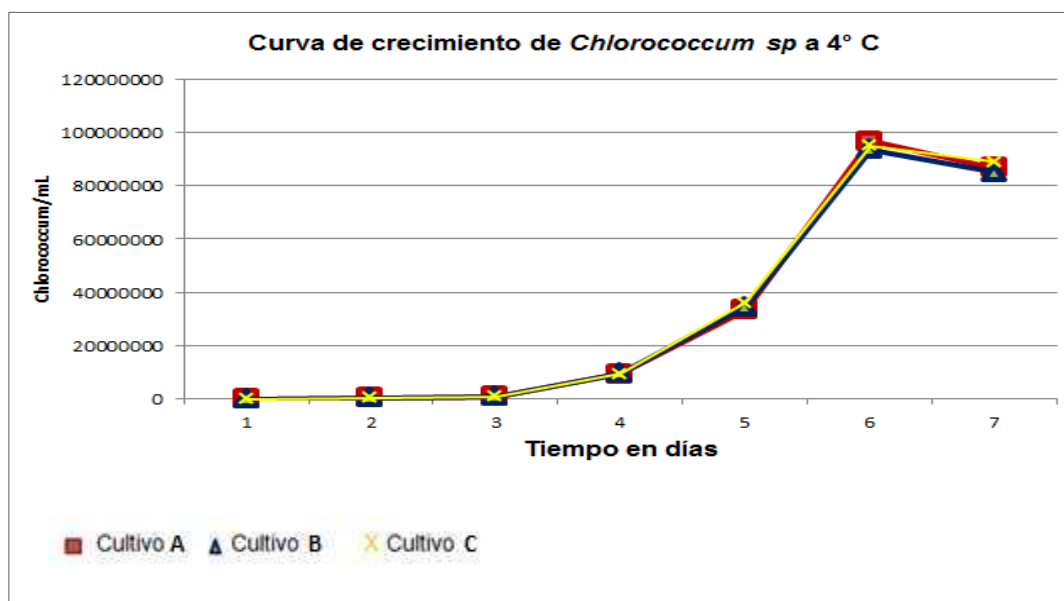


Figura 10 Curva de crecimiento de *Chlorella spp* cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 4° C

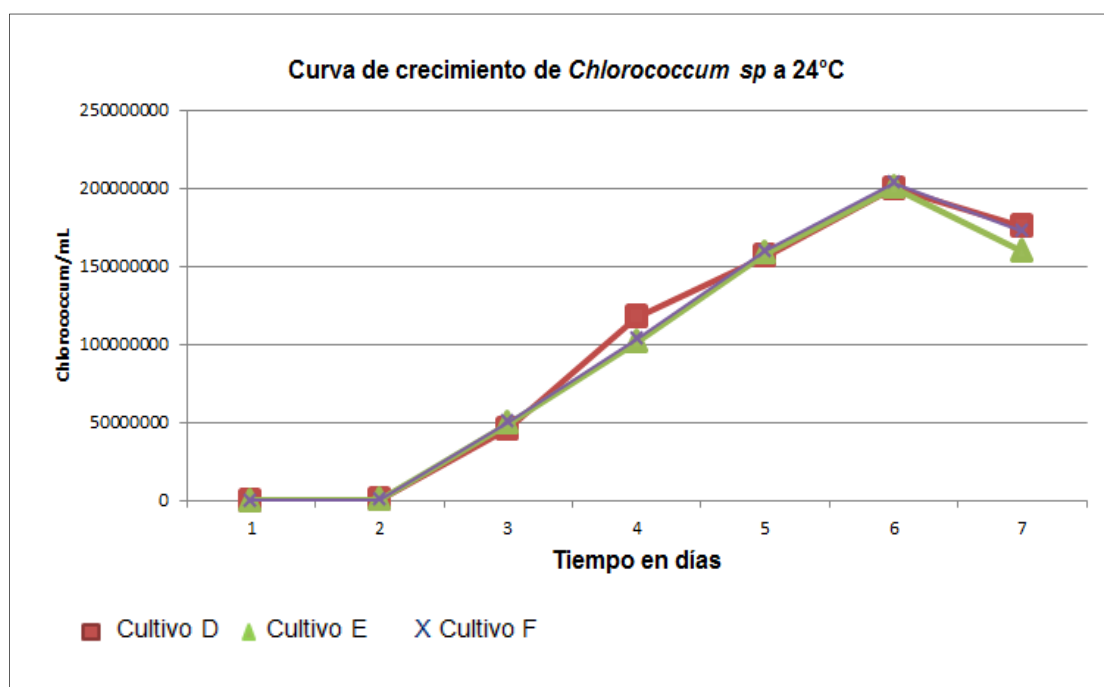


Figura 11 Curva de crecimiento de *Chlorococcum spp* cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 24° C

En la Figura 12 Y Figura 13 se muestra el crecimiento celular de *Stichococcus* spp a los 28 días, con tres repeticiones a distintas temperaturas. Esta microalga se encontraba a las mismas condiciones que *Chlorella* spp y *Chlorococcum* spp.

