



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



DCBS
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA

*“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS EN CULTIVOS DE
MICROALGAS PARA ESTIMULAR LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS”*

Presenta:

Acosta Martínez María Lilian

Directora de Tesis

M. en B. Mónica C. Rodríguez Palacio
Laboratorio de Ficología Aplicada
Departamento de Hidrobiología

Asesor

M. en B. E. Sergio Álvarez Hernández
Laboratorio de Ficología Aplicada
Departamento de Hidrobiología

México, D.F. a 7 de Octubre de 2013

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

COMITÉ TUTORAL:



M. en B. Mónica Cristina Rodríguez Palacio

Laboratorio de Ficología Aplicada



M. en B.E. Sergio Humberto Álvarez Hernández

Laboratorio de Ficología Aplicada

LECTOR DE TESIS



M. en C. Cruz Lozano Ramírez

Laboratorio de Ficología Aplicada

DEDICATORIA

A mi abuelita Isaura Lara Palacios por ser mi ángel en todo este tiempo.

A Dios por darme salud, paciencia y amor para cumplir esta meta.

A mis padres Isabel - Raúl con todo mi amor y agradecimiento quiero dedicar este logro a ustedes por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo porque representan el amor que siempre me impulso a realizar este sueño; siendo ustedes la inspiración para tomar nuevos retos en la vida, por ser mi más claro y vivo ejemplo a seguir, por haber hecho de mi esta persona que soy ahora.

A mis maestros M. en C. Cruz Lozano y al M. en B .E. Sergio H. Álvarez por todo el aprendizaje y por abrirme las puertas hacia el conocimiento para ir creciendo más y más profesionalmente, por toda la confianza generada en estos ya 3 años, en especial a mi Tutora M. en B. Mónica Cristina Rodríguez Palacio por darme la oportunidad de demostrarle mi capacidad, por ser mi maestra, mi tutora y mi amiga en este camino, por el apoyo en momentos difíciles y los ratos de locura, sobre todo por el cariño que ha ido creciendo, haciendo de este laboratorio mi segundo hogar.

A mi novio y ahora esposo Aldo, por ser mi pareja y sobre todo por caminar a mi lado de la mano en este camino tan difícil de altas y bajas, por estar ahí cuando a veces no se tiene la paciencia necesaria para continuar, por su apoyo incondicional, por ser la gran persona que es ahora, por confiar plenamente en mí, por alentarme a seguir creciendo, por la confianza y por todo ese amor que me ha demostrado.

A mis hermanos: Silvia, Oscar, Daniel, Jessy y a mi prima Mónica gracias por su paciencia y apoyo incondicional que en todo momento me brindaron por su amor

que nunca faltó, por las preguntas hechas y por los regaños en el momento indicado, por ser mis compañeros de toda la vida.

A todos y cada uno de mis sobrinos por estar orgullosos de mí, pero en especial a los más pequeños: Noél e Isabella que llegaron en un momento mágico a imprimir esa alegría y amor que tanta falta nos hacía, a Noé por la amistad y esos buenos momentos de pláticas.

. A mis amigas: Quitzia, Elizabeth, Isabel y Pinita por estar presentes en toda esta etapa, por seguir presentes en cada momento importante de mi vida, por enseñarme el verdadero significado de amistad, por todo el amor y confianza.

A todos mis compañeros de laboratorio: Gerardo, Lolita, Alberto, Mabel, Claudia, Diego y Axel por su oportuna ayuda en la realización de esta tesis, por los buenos momentos y por su amistad, a Luciano por el material y ayuda que me brindo en la elaboración de mis experimentos.

Se agradece a la empresa Biomex, Biotecnología mexicana en Microalgas. S.A. de C.V por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación; así mismo al proyecto Divisional “Cultivo de Microalgas, Usos Potenciales. Caribe y Golfo de México”. DCBS-UAM-I.

Al Posgrado de Biotecnología por brindarme esta oportunidad y a la

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA.

CASA ABIERTA AL TIEMPO

“Ser libre no es hacer lo que uno quiere, sino querer lo que se hace.”

Jean-Paul Sartre

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Parámetros de los cultivos	14
1.2 Carbohidratos, lípidos y proteínas	15
1.3 Biodiesel	17
1.4 Pigmentos fotosintéticos	18
2 ANTECEDENTES	20
2.1 Clasificación e Importancia de las Especies de estudio	20
3 JUSTIFICACIÓN	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo General	27
4.2 Objetivos Específicos	27
5 METODOLOGÍA	27
5.1 Cultivos	27
5.2 Aislamiento y establecimiento de los cultivos clonales	33
5.3 Bioensayos de Estrés	35
5.4 Recuento celular	36
5.5 Curvas de calibración para análisis bromatológicos	38
6 ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS	40

7 RESULTADOS	40
7.1 Aislamiento y cultivo	40
7.2 Bioensayos de Estrés	41
7.3 Pigmentos	47
7.4 Análisis Bromatológicos	48
8 ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
9 LITERATURA CITADA	54

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de aceite en algunas microalgas.

Tabla 2. Composición química (en % de peso seco total) de diferentes microalgas de agua dulce y marina.

Tabla 3. Estudios sobre cultivos de microalgas para la producción de biocombustibles y/o productos de valor agregado.

Tabla 4. Formulación para la preparación del Medio de Cultivo L1.

Tabla 5. Solución Stock de Metales Traza Medio L1.

Tabla 6. Formulación para la preparación del Medio de Cultivo F/2.

Tabla 7. Solución Stock de Metales Traza Medio L1.

Tabla 8. Preparación de Solución Stock de Vitaminas Medio F/2.

Tabla 9. Formulación para la preparación del Medio de Cultivo BG-11.

Tabla 10. Solución de Metales Traza Medio BG-11.

Tabla 11. Composición del Medio de cultivo AC-H.

Tabla 12. Composición del Medio Bayfolan.

Tabla 13. Localidad de las cepas de interés para este estudio.

Tabla 14. Porcentaje de Carbohidratos, lípidos y proteínas obtenidos de las 3 especies de microalgas utilizadas para este estudio en los dos diferentes ciclos y diferentes medios.

Listado de Gráficas

Gráfica 1. Curva de calibración de proteínas utilizando BSA

Gráfica 2. Curva de calibración para la determinación de carbohidratos utilizando glucosa.

Gráfica 3. Curva de calibración de lípidos utilizando fosfolípido, colesterol y triglicérido.

Gráfica 4. Curva de crecimiento de *D.salina* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos de 12:12 1L.

Gráfica 5. Curva de crecimiento de *D.salina* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos de 20:4 1L.

Gráfica 6. Curva de crecimiento de *D.salina* en dos medios de cultivo diferentes en ciclos de 12:12 en biorreactores de 16 L.

Gráfica 7. Curva de crecimiento de *D.salina* en un medio de cultivo en ciclo de 20:4 en biorreactores de 16 L.

Gráfica 8. Curva de crecimiento de *B. braunii* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos de 12:12 luz: oscuridad 1L.

Gráfica 9. Curva de crecimiento de *B. braunii* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos de 20:4 luz: oscuridad 1L.

Gráfica 10. Curva de crecimiento de *B. braunii* en 2 medios de cultivo diferentes, en ciclo de 12:12 luz:oscuridad en bioreactores de 16 L.

Gráfica 11. Curva de crecimiento de *D. quadricauda* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos 12:12 luz: oscuridad 1L.

Gráfica 12. Curva de crecimiento de *D. quadricauda* en tres medios de cultivo diferentes en ciclo de 20:4 luz:obscuridad 1L

Gráfica 13. Curva de crecimiento de *D. quadricauda* en tres medios de cultivo diferentes en ciclo de 20:4 luz:obscuridad 16 L.

Gráfica 14. Carotenoides totales en 3 especies de microalgas, en 2 ciclos diferentes de luz: Obscuridad.

Gráfica 15. Clorofila a obtenida en 3 diferentes especies de microalgas en 2 ciclos diferentes de luz: obscuridad.

Gráfica 16. Clorofila b obtenida de 3 especies de microalgas en dos ciclos diferentes de luz: obscuridad

Listado de Figuras

Figura 1. Reacción general de la transesterificación.

Figura 2. *Dunaliella salina* y su taxonomía.

Figura 3. *Desmodesmus quadricauda* de 4 y 8 células.

Figura 4. *Botryococcus braunii*

Figura 5. Medios de Cultivo

Figura 6. Aislamiento de Microalgas

Figura 7. Escalamiento de Microalgas

Figura 8. Revisión de los inóculos para escalamiento a biorreactores de 16L

Figura 9. Bioensayos de estrés en ciclos de L:O 12:12 y 20:4

Figura 10. Curva de crecimiento

Figura 11. Cámara de Neubauer y cuadrantes de conteo

Figura 12. Detalle la rejilla de la Cámara Sedgwick-Rafter.

Figura 13. Cepas de Microalgas localizadas en la Cámara de Cultivo.

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000, de las cuales con frecuencia se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. (Arredondo-Vega y Vázquez-Duhalt, 1991; Hu *et al.*, 2008; Sheehan *et al.*, 1998).

Los cultivos de microalgas pueden proporcionar diferentes tipos de biocombustibles renovables, estos incluyen el metano producido por la digestión anaeróbica de la biomasa de algas (Spolaore *et al.*, 2006), el biodiesel derivado del aceite de microalgas (Banerjee *et al.*, 2002; Dunahay *et al.*, 1996; Gavrilescu y Chisti, 2005; Roessler *et al.*, 1994; Sawayama *et al.*, 1995; Sheehan *et al.*, 1998) y producción de biohidrógeno fotobiológico (Akkerman *et al.*, 2002; Fedorov *et al.*, 2005; Ghirardi *et al.*, 2000; Melis, 2002; Kapdan y Kargi, 2006). La idea de usar microalgas como fuente de combustible no es nueva (Chisti, 1980; Nagle y Lemke, 1990; Sawayama *et al.*, 1995), pero ahora hay mas investigaciones al respecto, debido al aumento de precios del petróleo y a la nueva preocupación sobre el calentamiento global que está asociada con la quema de combustibles fósiles (Gavrilescu y Chisti, 2005).

Son por tanto una alternativa prometedora dadas las ventajas que ofrecen en contraste con los cultivos de plantas oleaginosas, tales como: mayor eficiencia fotosintética; eficacia superior en la asimilación de nutrientes y periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, a causa de los breves tiempos de

duplicación de las microalgas. Además, los cultivos microalgales son independientes de la estacionalidad inherente a los cultivos agrícolas y de la fertilidad del suelo. Asimismo, en contraste con los cultivos tradicionales, requieren de menores cantidades de agua y son flexibles ante el tipo y la calidad de ésta, por lo que prosperan convenientemente tanto en aguas marinas, como dulces, salobres y residuales. Una ventaja adicional estriba en la posibilidad de obtener subproductos (proteína, carbohidratos, biopolímeros, pigmentos, biogás, etc.) a partir de la biomasa microalgal residual una vez que los lípidos han sido extraídos. (Arredondo-Vega y Vázquez-Duhalt, 1991; Chisti, 2007; Dismukes *et al.*, 2008; Gouveia y Oliveira, 2009; Hu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2009; Rittmann, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009; Schenk *et al.*, 2008; Sheehan *et al.*, 1998; Waltz, 2009; Williams, 2007).

Microalga	Contenido de aceite (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella sp.</i>	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	20
<i>Nannochloris sp.</i>	20–35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia sp.</i>	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23
<i>Dunaliella salina</i>	9

Tabla 1 Contenido de aceite en algunas microalgas (Chisti, 2007)

El contenido de aceite en las microalgas puede superar el 80% en peso de biomasa seca (Meeting, 1996; Spolaore *et al.*, 2006) y los niveles de aceite del 20-50% son bastante comunes (Tabla 1) Dependiendo de la especie, las microalgas producen diferentes tipos de lípidos, hidrocarburos y otros aceites complejos (Banerjee *et al.*, 2002; Guschina y Harwood, 2006; Metzger y Largeau, 2005) donde no todos los aceites son satisfactorios para la producción de biodiesel. La composición química también varía dependiendo de la especie de microalga (Brown *et al.*, 1989; Becker, 1994) (Tabla 2).