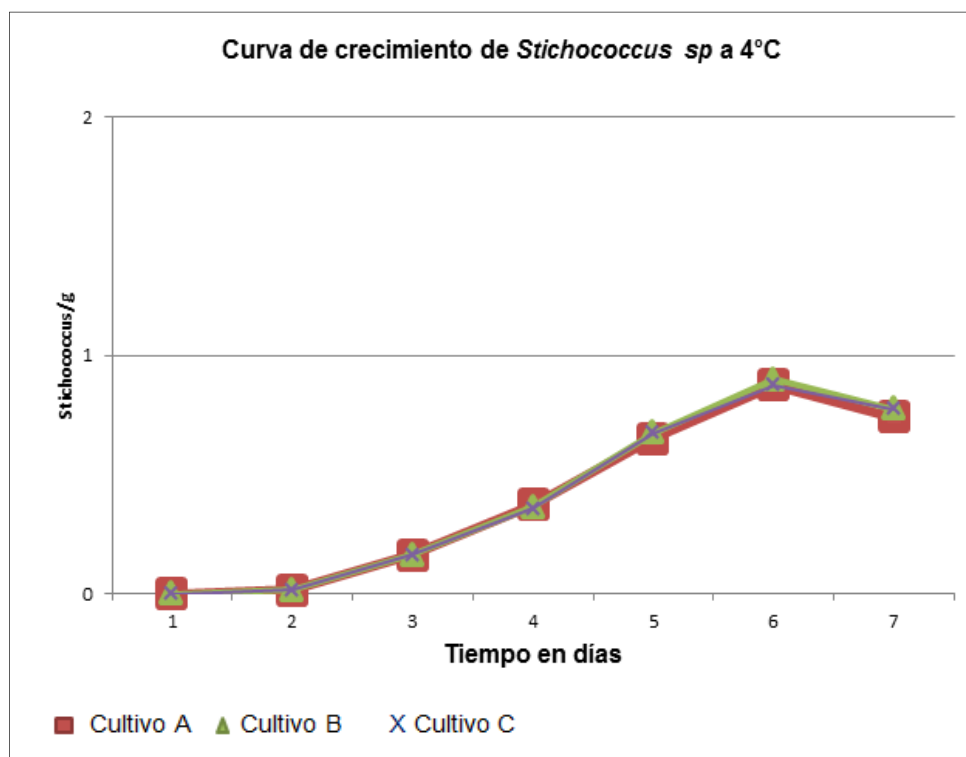


Figura 12 Curva de crecimiento de *Stichococcus* spp cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 4° C