ESPECIE	PROTEÍNAS	CARBOHIDRATOS	LÍPIDOS
Agua Dulce			
<i>Desmodesmus obliquous</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Desmodesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7
Marinas			
<i>Isochrysis sp. T-ISO</i>	44	9	25
<i>Isochrysis galbana</i>	41	5	21
<i>Pavlova lutheri</i>	49	31	12
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	33	17	10
<i>Phaeodactylum tricomutum</i>	33	24	10
<i>Skeletonema costatum</i>	37	21	7
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	29	17	10
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	9
<i>Tetraselmis suecica</i>	39	8	7

Tabla 2. Composición química (en % del peso seco total) de diferentes microalgas de agua dulce y marina (Brown *et al.*, 1989; Becker, 1994)

En el presente estudio hemos seleccionado tres especies, dos dulceacuícolas de los géneros *Desmodesmus*, *Botryococcus* y una marina del género *Dunaliella*.

1.1 Parámetros de los cultivos

Los parámetros más importantes que se deben monitorear para asegurar el éxito de un cultivo de microalgas son la iluminación, temperatura, aireación y agitación, pH y salinidad. Así mismo se debe tener una adecuada esterilización química o física del material que se implementará en los mismos. (Arredondo-Vega y Votolina, 2007).

Hay una gran variedad de medios de cultivo, la mayoría son modificaciones de fórmulas ya establecidas y este es uno de los obstáculos en la producción industrial de microalgas tanto química y económicamente.

La mejor manera de elegir un medio de cultivo adecuado para las microalgas es con base en las necesidades de cada especie, para ello es necesario considerar: la salinidad, la composición y concentración de iones, fuente de nitrógeno, fuente de carbono, pH, elementos traza y vitaminas.

Los medios de cultivo que son utilizados para las microalgas pueden ser:

Sintéticos: Estos pueden ser comerciales o preparados con agua destilada, sales minerales y se agregan los componentes naturales de agua de mar o agua dulce.

Naturales: tomando como base el agua de la zona de estudio y enriquecidos con suplementos minerales: Estos medios de cultivo aumentan en gran medida el las tasas de división celular de las microalgas. Para especies marinas se utiliza agua

de mar filtrada que es de mejor rendimiento y más eficiente que agua de mar artificial.

Aguas residuales: Efluentes domésticos tratados y otras formas de aguas residuales, como efluentes de granjas de peces, utilizados como fuentes de nutrientes pueden reducir más los costes de producción, pero hay peligro de acumulación de metales pesados en las microalgas y esto resulta perjudicial para su posterior uso. (Dunstan y Tenore, 1972; Mihnea y Voinecu, 1977). También se utilizan residuos rurales o efluentes de biodigestión de materiales orgánicos y en estos casos el producto que se obtiene puede utilizarse en la alimentación animal. (Seshadri y Thomas, 1979).

Para disminuir el coste de los medios de cultivo se han desarrollado métodos de enriquecimiento simplificados como los fertilizantes, los cuales son menos caros, el método más simple es agregar fertilizantes con nitrato/fosfato al agua, en una razón 5:1 y 15:1 dependiendo de las especies y de las condiciones locales. (Geldenhays *et al.*, 1985).

Los medios más utilizados para el cultivo de microalgas son: F/2 (Guillard y Ryther, 1962), K (Keller *et al.*, 1987), ES (Harrison *et al.*, 1980), GP (Loebich y Smith, 1968) y el GSe (Blackburn *et al.*, 2001)

1.2 Carbohidratos, lípidos y proteínas

El contenido de los carbohidratos puede cambiar, dependiendo de las condiciones de cultivo, entre aproximadamente el 10 y el 50% de la biomasa orgánica. Estos porcentajes aumentan cuando existe una limitación en los nutrientes y da como resultado un cambio en el porcentaje de lípidos y carbohidratos en relación con las proteínas cuando pasa de la fase exponencial a estacionaria. (Granum *et al.*, 2002).

Los carbohidratos básicamente se dividen en estructurales y de reserva: los estructurales se encuentran como componentes principales de las paredes celulares y los de reserva están presentes en los cloroplastos, e incluyen a los glicerofosfolípidos y esfingolípidos (Arredondo-Vega y Votolina, 2007), con tasas de acumulación mayores en condiciones de limitación por nutrientes o de saturación de luz e incluyen a las ceras, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, triacilglicéridos o triglicéridos y esteroides (Geider y La Roche, 2002).

El componente más importante de la biomasa orgánica de la mayoría de las microalgas son las proteínas, estas pueden representar hasta un 50% del peso seco total y que sumadas a los lípidos y a los carbohidratos constituyen hasta el 90% del peso seco total, mientras que los minerales, los ácidos nucleicos, los pigmentos y los demás componentes menores suman el restante 10%. Aunque si la pared celular está protegida por bióxido de silicio el contenido de compuestos inorgánicos pueden representar entre el 30 y el 45 % del peso seco total (Brown *et al.*, 1989; Becker, 1994).

Los lípidos pueden variar desde 1% hasta más del 40% del peso seco (Paoletti, 1976). Los factores ambientales afectan a las proporciones relativas de ácidos grasos como a la cantidad total de los lípidos. El mayor porcentaje de lípidos se produce cuando el nitrógeno es limitante, otros factores que influyen son la luz, temperatura, ciclo de luz:oscuridad. Los lípidos y ácidos grasos funcionan como componentes de membrana, como productos de reserva, como metabolitos y como fuentes de energía. En las algas verdes la composición varía mucho en función de factores ambientales y organismos taxonómicamente distintos con frecuencia presentan composiciones similares en condiciones idénticas. (Materassi *et al.*, 1980).

Los lípidos se dividen en polares (fosfolípidos y glicolípidos) y lípidos neutros (triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, alquenonas, esteroides y pigmentos).

1.3 Biodiesel

El biodiesel consiste en monoalquilésteres de alcoholes de cadena corta, usualmente etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable y que es técnicamente capaz de sustituir al diesel derivado de petróleo como combustible (Liu y Zhao, 2007; Sheehan *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2008).

En los Estados Unidos, el biodiesel se produce principalmente de la soja. Otras fuentes de biodiesel comercial incluyen el aceite de canola, grasa animal, aceite de palma, aceite de maíz, aceite de cocina usado (Felizardo *et al.*, 2006; Kulkarni y Lama, 2006), y el aceite de *Jatropha* (Barnwal y Sharma, 2005).

El proceso normalmente se utiliza para la producción comercial de biodiesel es el de la transesterificación o alcoholólisis (Fig. 1) es la reacción química ocurrida entre los aceites (triacilglicéridos) y un alcohol (comúnmente metanol, etanol, propanol o butanol) para producir glicerol y alquil ésteres de ácidos grasos, los cuales son conocidos como biodiesel.

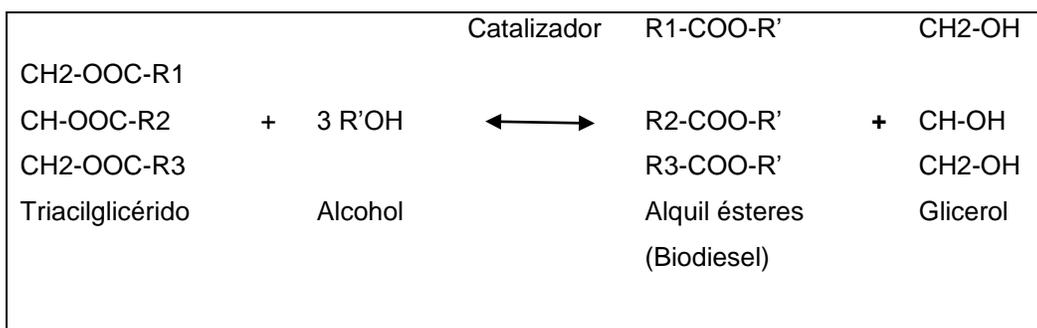


Fig. 1. Reacción general de transesterificación. R₁, R₂, R₃ y R' son radicales alquilo. Los catalizadores pueden ser álcalis, ácidos o enzimas (lipasas) (Ma y Hanna, 1999; Fukuda *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2008).

Los principales factores que influyen en el proceso son la relación molar alcohol:glicéridos, el tipo de catalizador (álcali, ácido, lipasas), la temperatura, el tiempo de reacción y el contenido de agua y ácidos grasos libres en la materia prima. En la actualidad, la mayoría del biodiesel es producido mediante transesterificación alcalina, a causa de su rapidez y condiciones moderadas que la caracterizan (Al-Zuhair, 2007; Liu y Zhao, 2007; Ma y Hanna, 1999; Sharma *et al.*, 2008; Vasudevan y Briggs, 2008).

1.4 Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos forman parte de la fracción lipídica polar. Las microalgas al igual que las plantas superiores, contienen 3 grupos principales de pigmentos: Clorofilas, carotenos y ficobilioproteínas. Los principales pigmentos son las clorofilas y los carotenoides, que suponen del 0.5 al 5% del peso seco de la célula (Ben-Amotz *et al.*, 1985).

Clorofilas

La clorofila *a* es el pigmento fotosintético primario en todas las microalgas (incluidas cianobacterias). Los diferentes *Phyla* de las algas eucariontas pueden tener clorofila *b*, *c* ó *d* como accesorias, mientras que las cianobacterias no poseen más que clorofila *a*, a excepción de las Chlorococcales que tienen más clorofila *b* (Abalde, 1995).

La acumulación de clorofila parece estar muy relacionada con el desarrollo de los tilacoides y la actividad fotosintética. La síntesis de clorofilas, aunque puede ocurrir en plastos, parece estar bajo control nuclear y del plasto para la síntesis de los componentes estructurales del aparato fotosintético.

Los nutrientes tienen un efecto importante en la formación de clorofilas en microalgas, ya que las deficiencias en hierro, nitrógeno y magnesio inhiben la síntesis y acumulación de clorofila, por otro lado la cantidad de carbono orgánico en el medio y la alta intensidad luminosa también inhiben formación de clorofilas en algunas microalgas (Abalde, 1995).

Carotenoides

Los carotenoides son moléculas poliisoprenoides que poseen dobles enlaces conjugados y un anillo de ciclohexano en cada extremo de la molécula. El licopeno es probablemente el precursor de todos los carotenoides encontrados en microalgas (Abalde, 1995).

Los carotenoides funcionan como fotoprotectores y pigmentos captadores de luz (Cohen, 1986). Cada especie algal puede contener entre 5 y 10 carotenoides distintos; se conocen unos 60 carotenoides en los distintos *phyla* algales.

El β -caroteno es un carotenoide típico que se encuentra en todas las algas y plantas superiores. Se encuentra en mayor concentración en las algas verdes. Generalmente supone menos del 1% del peso seco, pero puede acumularse hasta niveles del 10% en algas halotolerantes como *Dunaliella bardawil* (Ben-Amotz y Avron, 1989) y *D. salina* (Borowitzka, 1988). Las mayores concentraciones de β -caroteno se obtienen en condiciones de salinidad e iluminación elevadas.

La acumulación de carotenos, en las microalgas, se realiza en dos fases, la primera como resultado del papel fotoprotector de los pigmentos y la segunda debida a las síntesis continua de β -caroteno en células que han dejado de dividirse, esto es en la fase estacionaria de crecimiento (Lers *et al.*, 1990). El β -caroteno se encuentra en organelos especiales llamados glóbulos de β -caroteno

los cuales se encuentran localizados en el espacio intertilacoidal de los cloroplastos. (Fried *et al.*, 1982; Rabbani *et al.*, 1998).