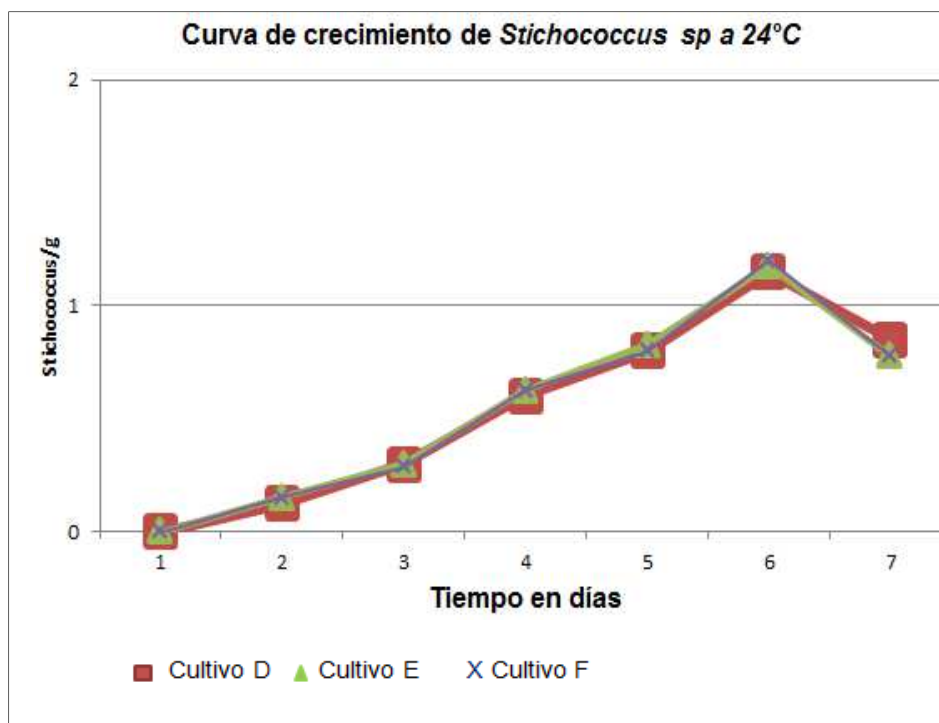


Figura 13 Curva de crecimiento de *Stichococcus* spp cultivado en medio M1 modificado en 3 repeticiones a 24° C

El género *Chlorella* spp presentó mayor crecimiento celular hasta el día 22 de su fase exponencial en comparación con los géneros *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp, debido a que tiene una mejor capacidad de absorción del CO₂, es por esto que captó todos los nutrientes contenidos en el medio de cultivo utilizado que en este caso fue el M1 modificado (Khotimchenko & Yakolevka, 2005).

El tiempo en el que se generaron las células microalgales es óptimo para la producción de lípidos y posteriormente sinterizar biocombustible y varios metabolitos. Además hay que destacar que el medio de cultivo M1 modificado favorece el crecimiento de la microalga debido a los componentes de nitrógeno y fósforo que presenta en su composición (Fernández, Sánchez, & Molina, 2001)

El crecimiento celular de *Chlorella* spp se puede identificar en el color de acuerdo a la luz que la microalga recibe. A una temperatura de 4° C mostraron una

coloración verde oscura, esto se da por las cianelas que poseen en su interior. En cuanto a los frascos conservados a 24° C tomaron un tono verde claro, luego de 7 días sufren una deterioración por el efecto fotooxidativo ya que la luz y el oxígeno exterior actúan como factores secundarios sobre la microalga, por lo que se colocó mas cantidad de volumen del medio M1 modificado, esto hace que las células adquieran nuevamente los nutrientes que se administraron en un comienzo y así poder asimilar componentes que aún no han sido captados por el género (Chisti, 2007).

El medio M1 modificado no fue aprovechado por los géneros *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp, para su crecimiento celular. Uno de los factores que influye es la composición que el medio posee, por esta razón se debe probar otros medios de cultivo diferentes hasta encontrar el adecuado en próximos proyectos para realizar el crecimiento celular y posteriormente la extracción de lípidos (Jaramillo, 2011).

El medio de cultivo BBM permite el desarrollo de una gran cantidad de células de *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp a pesar de que presenta un poco cantidad de nitrógeno en su composición (Kuma, 2010).

4.1.3. Medición de lípidos extraídos

Los datos obtenidos en la Tabla 13 en relación a la extracción de lípidos de los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp, indicaron que la concentración lipídica del género *Chlorella* spp a una temperatura de 4° C en el día 22 de la fase exponencial fue de 0,2802 mg/mL en comparación con el género *Chlorococcum* spp que presentó una concentración de 0,0922 mg/mL y el género *Stichococcus* spp que fue de 0,0685 mg/mL. Todos los géneros se encontraban a las mismas condiciones de aireación, luz y fotoperiodo. De igual manera la concentración de lípidos extraídos a una temperatura de 24° C fue mayor en el género *Chlorella* spp en el día 22 de la fase exponencial con un valor de 2,6702

mg/mL, mientras que en los géneros *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp, la concentración fue de 0,8890 mg/mL y 0,5595 mg/mL respectivamente como se observa en la Tabla 14.

Tabla 13

Concentración de lípidos de los géneros de microalgas a 4° C

Días	Lípidos <i>Chlorella</i> spp [mg/mL]	Lípidos <i>Chlorococcum</i> spp [mg/mL]	Lípidos <i>Stichococcus</i> spp [mg/mL]
0	0	0	0
4	0,1167	0,0380	0,0177
11	0,1682	0,0549	0,0445
15	0,1961	0,0642	0,0519
18	0,2130	0,0698	0,0551
22	0,2802	0,0922	0,0685
25	0,2403	0,0789	0,0587

Tabla 14

Concentración de lípidos de los géneros de microalgas a 24° C

Días	Lípidos <i>Chlorella</i> spp [mg/mL]	Lípidos <i>Chlorococcum</i> spp [mg/mL]	Lípidos <i>Stichococcus</i> spp [mg/mL]
0	0	0	0
4	0,0740	0,0238	0,0180
11	0,2331	0,0765	0,0653
15	0,2765	0,0910	0,0671
18	1,2562	0,4175	0,1785
22	2,6704	0,8890	0,5595
25	1,7097	0,5687	0,4309

En la Figura 14 y Figura 15 se observan los promedios de las concentraciones

de lípidos a los 28 días, con tres repeticiones a una temperatura de 4° C y 24° C.