La variedad de carotenoides es mayor en microalgas que en plantas superiores. Algunos grupos de algas tienen nombres comunes que reflejan su contenido en carotenoides, por ejemplo, las algas pardas, Phaeophyceae, que contienen varias xantofilas, sobre todo fucoxantina. La mayoría de los carotenoides son amarillos o anaranjados, pero su color puede estar enmascarado por la clorofila predominante (Abalde, 1995).

2 ANTECEDENTES

2.1 Clasificación e Importancia de las Especies de estudio

DOMINIO: Eukarya

REINO: Plantae

SUBREINO: Viridiplantae

DIVISIÓN: Chlorophyta

CLASE: Chlorophyceae

ORDEN: Volvocales

FAMILIA: Dunaliellaceae

GÉNERO: *Dunaliell*

ESPECIE: *Dunaliella salina* (Teodosresco, 1950)

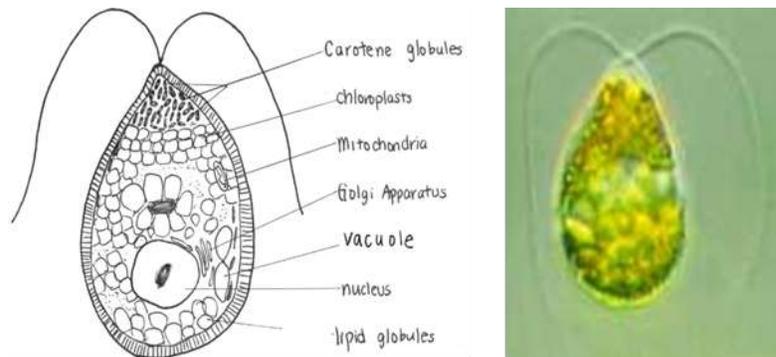


Fig 2. *Dunaliella salina* y su taxonomía

Dunaliella salina modified from Shariati y Hadi (2011)

Dunaliella

El género *Dunaliella* comprende organismos unicelulares de color verde, biflagelados, de forma variable. Son organismos unicelulares que carecen de una pared celular rígida de polisacáridos, lo que les permite soportar cambios drásticos en su volumen celular en respuesta a cambios de presión osmótica (Borowitzka y Borowitzka, 1988b).

Este género se caracteriza por la predominancia de pigmentos como la clorofila *a* y *b*; y puede acumular carotenoides dependiendo de las condiciones de cultivo. Entre sus principales pigmentos accesorios se encuentran α -caroteno, el β -caroteno, el CIS- β -caroteno, la luteína, la luteína 5, 6-epoxida, la anteraxantina, la violaxantina, la zaexantina y la neoxantina (Borowitzka y Borowitzka, 1988a).

DOMINIO: Eukarya

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Chlorophyta

CLASE: Chlorophyceae

ORDEN: Sphaeropleales

FAMILIA: Scenedesmaceae

SUBFAMILIA: Desmodesmoideae

GÉNERO: *Desmodesmus*

ESPECIE: *Desmodesmus quadricauda* (Smith, 2010).



Fig. 3 *Desmodesmus quadricauda* de 4 y 8 células

Desmodesmus

Se utiliza como complemento para la dieta por su contenido proteico y por su patrón de ácidos grasos (Becker, 1994). También se han aislado algunos componentes bioquímicos menores de interés en la industria del perfume.

Diferentes cepas de *Desmodesmus* o cultivos mixtos de *Desmodesmus* y *Chlorella*, combinados con bacterias, se han utilizado como sustrato de digestión anaeróbica para la producción de metano (Eisenberg *et al.*, 1979). Esta especie también ha sido utilizada para bajar de peso, ya que su ingestión media hora antes de las comidas reduce el apetito. En Checoslovaquia se utilizan ungüentos que contienen el 20% de extracto alcohólico de *Desmodesmus acutus* para el tratamiento de personas con úlceras en la piel, quemaduras, heridas, etc. (Abalde *et al.*, 1995).

DOMINIO: Eukarya

REINO: Plantae

SUBREINO:

DIVISIÓN: Chlorophyta

CLASE: Trebouxiophyceae

ORDEN: Trebouxiales

FAMILIA: Botryococcaceae

SUBFAMILIA: Botryococcadeae

GÉNERO: *Botryococcus*

ESPECIE: *Botryococcus braunii* (Croasdale, 1973).

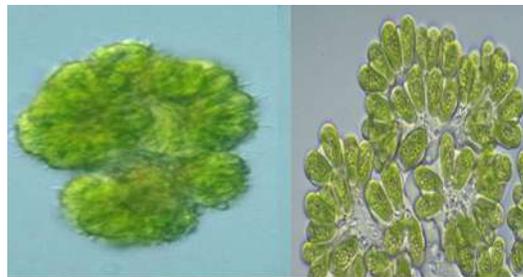


Fig 4. *Botryococcus braunii*

Botryococcus braunii

Es una microalga verde, colonial, capaz de acumular grandes cantidades de hidrocarburos, especialmente los que tienen longitudes de la cadena entre C27 y C31 y principalmente C34 ha sido propuesto como un lubricante y como fuente de combustibles renovables, puesto que estos compuestos son similares en composición al petróleo crudo (Bachofen, 1982). Los Hidrocarburos pueden constituir hasta el 75% de la masa seca de *B. braunii*. Esta microalgas convierte compuestos inorgánicos simples y luz solar en combustibles de hidrocarburos potenciales y materias primas para la industria química. Microorganismos como *B.*

braunii pueden, a largo plazo, reducir nuestra dependencia de combustible fósil (Banerjee *et al.*, 2002; Gavrilesco y Chisti, 2005).

La idea de estudiar científicamente a las microalgas comienza en 1890, cuando el microbiólogo holandés Beijerinck establece cultivos puros de una microalga de agua dulce: *Chlorella vulgaris*, el introdujo la idea de utilizar estos cultivos, posteriormente numerosos investigadores, observaron que bajo condiciones de cultivo controladas y especialmente, a intensidad de luz de saturación eran mucho más productivos los cultivos de microalgas que los de las plantas superiores (Abalde, 1995; Becker, 2007; Soeder, 1980).

La producción masiva de microalgas se llevó a cabo por primera vez en Alemania durante la II Guerra Mundial, dirigido principalmente a la producción de lípidos, para lo que se utilizaron las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Nitzschia palea* (Harder y Von Witsch, 1942).

En los años 80`s se establecieron numerosas industrias para la producción de microalgas, sobre todo *Spirulina* y *Dunaliella*, en Taiwan, Tailandia, California, Australia, Hawái e Israel. La producción de *Dunaliella* aparece como una de las más prometedoras, por sus contenidos en β -caroteno (Ben-Amotz y Avron, 1988; Borowitzka y Borowitzka, 1988) y sus propiedades terapéuticas (Nagasawa *et al.*, 1989).

Su utilización como fuente de proteínas es actualmente muy controvertida, se realizan numerosas investigaciones sobre aspectos diferentes de las microalgas, tanto básicos como aplicados, los cuales demuestran que la biomasa microalgal puede ser utilizada no sólo como proteína sino como biofertilizante, en la purificación de aguas residuales, como acondicionadores de suelo, como alimento en acuicultura, complementos o suplementos alimenticios (Abeliovich, 1986; Venkataraman, 1986; Boussiba, 1988).

También, se ha manifestado la potenciabilidad de las microalgas para la producción de la gran variedad de sustancias como ácidos grasos, pigmentos, vitaminas, antibióticos, productos farmacéuticos y otros productos químicos de interés (o sus precursores), así como hidrógeno, hidrocarburos y otros combustibles biológicos (Arad, 1988; Borowizka, 1988; Cohen, 1986).

Existen a la fecha algunos trabajos relevantes donde los autores estudian los cultivos de algunas especies de microalgas con el objeto de producir biocombustibles o productos de valor agregado, algunos de los más interesantes los vemos en la Tabla 3.

Microalgas utilizadas	Artículo	Condiciones y sistema de cultivo	% de lípidos
<i>Botryococcus braunii</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Desmodesmus dimorphus</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> .	Garibay Hernández et al., 2009.	En este trabajo reportan que los cultivos son afectados por diversas condiciones físicas y químicas tales como la fase de crecimiento, la disponibilidad y la clase de nutrientes, la salinidad, el tipo, periodos e intensidad de luz, la temperatura, el pH, e incluso, la asociación con otros microorganismos.	43.0 –63.0%, 9.2 –47.2%, 6.0 –40.0%, 11.0 -55.0%
<i>Dunaliella salina</i> , <i>D. viridi</i> y <i>D. bardawil</i>	Vázquez-Suárez et al., 2007.	Durante el estudio la temperatura de los cultivos varió entre 25,3 y 36,8 °C, mientras que la intensidad luminosa estuvo entre los 136,7 y 371,0 μ E m ² s ⁻¹	38,3–52,8%

<i>Desmodesmus obliquus</i>	Da Silva <i>et al.</i> , 2008	Se trabajó con cultivos en medio Bristol en mediana escala 50L y a gran escala a cuantos litros? En condiciones controladas; 25°C, 150uE/m/s 14:10 ciclo de L: O	12.8%
<i>Botryococcus braunii</i> <i>Dunaliella primolecta</i>	Chisty, 2007	El autor analiza los cultivos de microalgas en diferentes sistemas y su potencial uso para la producción de biocombustibles.	25–75% 23%
<i>Dunaliella salina</i> , <i>Botryococcus braunii</i> , <i>Desmodesmus quadricauda</i>	Mata <i>et al.</i> , 2010.	Se probaron diferentes cultivos para extracción de lípidos en condiciones controladas de laboratorio.	6.0-25% 25-75% 1.9-18%

Tabla 3. Estudios sobre cultivos de microalgas para la producción de biocombustibles y/o productos de valor agregado.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la demanda y altos costos que ha presentado el petróleo y a la contaminación que este ocasiona al ambiente, actualmente se están buscando otras fuentes alternativas de combustibles, que puedan ayudar a reducir tanto los costos como la contaminación. Una fuente alternativa son los cultivos de microalgas, debido al potencial que han presentado no solo como fuente de biocombustible, sino también para la producción de productos de alto valor agregado como son pigmentos, alimento, vitaminas, proteínas, biofertilizante, entre otros.

En esta investigación los cultivos de las tres especies se sometieron a estrés lumínico y se extrajeron lípidos totales, con la finalidad de saber si esto estimulaba la producción de aceite que producen.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar algunos parámetros fisicoquímicos en los cultivos de microalgas que estimulen la producción de lípidos.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar y purificar cultivos clonales de las microalgas *Botryococcus braunii*, *Dunaliella salina*, *Desmodesmus quadricauda*.
- Cultivar microalgas de los géneros: *B. braunii*, *D. salina*, *D. quadricauda* en tres medios de cultivo alternativos.
- Exponer los cultivos en lotes a diferentes condiciones de iluminación en ciclos de 12:12 y de 20:4 de luz: oscuridad y cuantificar la biomasa por conteo celular.
- Extraer pigmentos, cosechar, liofilizar y realizar análisis bromatológicos de la biomasa algal, en fases de crecimiento exponencial y estacionaria.

5. METODOLOGÍA

5.1 CULTIVOS

Para el establecimiento del cultivo de microalgas marinas, el primer paso fue la preparación del medio de cultivo utilizando agua de mar filtrada mediante membranas de nitrocelulosa de 0.22 μm , esterilizando el agua de mar en autoclave a 120 °C y 15 lb/in², una vez esterilizada se bajó la temperatura con agua corriente para evitar posibles cambios en el pH.

Se utilizaron para el establecimiento de las cepas marinas el medio L1 (Guillard y Hargraves 1993) cuya base fue agua de mar y para las dulceacuícolas el medio F/2 (Guillard y Ryther 1962) cuya base fue agua destilada.

También se trabajó con el medio de cultivo BG11 (Stanier *et al.*, 1971) y como medios alternativos los fertilizantes foliares Bayfoland forte y ácido húmico de lombriz AC-H, todos estos preparados en salinidades de 35 y de 0 ups.