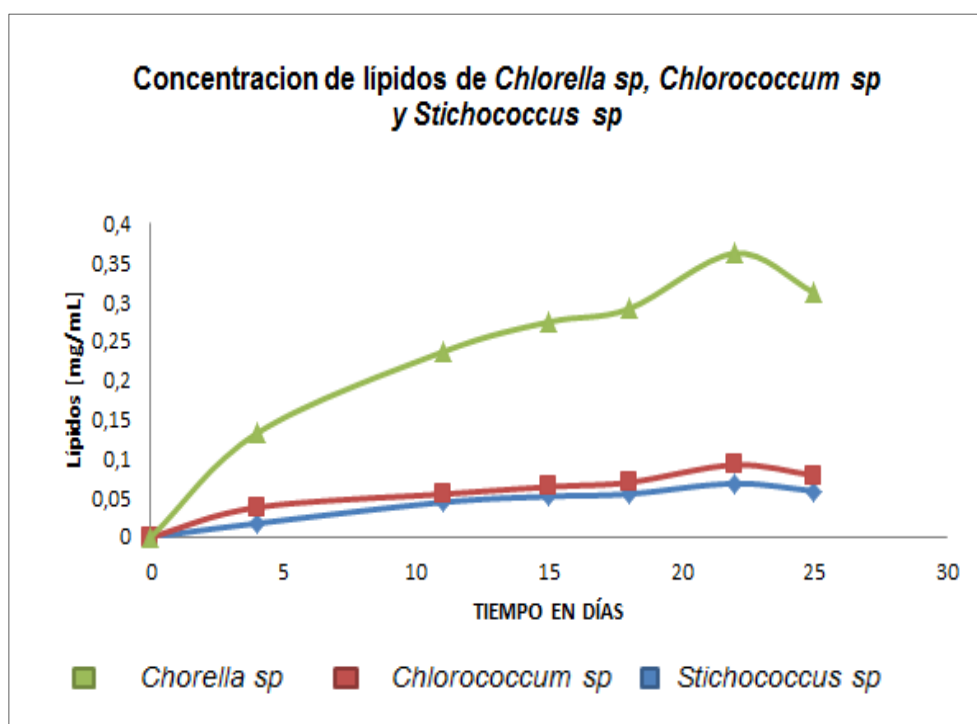


Figura 14 Concentración promedio de lípidos de *Chlorella sp.*, *Chlorococcum sp.* y *Stichococcus sp.* a 4° C

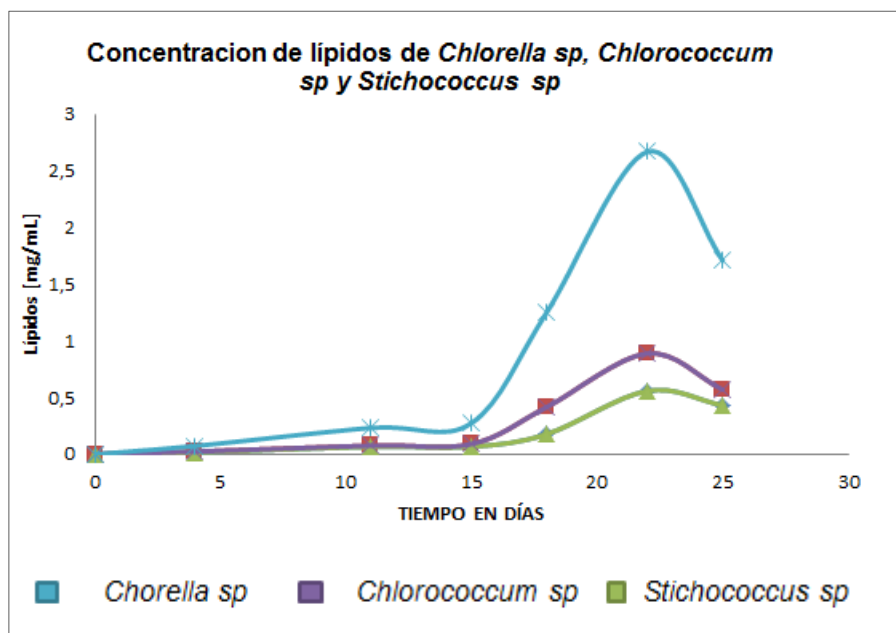


Figura 15 Concentración promedio de lípidos de *Chlorella spp.*, *Chlorococcum spp.* y *Stichococcus spp.* a 24° C