Medio L1 (Guillard y Hargraves 1993)

Compuesto	Solución Stock	Cantidad
NaNO₃	75 g/l	1 ml
NaH₂PO₄*H₂O	5 g/l	1 ml
L1 Solución de Metales traza	Ver como se prepara abajo	1 ml
f/2 Solución de Vitaminas	Ver Tabla 5	0.5 ml

Tabla 4. Formulación para la preparación del Medio de Cultivo L1 (Guillard y Hargraves, 1993).

A 950 ml de agua de mar filtrada se le adicionó la cantidad indicada de cada compuesto. Se llevó el volumen final a 1 L con agua de mar filtrada y esterilizada en autoclave.

Solución stock de Metales Traza del Medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993)

Cantidad	Compuesto	Solución stock
3.15 g	FeCl ₃ +6H ₂ O	-
4.36g	Na ₂ EDTA-2H ₂ O	-
0.25 ml	CuSO ₄ *5H ₂ O	2.45 g/l
1ml	Na ₂ MoO*H ₂ O	19.9 g/l
1ml	ZnSO ₄ *7H ₂ O	22 g/l
1ml	CoCl ₂ *6H ₂ O	10 g/l
1ml	MnCl ₂ *4H ₂ O	180 g/l

1ml	H ₂ SeO ₃	1.3 g/l
1ml	NiSO ₄ *6H ₂ O	2.7 g/l
1ml	Na ₃ VO ₄	1.84 g/l
1ml	K ₂ CrO ₄	1.94 g/l

Tabla 5. Solución Stock de Metales Traza Medio L1

A 950 mL de agua destilada se le adicionó la cantidad indicada de cada compuesto y se llevó el volumen final a 1L con agua destilada y se esterilizó en autoclave.

Medio de Cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1963)

CANTIDAD	COMPUESTO	SOLUCIÓN STOCK
1 ml	NaNO ₃	75 g/l
1 ml	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	5 g/l
1 ml	f/2 Solución de metales traza	Ver tabla 7
0.5 ml	f/2 solución de vitaminas	Ver tabla 8

Tabla 6. Formulación para la preparación del Medio de Cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975).

A 950 ml de agua destilada se le adicionó la cantidad indicada de cada compuesto. Se llevó el volumen final a 1 L y se esterilizó en autoclave.

Solución Stock de Metales Traza del Medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975).

A 950 mL de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto y se llevó el volumen final a un 1L con agua destilada y se esterilizó en la autoclave.

COMPUESTO	SOL. STOCK	CANTIDAD
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	—	3.15 g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	—	4.36 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	9.8 g/L de agua destilada	1 mL
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.3 g/L de agua destilada	1 mL
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.0 g/L de agua destilada	1 mL
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0 g/L de agua destilada	1 mL
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	180.0 g/L de agua destilada	1 mL

Tabla 7. Solución Stock de Metales Traza Medio F/2

Cantidad	Compuesto	Solución Stock
1ml	Vitamina B ₁₂ (Cianocobalamina)	1.0 g/L de agua destilada
10 ml	Biotina	0.1 g/L de agua destilada
200.0 mg	Tiamina – HCl	—

Tabla 8. Preparación de Solución Stock de Vitaminas Medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975).

A 950 mL de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto y se lleva el volumen final a 1L con agua destilada. Se esteriliza por filtración y se guarda en viales de plástico estériles en el congelador.

MEDIO BG-11 (Stanier *et al.*, 1971)

#	Componente	Cantidad	Solución Stock	Concentración Final
1	NaNO_3 (Fisher BP360-500)	10 mL/L	30 g/200 mL dH ₂ O	17.6 mM
2	K_2HPO_4 (Sigma P 3786)	10 mL/L	0.8 g/200 mL dH ₂ O	0.22 mM
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma 230391)	10 mL/L	1.5 g/200 mL dH ₂ O	0.03 mM
4	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma C-3881)	10 mL/L	0.72 g/200 mL dH ₂ O	0.2 mM
5	Acido Cítrico ·H ₂ O (Fisher)	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH ₂ O	0.03 mM

A 104)				
6	Citrato de Amonio ferrico	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH ₂ O	0.02 mM
7	Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Sigma ED255)	10 mL/L	0.02 g/200 mL dH ₂ O	0.002 mM
8	Na ₂ CO ₃ (Baker 3604)	10 mL/L	0.4 g/200 mL dH ₂ O	0.18 mM
9	Solución de metales traza	1 mL/L		
10	Tiosulfato de Sodio Pentahidrato (solamente agar y medios estériles)	24.8 g/100 mL		1 mM

Tabla 9. Formulación para preparar el Medio de cultivo BG-11

En un matraz estéril de 1L añadir los 9 primeros componentes en el orden especificado mientras se agita continuamente, aforar a 1 litro con agua destilada, tapar y esterilizar en autoclave.

#	Componente	Cantidad	Conc. Final (µM)
1	H ₃ BO ₃ (Baker 0084)	2.86 g/L	46
2	MnCl ₂ ·4H ₂ O (Baker 2540)	1.81 g/L	9
3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma Z 0251)	0.22 g/L	0.77
4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39 g/L	1.6
5	CuSO ₄ ·5H ₂ O (MCIB 3M11)	0.079 g/L	0.3
6	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	49.4 mg/L	0.17

Tabla 10. Solución de Metales Traza Medio BG-11

En 900 ml de agua destilada agregar los componentes en el orden especificado mientras se agita continuamente, aumentar el volumen total de 1 litro con agua destilada y esterilizar en autoclave, Una vez esterilizado, mantener a baja temperatura en el refrigerador.

Medio Ácido Húmico de Lombriz

COMPONENTE	CANTIDAD (ppm)	COMPONENTE	CANTIDAD (ppm)
Materia Orgánica	60.12	Ácidos húmico y fúlvico	17.80
Nitrógeno total (N)	8.68	Potasio asimilable (K ₂ O)	3.27
Fosforo asimilable (P ₂ O ₅)	2.5	Calcio	7.21
Fito reguladores naturales	600	Magnesio	0.48
Azufre	3100	Fierro	1500
Zinc	70	Manganeso	1500
Cobre	152	Boro	30
Molibdeno	50	Cobalto	2

Tabla 11. Composición del Medio de Cultivo AC-H



Fig. 5 Medios de Cultivo a) BG-11 b) Ácido Húmico de Lombriz c) Bayfolan

A 1L de agua esterilizada se le agregó 1 ml de Ácido Húmico de Lombriz

MEDIO BAYFOLAN

COMPUESTO	% EN PESO/VOL	COMPUESTO	% EN PESO/VOL
Nitrógeno total (N)	11.470	Fósforo (P₂O₅)	8.000
Potasio (K₂O)	6.000	Boro (B)	0.036
Cobre (Cu)	0.040	Fierro (Fe)	0,050
Molibdeno (Mo)	0.005	Zinc (Zn)	0.080
Cirhidrato de Tiamina	0.004	Azufre (S)	0.230
Calcio (CaO)	0.025	Cobalto (Co)	0.002

Tabla 12. Composición del Medio Bayfolan

A 1L de agua esterilizada se le agrego 1 ml de Bayfoland

5.2 Aislamiento y establecimiento de los cultivos clonales

De muestras de agua colectadas en enero del 2012 en la laguna de Chapala, Jalisco; las lagunas de Sayula y Cuyutlán y Salineras del estado de Colima, se aislaron microalgas con el fin de establecer cultivos clonales. Cada microalga de interés se separó con la ayuda una pipeta Pasteur con punta reducida y/o con un capilar. Una gota que proviene de una muestra de fitoplancton se colocó en el portaobjeto y se observó al microscopio, bajo el cual las células de interés se succionaron por capilaridad con la micropipeta y se transfirieron a un portaobjetos limpio con una gota de medio estéril. El procedimiento se repitió lavando la célula en medio o agua hasta que no se observaran contaminantes y la gota tuviera una célula. (Arredondo-Vega y Votolina, 2007).

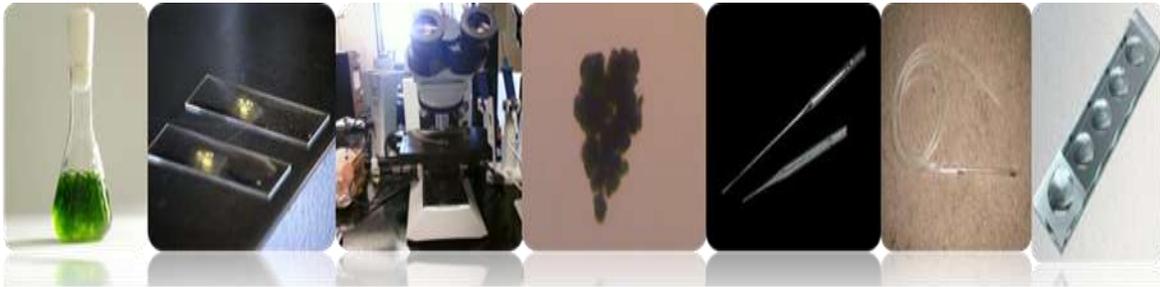


Fig. 6 Aislamiento de Microalgas

Una vez realizada las trasferencia, la célula aislada se colocó en un tubo Eppendorf con 1ml del medio de cultivo y se dejaron incubando en la cámara de cultivo por 8 días

Transcurridos los 8 días, se revisó el estado de los cultivos al microscopio. Cuando se observó un incremento en la densidad celular se procedió a escalar las cepas en tubos de ensayo con 10 ml de medio estéril, después a matraces de 250 ml y 1 L .Se rotularon los recipientes con el nombre y origen de la especie, fecha de inoculación y tipo de medio de cultivo.



Fig. 7 Escalamiento de Microalgas

Una vez en los matraces de 250 ml, se midieron las curvas de crecimiento tomando 1 ml del cultivo cada dos días por 15 días fijándolo con 2 gotas de lugol para su posterior conteo.

Se revisaron en el microscopio los cultivos de las microalgas para ver su estado, una vez que se corroboró que no tenía algún contaminante se procedió a escalarlos en recipientes de mayor volumen hasta llegar a los biorreactores de 16 litros.



Fig 8. Escalamiento de inóculos a biorreactores de 16 litros.

5.3 BIOENSAYOS DE ESTRÉS

Para el mantenimiento de las cepas, se utilizó luz artificial, ya que es posible controlarla de acuerdo a las necesidades del cultivo. Para los matraces Erlenmeyer fue suficiente una iluminación de $13.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ con lámparas “day-light”, “warm-white” o “Gro-lux” (Abalde *et al.*, 1995) para la mayoría de las microalgas. El fotoperiodo que se usa normalmente es 10:14 o 12:12 h de luz: oscuridad. En este caso utilizamos ciclos de 12:12 y 20:4.