Chlorella spp. adaptada a 4° C mostró mayor concentración de lípidos en comparación con *Chlorococcum spp.* y *Stichococcus spp.*. Las temperaturas inferiores aumentaron el nivel de insaturación y la intensidad de la luz de 5000 lux favoreció a la microalga en la acumulación de triglicéridos con un elevado nivel saturación (Anderson & Katja, 2003).

Además el género *Chlorella spp.* a 24° C presentó mayor producción de lípidos por la captación de la energía solar y el CO₂ del medio ambiente. Esta microalga es uno de los géneros que mayor porcentaje de lípidos posee, la especie *Chlorella emersonii* produce 63 % en comparación con la especie *Chlorococcum oleofaciens* que presenta 44,3 % (Faife, Otero, & Álvarez, 2012).

Chlorella spp. presenta mayor productividad de lípidos a distintas temperaturas por el alto nivel de triglicéridos que contiene, además de la constitución genética, la

intensidad lumínica, pH, salinidad, minerales que fueron factores que influyeron en la producción lipídica (Lee, Lewis, & Ahsman, 2009).

En los tres géneros estudiados existe una variación en el contenido de lípidos. Los géneros *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp mostraron niveles lipídicos muy bajos debido a que su crecimiento celular se pudo dar en condiciones desfavorables, no hubo las condiciones de estrés suficientes y no asimilaron todos los nutrientes del medio de cultivo administrado en ambas temperaturas (Liang, Dong, Miao, & Dai, 2006).

El medio de cultivo óptimo para estos géneros de microalgas es el BBM o Bristol debido a que contiene una solución stock de macronutrientes, un stock de micronutrientes y un stock de trazas.

Además se debe tomar en consideración el pH del medio, las concentraciones de cada uno de los stocks, la composición del nitrógeno, además de los factores externos para el desarrollo del crecimiento celular de las microalgas (MALGAS, 2013).

Los géneros *Chlorella* spp y *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp presentaron producción de lípidos a distintas temperaturas, estos resultados se obtuvieron gracias a la aplicación del método de Bligh & Dyer, que permite extraer una gran cantidad de ácidos grasos utilizando metanol y cloroformo como disolventes, sin el uso de calor (Salas, 2015)

Se realizó el análisis de varianza para el crecimiento celular de *Chlorella* spp y *Chlorococcum* spp a diferentes temperaturas, donde se verificaron estas hipótesis.

Se realizó el análisis de varianza para la concentración lipídica de los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp a diferentes temperaturas, donde se verificaron estas hipótesis.

Ho: Efecto género de microalga = 0

Ha: Efecto género de microalga $\neq 0$

Ho: Efecto temperatura = 0

Ha: Efecto temperatura $\neq 0$

Por medio del análisis de varianza o ANOVA en el programa SPSS 15.0 como se muestra en la Tabla 15, se verificó que las significancias dadas por el factor género de microalga y temperatura, relacionando con la significancia de 0.05 son menores, por lo que se procede a rechazar las hipótesis nulas de igualdad en los factores. Por tal motivo, se analizó que el género de microalga *Chlorella* spp tuvo mayor concentración lipídica a diferentes temperaturas.

Tabla 15

Análisis de ANOVA o de varianza de los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp *Stichococcus* spp a distintas temperaturas.

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de Cuadrados Tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Modelo	4,054	5	0,811	3,935	<0,0001
Género	1,647	2	0,823	3,996	<0,0001
Temperatura	1,646	1	1,646	7,987	<0,0001
Error	6,181	30	0,206		
Total	13,917	36			

Nota: Para que se acepte la hipótesis nula $P > 0.05$. F = Relación de cuadrados medios, P = significación

Se analizó la Prueba de Duncan mediante el programa SPSS 15.0 para comprobar el género de microalga que tuvo mayor producción de lípidos tomando

en consideración la temperatura en la que cada uno de ellos se encontraba. En la Tabla 16 se realizó el análisis del factor género, dando como resultado que la microalga *Chlorella* spp nos indica un valor de la media de 0,619, el valor es elevado por lo que se agrupo en un subconjunto, mientras que el género *Chlorococcum* spp mostró un valor de media de 0,205 y el género *Stichococcus* sp tuvo un valor de media de 0,134, presentando niveles bajos por este motivo se agruparon en el mismo subconjunto.

Tabla 16

Prueba de Duncan de los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp *Stichococcus* spp a distintas temperaturas.

Prueba de Duncan Alfa = 0,05			
Error: 0,206		gl: 30	
Género	Medias	N	Subconjunto
<i>Chlorella</i> spp	0,619	12	1
<i>Chlorococcum</i> spp	0,205	12	2
<i>Stichococcus</i> spp	0,134	12	2

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El género *Chlorella* spp presentó mayor concentración con un valor de 0,2802 mg/mL a una temperatura de 4° C y un valor de 2,6704 mg/mL a una temperatura de 24° C en e día 22 de su fase exponencial en comparación con los géneros *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp
- El análisis de la composición lipídica muestra que la temperatura y composición del medio de cultivo M1 modificado son importantes para la adaptación de las células microalgales, cuando estas se encuentran a temperaturas de 4°C y 24° C, de las cuales las muestras adaptadas a temperatura ambiente mostraron mayor crecimiento celular.
- Todas las muestras de microalgas obtenidas de los consorcios 15IGa2, 15IGc1 y 15IRe1 de la Isla Greenwich y la Isla Roberts del archipiélago Antártico fueron masificadas inicialmente a un volumen de 5 mL, de los cuales se aislaron los géneros *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp hasta alcanzar un volumen de 250 mL, en un fotoperíodo de 24 horas con aireación e iluminancia de 4500 lux.
- Se realizó la extracción de lípidos a partir de las microalgas psicrófilas antárticas utilizando el método de Bligh & Dyer para la síntesis de biocombustible.
- El género *Chlorella* spp genera mayor cantidad de lípidos a una temperatura de 24° C, y en poca cantidad a una temperatura de 4° C.
- Los géneros *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp generaron poca cantidad de lípidos a distintas temperaturas, tomando en cuenta que la concentración lipídica es baja, no se descarta que otros factores hayan influido en la producción de lípidos.

5.2 Recomendaciones

- A pesar de que en el presente proyecto se demuestra que los géneros de microalgas *Chlorella* spp, *Chlorococcum* spp y *Stichococcus* spp producen lípidos, se recomienda realizar la generación lipídica en microalgas, cianobacterias, clorofitas y diatomas del archipiélago antártico y de glaciares de nevados en el Ecuador.
- De igual manera se debe realizar investigaciones en otros géneros microalgales para la producción de carbohidratos, polisacáridos, proteínas.
- Extraer lípidos de las microalgas que no fueron adaptadas a los 21 días de los consorcios de la isla Roberts e isla Greenwich localizadas en la Antártida.
- Encontrar otros métodos de extracción para determinar mayor concentración de lípidos a partir de las microalgas psicrófilas.
- En investigaciones posteriores se debe tomar en cuenta el medio de cultivo y otros factores como la temperatura, la luz, el pH, la salinidad, para mejorar el crecimiento celular de la microalga y así poder extraer mayor cantidad de lípidos para la síntesis de biocombustible.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Baky, A., & El-Baroty, G. (2013). Healthy benefit of microalgal bioactive substances. *Aquatic Science*, 1(1), 11-23.
- Ahmad, F., Khan, A., & Yasar, A. (2012). Uptake of nutrients from municipal wastewater and biodiesel production by mixed algae culture. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(7). 550-554.
- AINEnergía. (2015). *Biodiesel a partir de microalgas: ventajas y desventajas*. Recuperado el 07 de septiembre de 2016, de <http://ainenergia.com/biodiesel-a-partir-de-microalgas-ventajas-y-desventajas/>
- Albarracín. (2007). *XV Simposio Electrónico Internacional. La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad, equidad*. Microalgas: Potenciales Productores de Biodiesel.
- Alvear, M., Castillo, C., & Henao, D. (2011). Evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella nativa* como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel.
- Amaro, H., Guedes, C., & Malcata, X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3402-3410.
- Anderson, J., & Katja, P. (2003). Does Excessive Phosphorus Necessarily Cause Increasing Biomass of Diazotrophic Cyanobacteria? *Proceedings of the Estonian Academy Sciences*, 52(3), 205-217.
- ASOCAE. (2011). *Política económica del Antártico*. Recuperado el 10 de septiembre de 2016, de http://www.natureduca.com/ant_eco_politicaecon.php