Fig. 9. Bioensayos de Estrés en ciclos 12:12 y 20:4

5.4 RECUENTO CELULAR

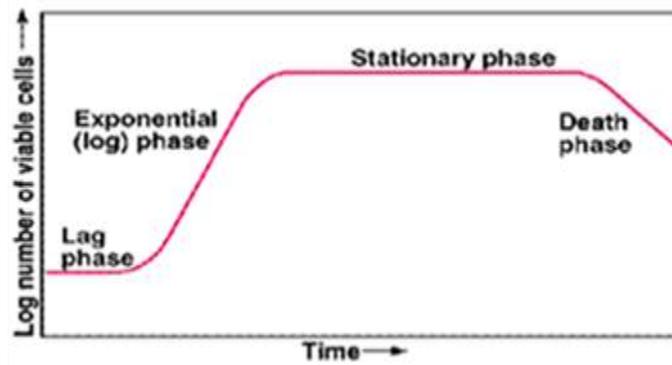


Fig. 10. Curva de crecimiento

Para *D.salina* se utilizó el hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con regilla de Neubauer

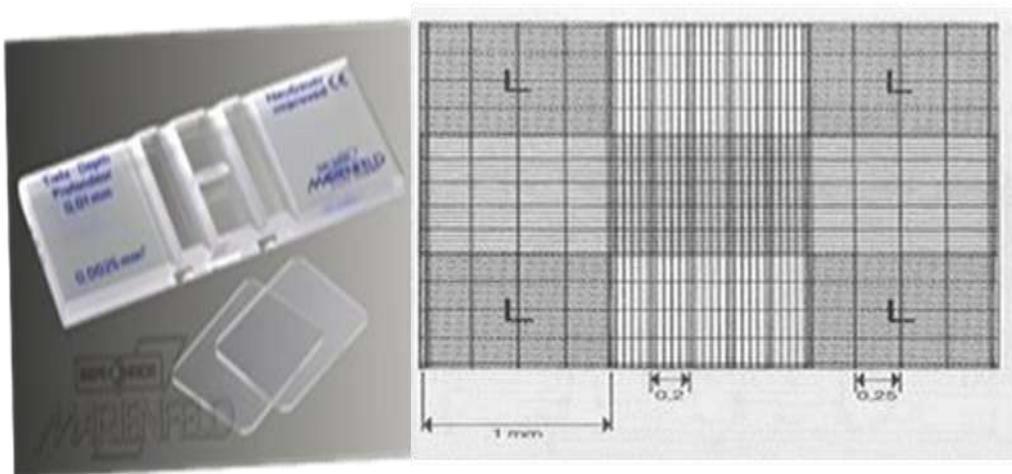


Fig. 11 Cámara Neubauer y cuadrantes de conteo.

La concentración celular en la cámara de Neubauer se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot dil$$

En donde:

C = cél/mL

N = promedio de células presentes en 1 mm² (0.1 µL)

dil = factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra).
(Arredondo-Vega y Votolina, 2007).

Para *Botryococcus braunii* y *Desmodesmus quadricauda* se utilizó la cámara Sedgwick-Rafter que consta de un portaobjetos con una reglilla de 20 columnas Y 50 líneas.

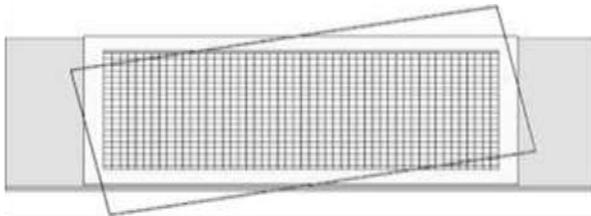


Fig.12 Imagen que muestra a detalle la reglilla de la cámara Sedgwick-Rafter



La concentración celular en la cámara de Sedgwick-Rafter se calcula de acuerdo a la fórmula:

Cámara de S-R tiene aproximadamente:

50 mm de longitud

20 mm de ancho

1 mm de profundidad

Área del fondo es de 1000 mm²

Volumen es 1000 mm³

$$N^{\circ} \text{ de células por mL} = \frac{C \times 1000 \text{ mm}^3}{A \times D \times F}$$

En donde:

C: número de organismos contados

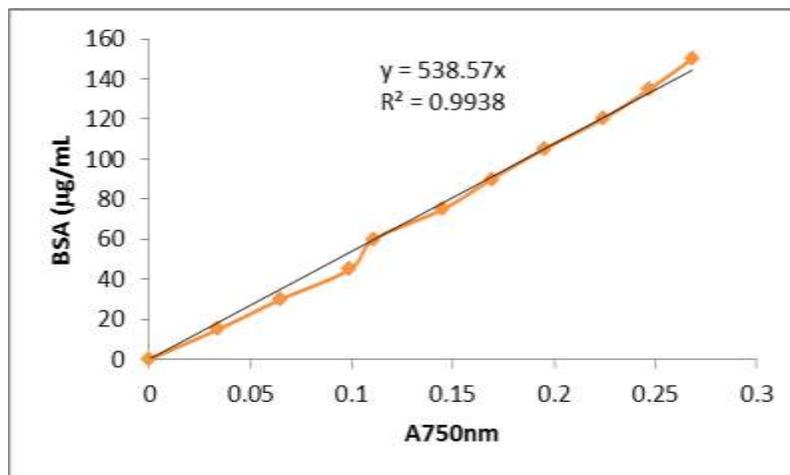
A: Área (cubre objeto) en mm²

D: profundidad en mm de la cámara de Sedgwick-Rafter

F: número de campos contados (Arredondo-Vega y Votolina, 2007).

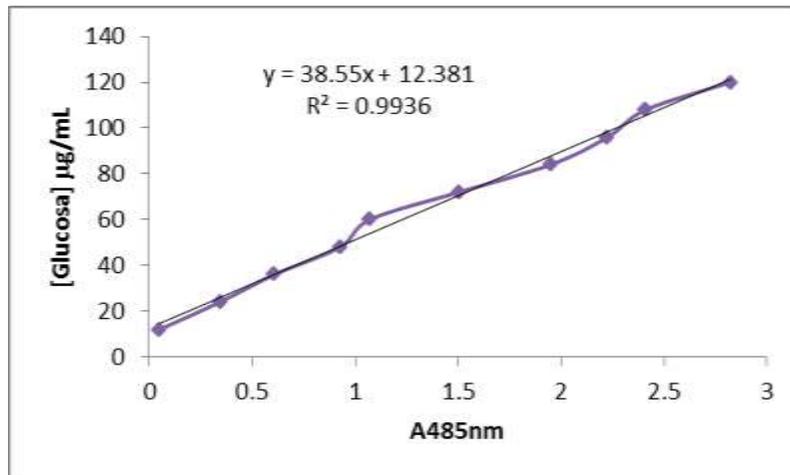
5.5 CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS

La curva de calibración para proteínas se preparó con una solución concentrada de 300 mg/mL de albúmina de bovino (BSA), a partir de la cual se hace un gradiente de concentraciones desde 0 a 150 µg/mL. Todas las diluciones se realizaron por triplicado (Lowry *et al.*, 1951).



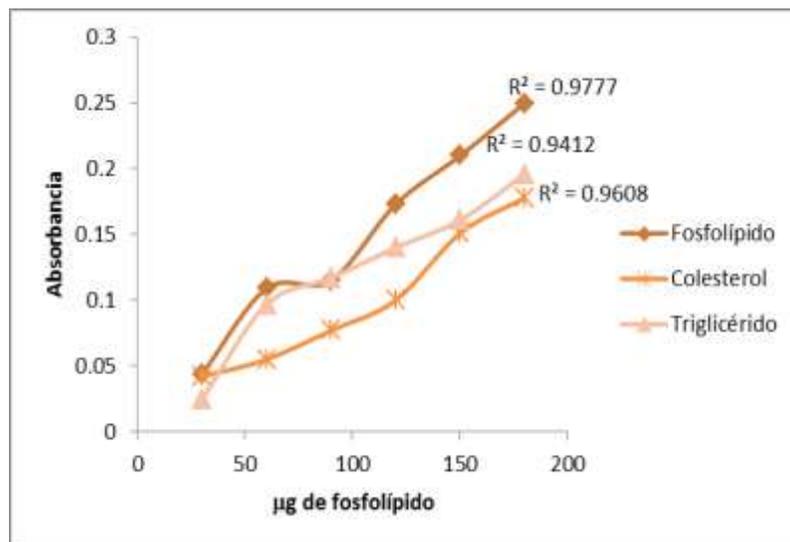
Gráfica 1. Curva de calibración de proteínas utilizando la [BSA] como variable dependiente.

Para la determinación de carbohidratos totales se realizó la curva de calibración utilizando un gradiente de glucosa anhidra preparada a partir de una solución de 120 µg/mL . (Dubois *et. al.*, 1956).



Gráfica 2. Curva de calibración para determinación de carbohidratos utilizando la concentración de glucosa como variable dependiente.

Para el análisis de lípidos se utilizó el método de Bligh y Dyer (1959) adaptado para la extracción de lípidos de microalgas y posteriormente el de calcinación de Marsh y Weinstein (1966). Se requieren tres curvas de calibración, una para fosfolípidos, una de triglicéridos y la última de un esteroles que en este caso fue el colesterol. (Arredondo-Vega y Votolina, 2007).



Gráfica 3. Curva de calibración de lípidos utilizando fosfolípido, colesterol y triglicérido (Marsh y Weinstein, 1966).

6. ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS

Para el análisis de proteínas se utilizó el método propuesto por Lowry *et al.* (1951).

Para la determinación de carbohidratos totales se siguió el protocolo propuesto por Dubois *et. al.*, (1956).

Para la extracción de lípidos el método de Blingh y Dyer (1959) adaptado para microalgas, y para la cuantificación el método de calcinación de Marsh y Weinstein (1966) (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

Para la cuantificación y extracción de pigmentos liposolubles el protocolo de (Humphrey, 1979; Jeffrey y Humphrey 1975; Stricland y Parsons,1972).

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento y cultivo

Se lograron establecer un total de 52 cepas de microalgas nativas de la zona de Jalisco y Colima, donde sobresalen las especies de interés para este estudio.

Espece	Localidad	# de Cepas
<i>Botryococcus braunii</i>	Laguna de Chapala	2
<i>Dunaliella salina</i>	Costas de Colima	12
	Salinera de Jalisco	8
<i>Desmodesmus quadricauda</i>	Chapala y Sayula	6

Tabla 13. Localidad de las cepas de interés para este estudio.

y varias microalgas de interés biotecnológico de los géneros *Arthrospira*, *Anabaena*, *Aphanocapsa*, *Aphanizomenon*, *Closterium*, *Microcystis*, *Oocystis*, *Oscillatoria*, *Pediastrum* y *Staurastrum*. Que se mantienen en el laboratorio de

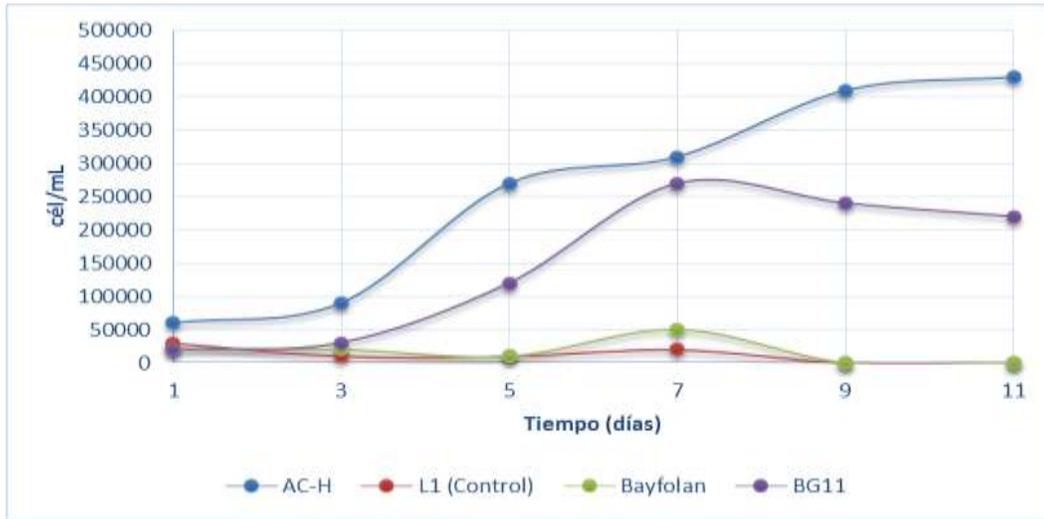
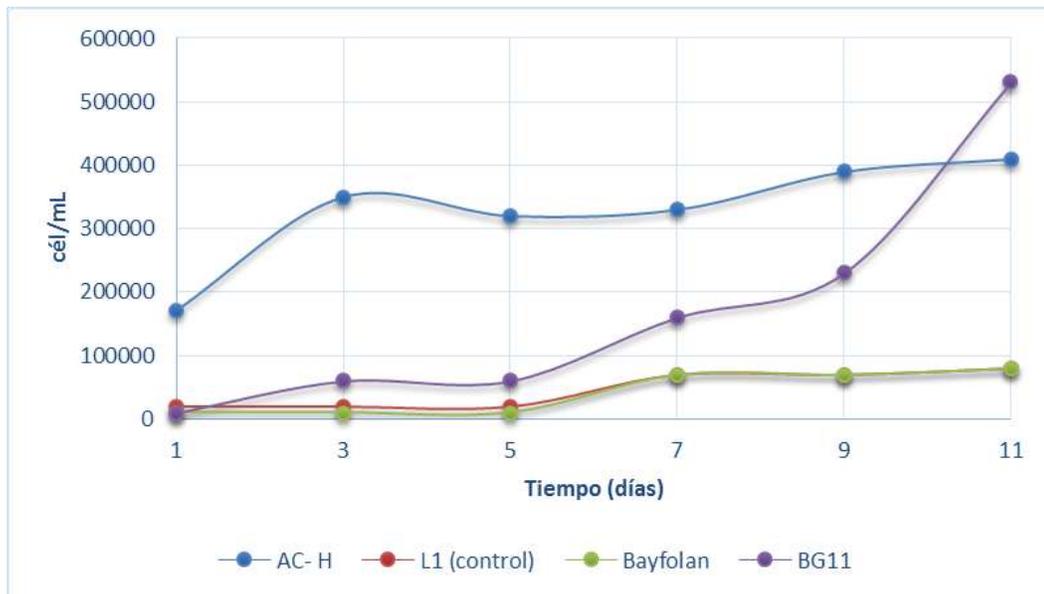
Ficología Aplicada UAM-I, para estudios posteriores.