- BancoMundial. (2013). *Indicadores del desarrollo mundial*. Recuperado el 11 de septiembre de 2016, de <http://datos.bancomundial.org/indicador/EG.USE.COMM.FO.ZS/countries>
- Barraza, C., Collao , V., Espinoza, C., Moya , F., & Thun, G. (2009). *Producción de biodiesel a partir de microalgas*. Monografía. Valparaíso: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Barreiro, J., & Sandoval, A. (2006). *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*. Caracas. Venezuela: Editorial Equinoccio, Universidad de Simón Bolívar.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae, Anatomy, Biochemistry and a Biotechnology*. Boca Ratón. Florida: Tylor & Francis Group.
- BEAM. (2013). *History of Microalgae Culture*. Recuperado el 07 de Septiembre de 2016, de <http://www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAM-App10.html>
- Bérmudez. (2012). Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel.
- Cárdenas, P. (2010). *Biodiesel a partir de microalgas antárticas. Estudio parámetros de crecimientos de éstas*. Trabajo de Grado. Punta Arenas: Universidad de Magallanes.
- Carvajal, A., Cadena, M., Molina, D., Romero, P., Gavilanez, F., & Morales, E. (2013). Cultivo de una cepa carotenogénica de *Chlorococcum* sp (Chlorophyta: Chlorococcales) aislada de rizósfera de *Vicia faba* (Haba). *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 36(2), 309-324.
- Carvalho, P., Silva, O., Baptista, M., & Malcata, F. (2011). Light Requirements in Microalgal Photobioreactors: An Overview of Biophotonic Aspects. *Appl Microbiological Biotechnology*, 89, 1275-1288.

- Castillo, C., Henao, D., & Tejada, L. (2011). *Obtención y comparación de los aceites obtenidos de las microalgas Dunaliella salina y Chlorella nativa como materia prima para la producción de biosiesel*. Trabajo de Grado. Cartagena: Programa de Ingeniería Química Universidad de Cartagena.
- Chen, P., Min, M., & Wang, L. (2009). Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2(4), 56-60.
- Chinnasamy, S., & Bhatnagar, A. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 101. 3097-3105.
- Chisti, Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Advances. Palmerston North. Nueva Zelanda: Elsevier.
- Cobos, M., Castro, J., & Cerdeira, L. (2014). Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del río Itaya, Loreto, Perú. *Ecología Aplicada*, 13(2).
- Colorado, M., Moreno, D., & Pérez, J. (2013). Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. La experiencia en La Guajira, Colombia. *Ambiente y Desarrollo*, 17(32), 113-126.
- Correa. (2013). *Comparación de la biodiversidad de hongos psicrófilos y psicrótrofos presentes en ecosistemas glaciares de la Antártida y el Chimborazo*. Tesis de Grado. Ambato. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
- Des Abbayes, H., Chadefaud, M., Grassé, P., Feldmann, J., & Prévot, A. (1989). *Botánica vegetales inferiores*. Barcelona: Reverté.
- Dortch, Q. (1990). The Interaction Between Ammonium and Nitrate Uptake in Phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 61, 183-201.

- EcuadorAntártico. (2014). La Estación Científica Pedro Vicente Maldonado hacia el estatus de base permanente. *Ecuador Antártico*, 6(7): 1-40.
- Faife, E., Otero, M., & Álvarez, A. (2012). Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable. *Redalyc*, 46(3), 26-35.
- Fernández, F., Sánchez, J., & Molina, Y. (2001). Airlift driven external loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae. *Chemical Engineering Science*, 56, 2721-2732.
- Flores. (2013). *Evaluación de algaspsicrófilas antárticas como posible fuente de energía renovable*. Recuperado el 12 de septiembre de 2016, de <http://docplayer.es/9880628-Evaluacion-de-algas-psicrofilas-antarticas-como-posible-fuente-de-energia-renovable-avance-semester-uno.html>
- Garbisu, C., Blanco, A., Alkorta, I., Llama, M., & Serra, J. (1999). Biotecnología con cianobacterias. *Investigación y Ciencia*, (272). 64-71.
- Garibay, A., Vásquez, D., Sánchez, M., Serrano, L., & Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *Bio Tecnología*, 13(3), 38-61.
- Gavilanez, F., Morales, E., & Molina, D. (2013). *Taller de biotecnología de microalgas y cianobacterias*. Quito: Instituto de Ciencias Básicas UCE.
- González, Á., Kafarov, V., & Guzmán, A. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospect*, 7(2), 53-60.
- Gouveia. (2011). Microalgae as a Feedstock for Biofuels. *SpringerBriefs in Microbiology*, DOI: 10.1007/978-3-642-17997-6_1.
- Hannon, Gimpel, Tran, Rasala, & Mayfield. (2010). Biofuels from algae: challenges and potential. *NIH Public Access*, 1(5): 763–784.