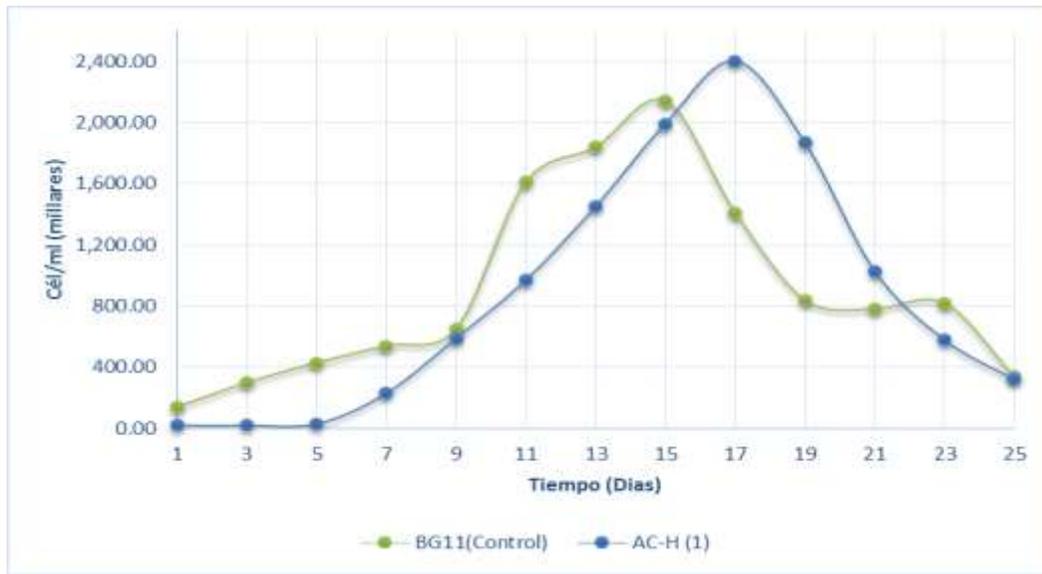


Fig 13. Cepas de microalgas localizadas en la cámara de cultivo

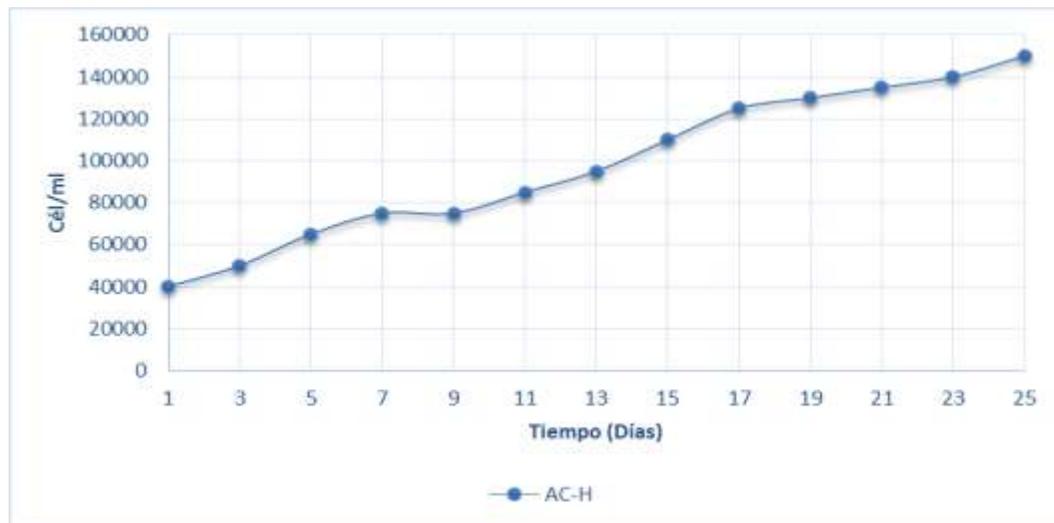
7.2 Bioensayos de Estrés

En la primera etapa se cultivaron las tres especies de interés en 4 medios de cultivo y en dos condiciones diferentes de iluminación, a volúmenes de 1 Litro. En la segunda etapa se escalaron los cultivos de las microalgas de interés a biorreactores de 16 litros, tomando en cuenta los resultados de la primera etapa.

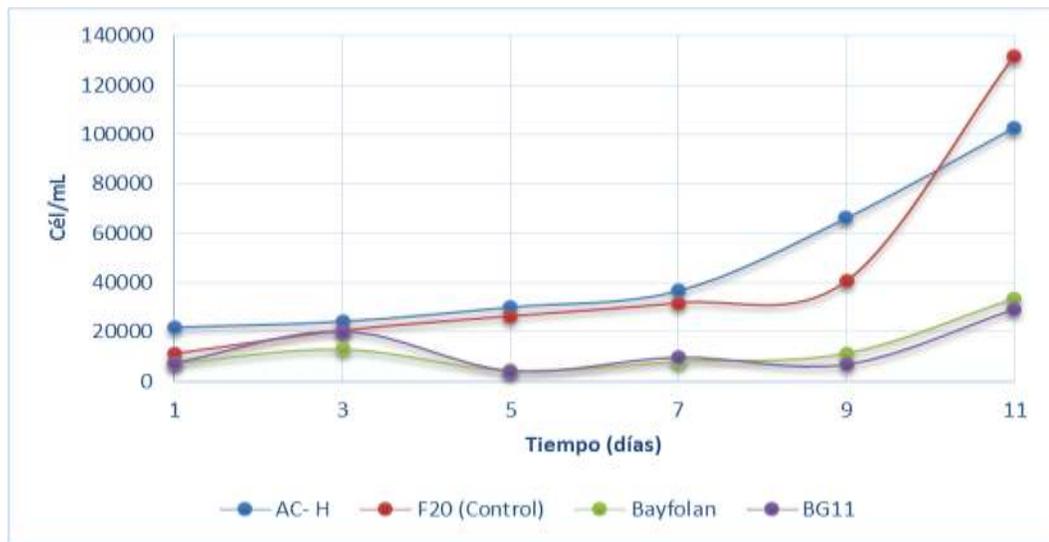
Dunaliella salinaGráfica 4. Curva de crecimiento de *D.salina* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos de 12:12 1LGráfica 5. Curva de crecimiento de *D.salina* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos de 20:4 1L



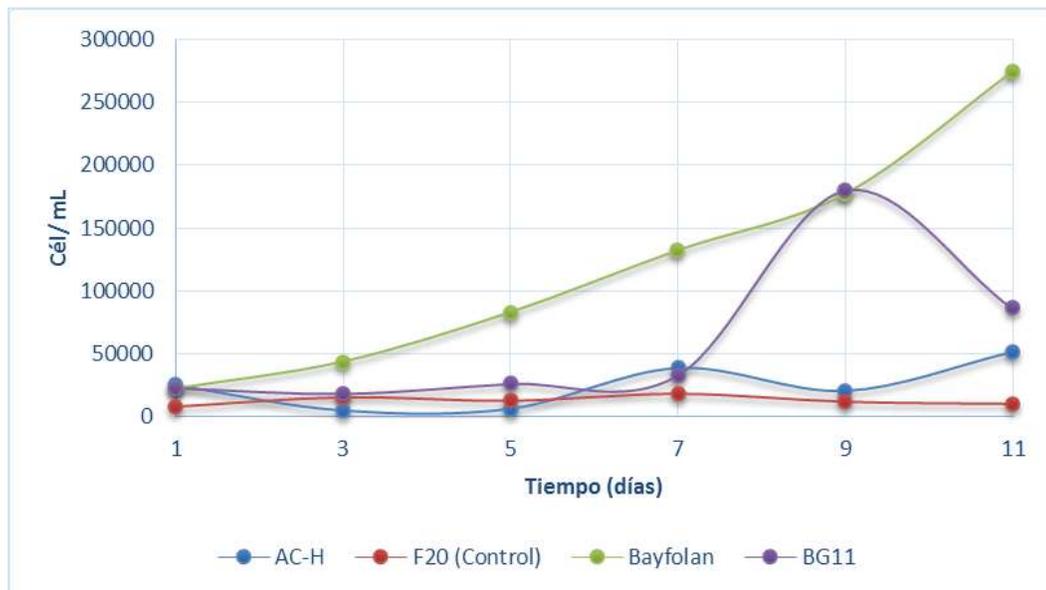
Gráfica 6. Curva de crecimiento de *D. salina* en dos medios de cultivo diferentes en ciclos de 12:12 en biorreactores de 16 L.



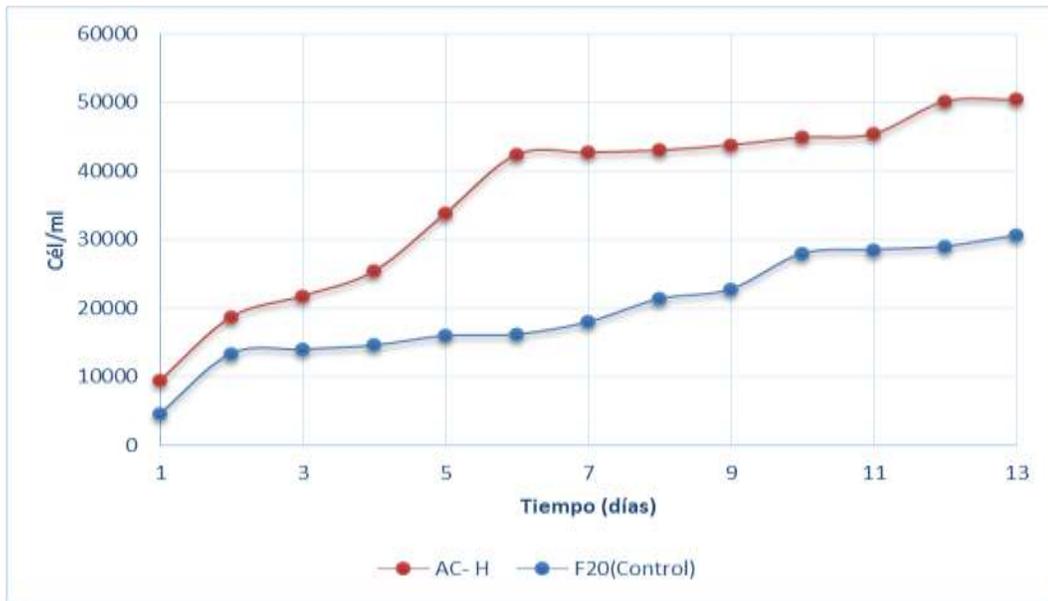
Gráfica 7. Curva de crecimiento de *D. salina* en un medio de cultivo en ciclo de 20:4 en biorreactores de 16 L.

Botryococcus braunii

Gráfica 8. Curva de crecimiento de *B. braunii* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos de 12:12 luz: oscuridad 1L

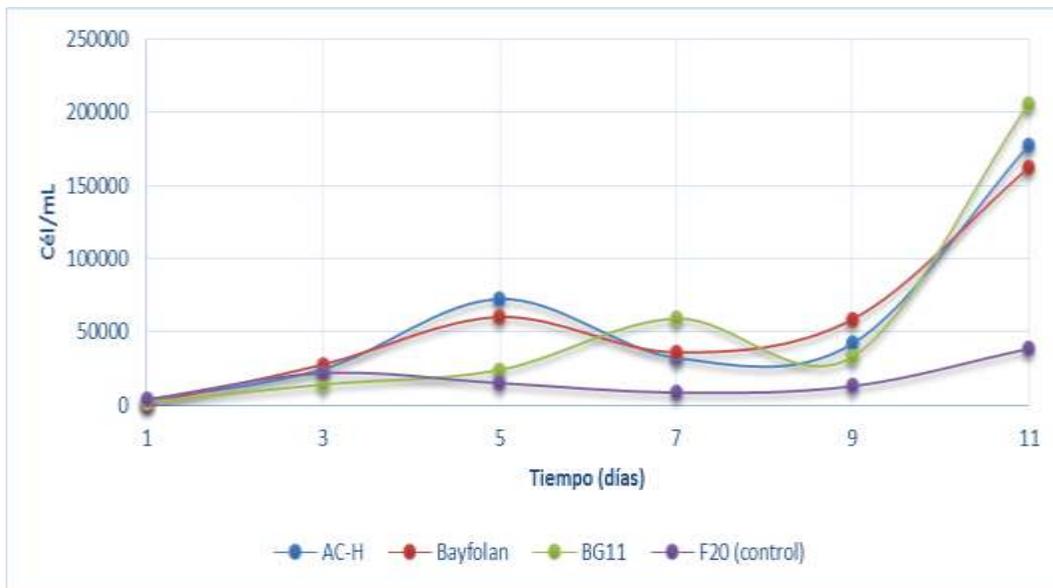


Gráfica 9. Curva de crecimiento de *B. braunii* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos de 20:4 luz: oscuridad 1L

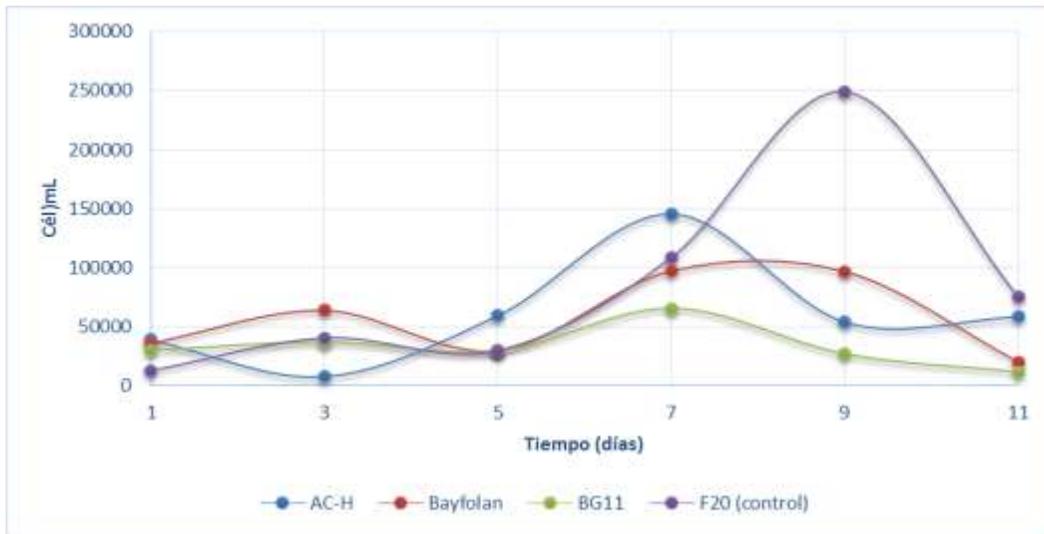


Gráfica 10. Curva de crecimiento de *B. braunii* en 2 medios de cultivo diferentes, en ciclo de 12:12 luz:oscuridad en bioreactores de 16 L.

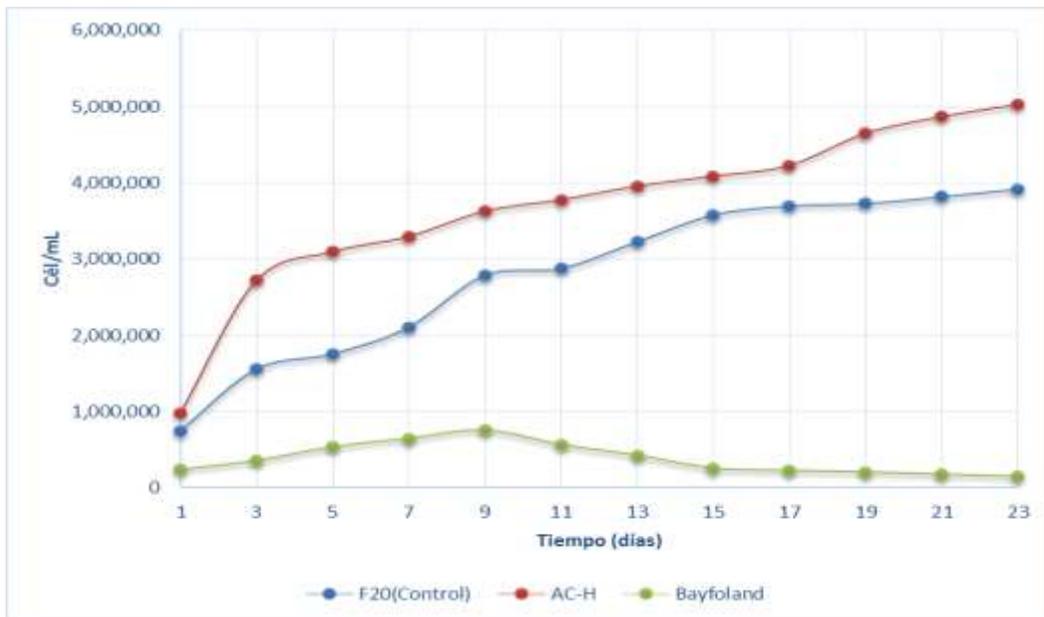
Desmodesmus quadricauda



Gráfica 11. Curva de crecimiento de *D. quadricauda* en cuatro medios de cultivo diferentes en ciclos 12:12 luz: oscuridad 1L



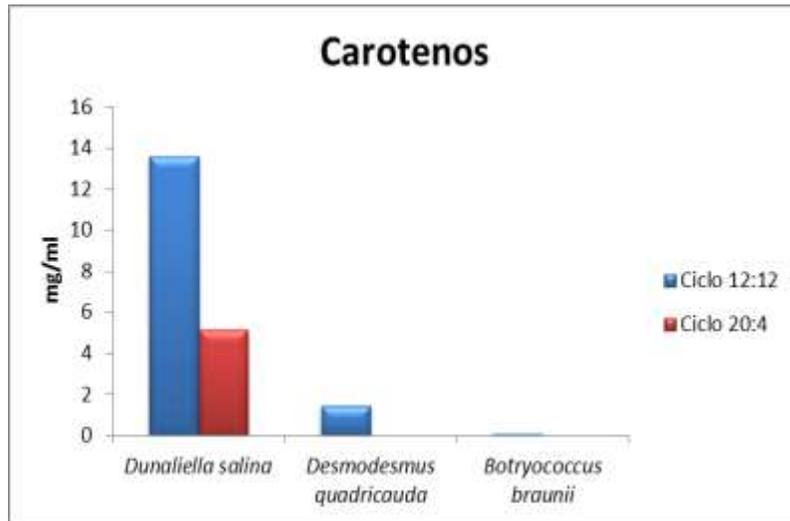
Gráfica 12. Curva de crecimiento de *D. quadricauda* en tres medios de cultivo diferentes en ciclo de 20:4 luz:obscuridad 1L



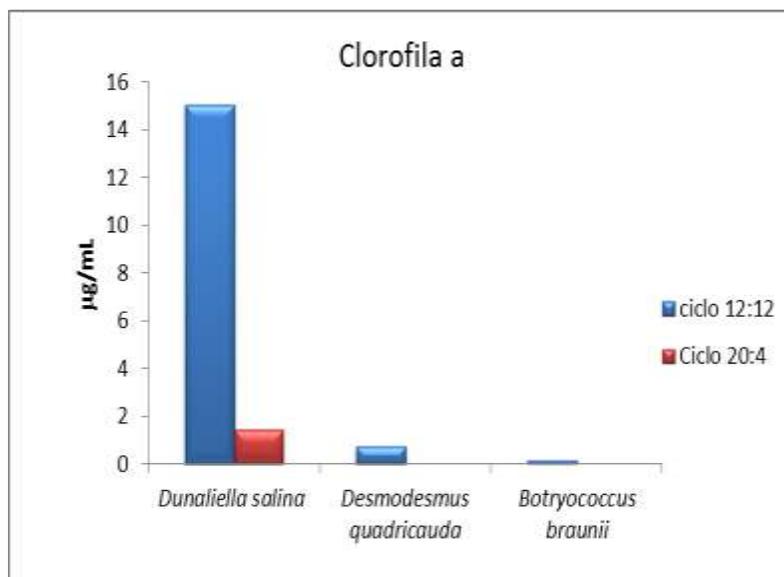
Gráfica 13. Curva de crecimiento de *D. quadricauda* en tres medios de cultivo diferentes en ciclo de 20:4 luz:obscuridad 16 L

7.3 Pigmentos

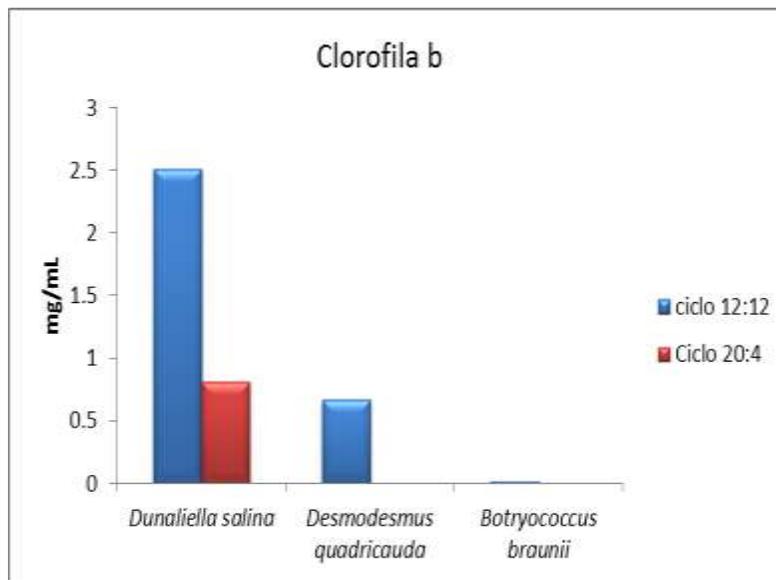
Se realizaron los análisis de los pigmentos fotosintéticos más importantes, evaluando clorofila *a*, clorofila *b* y los carotenoides totales.



Gráfica 14. Carotenoides totales en 3 especies de microalgas, en 2 ciclos diferentes de luz: Oscuridad.



Gráfica 15. Clorofila a obtenida en 3 diferentes especies de microalgas en 2 ciclos diferentes de luz: oscuridad.