- Huang, Y., Chen, M., & Liu, D. (2008). Effect of Nitrogen, Phosphorus, Light Formation and Disappearance and Water Temperature on the of Blue - green Algae Bloom. *Journal of Northwest Science*, 36(9), 93-100.
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J., Barrios, F., & Zapata, C. (s.f.). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular.
- Jaramillo, J. (2011). Evaluación Tecno Económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Universidad Nacional de Colombia*, 109-112.
- Kanno, T., & Kazie, U. (2005). *Chlorella vulgaris* and *Chlorella vulgaris* extract (CVE): *The Powerfull Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier*. Woodland Publishing.
- Khotimchenko, S., & Yakolevka, I. (2005). Lipid composition of the red alga *tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, 66(1), 73-79.
- Klochkova, T., Kang, G., Cho, C., Pueschel, J., & Kim, H. (2006). Biology of a terrestrial green alga *Chlorococcum* sp. (Chlorococcales, Chlorophyta) collected from the Miruksazi stupa in Korea. *Phycology*, 45(3), 349-358.
- Kuma, N. (2010). Nutrient removal, growth response and lipid enrichment by a phytoplankton community. *Biomass Algal.*, 1(3), 1-28.
- Lee, A., Lewis, D., & Ahsman, P. (2009). Microbial flocculation, a potentially lowcost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J Apply Phycol*, 21, 559-567.
- Liang, X., Dong, W., Miao, X., & Dai, C. (2006). Production technology and influencing factors of microorganism grease. *Food Reserve Dissease*, 27(3), 46-47.
- Liu, C., Sun, H., & Zhu, L. (2006). Effects of Salinity Formed with Two Inorganic Salts on Freshwater Algae Growth. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 26(1), 157-161.

- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los microorganismos*. Illinois: Pearson Prentice Hall.
- MALGAS. (2013). *Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica*. Madrid, España: AST Ingeniería SL.
- Martínez. (2010). *Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga Haematococcus pluvialis (Chlorophyta: Volvocales) cultivada en diferentes medios*. México DF. México: Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y tecnología avanzada.
- Molina. (2015). Diversidad de microalgas en muestras colectadas entorno a la estación antártica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado en el verano austral de 2013 y 2014. *RAPAL*, 1-22.
- Monthieu, C. (2010). *Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel*. Proyecto de Fin de Carrera. Madrid: Universidad Pontificia Comillas.
- Navarrete, F., Demarco, A., Mambil, E., & Romera, N. (2013). *Modelo de producción de biodiesel a partir de algas en Argentina*. Recuperado el 12 de septiembre de 2016, de <http://www.dinamica-de-sistemas.com/revista/0613e-dinamica-de-sistemas>
- Salas. (2015). Perfil lipídico de microalgas antárticas recolectadas en febrero 2013 en el Archipiélago Schetland del sur. *Universidad Central del Ecuador*.
- Sánchez, Y., Piloto, R., Goyos, N., & Ferrer, N. (2012). Predicción del número de cetano de biocombustibles a partir de su composición de ácidos grasos. *Ingeniería Mecánica*, 15(2), 147-157.
- Santamaría, P., García, F., & Roselló, J. (2010). *Biología y Botánica*. (Vol.2). Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.

- Santos, M., & Mesquita, J. (1984). *Ultrastructural study of Haematococcus lacustris (Girod) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis*. Coimbra, Portugal: Universidad de Coimbra.
- Scheffler, J. (2007). Underwater Habits. *Illumin*, 9(4).
- Sivakumar, G., Jeong, K., & O Lay, J. (2014). Bioprocessing of *Stichococcus bacillaris* strain siva2011. *Biotechnology for Biofuels*, 7(62), 1-9.
- Tan, X., Kong, F., & Yu, Y. (2009). Effects of Enhanced Temperature on Algae Recruitment and Phytoplankton Community Succession. *China Environmental Science*, 29(6), 578-582.
- Ugwu, C., & Aoyagi, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99. 4021-4088.
- Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. (2007). *Fundamentos de Bioquímica*. Madrid: Médica Panamericana.
- Wackett, L. (2008). Microbial-based fuels: science and technology. *Microbial Biotechnology*, 1(3): 211-225.
- Zang, C., Huang, S., & Wu, M. (2011). Comparison of Relationships Between pH, Dissolved Oxygen and Chlorophyll a for Aquaculture and Nonaquaculture Waters. *Water Air and Soil Pollution*, 219(1), 157-174.