Gráfica 16. Clorofila b obtenida de 3 especies de microalgas en dos ciclos diferentes de luz: obscuridad

7.4 Análisis Bromatológicos

Microalga	Vol	Medio	Ciclo	Carbohidratos %	Lípidos %	Proteínas %
<i>Dunaliella salina</i>	16 L	AC-H	12:12	10	57.7	18
	16 L	BG11	12:12	3	74.8	17
	16 L	ÁC-H	20:4	4	72.3	9
<i>Botryococcus braunii</i>	16 L	F20	12:12	11	13.9	10
	16 L	AC-H	12:12	12	59.2	13
<i>Desmodesmus quadricauda</i>	16 L	F20	20:4	11	21.54	4

Tabla 14. Porcentaje de Carbohidratos, lípidos y proteínas obtenidos de las 3 especies de microalgas utilizadas para este estudio en los dos diferentes ciclos y diferentes medios.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La especie *Dunaliella salina* en ciclo 12:12 luz: oscuridad en volúmenes de 1L presentó muy poca producción de biomasa en los medios de cultivo Bayfolan y L1 mientras que en los medios AC-H y BG11 presentó un incremento celular importante, y particularmente en el medio AC-H se pudo apreciar que se mantuvieron en fase exponencial, cuando el control ya se encontraba en fase estacionaria (Gráfica 4).

En el ciclo de 20:4 luz:oscuridad en volúmenes de 1L (Gráfica 5) los cultivos que se mantuvieron en fase exponencial fueron los de los medios L1, Bayfolan y AC-H, este último con un mayor incremento celular, En este caso los medios que dieron mejor resultado fueron AC-H y BG11, por lo que se utilizaron para las escalas a biorreactores de 16L.

En biorreactores de 16 L los cultivos de *D. salina* fueron exitosos con ambos medios, en el ciclo 12:12 (Gráfica 6) presentando un comportamiento similar y alcanzando su fase exponencial en el día 15. En el ciclo 20:4 (Gráfica 7) se pudo notar un crecimiento exponencial y estacionario con el medio AC-H mostrando que el medio BG11 no fue el adecuado en este periodo ya que no hubo crecimiento.

Para el caso de *B. braunii* en el ciclo 12:12 luz:oscuridad en volúmenes de 1 L (Gráfica 8) se observó un comportamiento similar en los 4 medios, despuntando el medio control, seguido de el medio AC-H y al final el medio BG11 y Bayfoland con una menor producción celular, pero manteniéndose en crecimiento. En el ciclo 20:4 (Gráfica 9) se presentó un caso contrario en los medios, ya que el medio control y AC-H tuvieron una menor producción celular Siendo los medios AC-H y F/2 la mejor opción para el escalamiento a biorreactores de 16 L.

En biorreactores de 16 L en ciclo 12:12 (Gráfica 10) *B. braunii* presentó un comportamiento semejante en los dos medios, con una producción mayor en el medio alternativo AC-H.

B. braunii en el ciclo 12:12 obtuvo un crecimiento con el medio control con un máximo de 30,616 cél/ml, pero la cantidad de biomasa obtenida fue menor que en los cultivos de 1 L, donde se lograron 131,000 cél/ml como máximo con el mismo medio y en un menor tiempo. Resultados de varios estudios indican que el perfil lipídico de *B. braunii* es apto para la producción de biodiesel, pero debido a la baja velocidad de crecimiento de esta microalga en condiciones de limitación de nutrientes (tiempo de duplicación de 72 horas) y que el escalamiento de los cultivos no es económicamente viable, han llegado a la conclusión de que esta especie no es útil para la producción de combustibles (Sheehan *et al.*, 1998) lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde el volumen celular no fue el esperado en el tiempo estudiado.

D. quadricauda en volúmenes de 1 L en el ciclo 12:12, mostró una buena adaptación, crecimiento y producción celular en los 3 medios alternativos (Gráfica 11). En el ciclo 20:4 mostró un comportamiento similar en todos los medios, sobresaliendo el control con una mayor producción celular (Gráfica 12) tomando en cuenta esto, se escalaron en biorreactores de 16 L con los medios AC-H y Bayfolan que resultaron ser más eficientes y F/2 como control.

En biorreactores de 16 L en ciclo 20:4 se tuvo una mejor producción celular con el medio AC-H, seguido de F/2 y por debajo Bayfolan. (Gráfica 13).

Haciendo una comparación, la especie *Desmodesmus quadricauda* en ciclo de 20:4 luz:oscuridad y en volúmenes de 1 L se obtuvo un máximo de 249,080 cél/ml en medio F/2, pero en los bioreactores de 16 litros produjo un crecimiento de 2.9×10^6 cél/ml en el mismo medio. En condiciones normales de luz: oscuridad

12:12 y en volúmenes de 1L se adaptó muy bien, su crecimiento fue bueno en todos los medios de cultivo observando un máximo de 205, 720 cél/ml en el medio BG11, seguido del medio AC-H con 177, 880 cél/ml y Bayfoland con una producción de 162, 000. La especie *D. quadricauda* ha sido reportada en muchos estudios para producción de biomasa algal e incluso remoción de nutrientes de aguas residuales municipales. También se han aislado algunos componentes bioquímicos menores de interés en la industria del perfume. Diferentes cepas de *Scenedesmus* o cultivos mixtos, se utilizan como sustrato de digestión anaeróbica para la producción de metano (Eisenberg *et al.*, 1979).

Además del análisis de la cantidad de biomasa producida, es sumamente importante analizar la calidad de la misma. En la tabla 14 se observa el porcentaje de carbohidratos, proteínas y lípidos obtenidos en las especies elegidas después de haber hecho los análisis bromatológicos mostrando que en estas condiciones experimentales la especie *D.salina* obtuvo los porcentajes más altos de lípidos con el medio AC-H, seguida de *B.braunni* y al final *D. quadricauda*, esto difiere de algunos trabajos de investigación donde reportan que *B. braunii* tiene la mayor cantidad de lípidos. (Becker, 1994)

Con respecto al análisis de pigmentos fotosintéticos, la acumulación de estos, particularmente carotenos, durante condiciones de estrés con la especie *D. salina*, ha sido ampliamente documentado, los cuales tienen gran importancia comercial por ser utilizados como colorantes en la industria alimenticia, en productos tales como las margarinas, mayonesas, jugos de naranja, helados, quesos y productos de panificación. (Liang *et al.*, 2004; Olaizola, 2003; Tseng y Jiao, 2001).

De esta manera, se puede afirmar que esta microalga responde al estrés acumulando pigmentos carotenoides en una relación mayor a las otras especies que utilizamos en este trabajo.

La Gráfica 14 muestra los carotenos totales obtenidos de las 3 especies de microalgas, siendo *Dunaliella salina* la que obtuvo mayor cantidad en el ciclo de 12:12 con un máximo de 13.57 $\mu\text{g/mL}$ en el medio AC-H, seguida de *D. quadricauda* quien obtuvo un máximo de 1.44 $\mu\text{g/mL}$, *B. braunii* obtuvo solo el 0.11 $\mu\text{g/mL}$, en el ciclo de 20:4 *D. salina* obtuvo 5.12 $\mu\text{g/mL}$ en el mismo medio de cultivo (AC-H).

La Gráfica 18 muestra el perfil de clorofila a obtenido de las 3 especies de microalgas siendo *D. salina* en ciclo 12:12 la que presenta una mayor acumulación 15.06 $\mu\text{g/mL}$, seguida de *D. quadricauda* con 0.74 $\mu\text{g/mL}$ y con una menor acumulación *B. braunii* con 0.169 $\mu\text{g/mL}$, en ciclo de 20:4 *D. salina* presenta una acumulación de 1.44 $\mu\text{g/mL}$.

La gráfica 13 muestra el perfil de clorofila b obteniendo resultados similares con una acumulación de 2.51 $\mu\text{g/mL}$ de *D. salina*, 0.66 $\mu\text{g/mL}$ *D. quadricauda* y 0.019 $\mu\text{g/mL}$ de *B. braunii* en ciclo 12:12 y para el ciclo 20:4 *D. salina* 0.81 $\mu\text{g/mL}$.

En *B. braunii* no se reportan pigmentos carotenoides en la literatura y su baja producción de pigmentos se debe a que esta especie tiende a almacenar lípidos como productos de reserva, mientras que la *D. salina* se reporta que acumulan altos niveles de β -caroteno sobre todo en condiciones de estrés lumínico (Ben-Amotz, 1996).

Resumiendo el análisis de los resultados, podemos afirmar que el fertilizante foliar Acido Húmico de Lombriz es una buena alternativa para la producción masiva de biomasa algal en ambos ciclos de luz: oscuridad, siendo el ciclo de 12:12 el más conveniente tanto en volúmenes de 1 y de 16 L.

Las especies elegidas en este estudio producen lípidos susceptibles de transformarse en biocombustibles, *Desmodesmus quadricauda* aunque su

porcentaje de lípidos no es muy alto, es una especie cosmopolita que se adapta fácilmente a condiciones y medios de cultivo diferentes con alta tasa de producción de biomasa algal, entre otras cosas, por lo que resulta interesante para este fin. *B. braunni* por su baja tasa de reproducción no ha sido explotada industrialmente, en este estudio se logró una buena producción de biomasa algal en las condiciones de estrés en el ciclo de 20:4, y particularmente con el fertilizante foliar Bayfoland forte; sin embargo al escalarlas a 16 L los resultados no fueron favorables en producción de biomasa algal en ciclo 20:4. *D. salina* es muy eficiente en producción de biomasa algal y contenido de lípidos, esta especie se sabe que es capaz de tolerar un amplio rango de condiciones ambientales, incluyendo altas intensidades luminosas, altas temperaturas, un amplio rango de pH y deficiencias de nitrógeno y/o fósforo. (Lerche 1973, Loeblich 1982, Ben-Amotz and Avron 1983, Borowitzka *et al.* 1984) y en nuestro estudio resultó ser la más eficiente.

Las microalgas se han propuesto como una posible alternativa de materia prima para la producción de biocombustibles, ya que no requieren una gran extensión de tierra para el cultivo, poseen una alta tasa de crecimiento y acumulan una cantidad satisfactoria de lípidos, siendo en su mayoría lípidos neutros debido a su menor grado de insaturación y capacidad de acumulación, ya sea en la fase lag o exponencial dependiendo de la cepa. Esto hace que los lípidos de microalgas un potencial de sustitución del combustible (Casadevall *et al.*, 1985; McGinnis *et al.*, 1997).

En el campo de la medicina pueden ser utilizadas por los pigmentos que contienen, el β -caroteno, antioxidante y el eficiente captador de radicales que disminuye el riesgo de cataratas y de enfermedades degenerativas de la retina relacionada con el envejecimiento. Por otro lado las microalgas representan una importante reserva de ácidos grasos omega 3, cuyos derivados son efectivos en la prevención y tratamiento de ciertas patologías, incluyendo enfermedades de

cáncer, siendo además altamente prometedores para el tratamiento de ciertas formas de enfermedad mental. (Olaizola, 2003; Liang *et al.*, 2004).

Por lo tanto estudios como el presente son de vital importancia para el desarrollo de la ciencia y brindan información relevante para poder explotar a gran escala y de manera sustentable este recurso.

La importancia de utilizar cepas nativas radica en la plasticidad que estas tienen al adaptarse a las condiciones ambientales propias de la región, lo que facilita su explotación y producción a gran escala, aunado a esto al utilizar fertilizantes agrícolas para cultivos masivos de microalgas, abarataremos costos de producción y esto beneficiaría su producción a gran escala. En esta investigación probamos dos diferentes fertilizantes foliares de bajo costo y que demostraron eficiencia en las diferentes condiciones de cultivo con las tres especies microalgales.

9. LITERATURA CITADA

Abalde J., A. Cid., P. Fidalgo., E. Torres y Herreno C. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de Coruña, España, 210 p.

Abelovich A. (1986). Algae in wastewater oxidation ponds. *En: Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.), CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 331-338.

Akkerman I, M. Janssen., J. Rochac y Wijlelsd R. H. (2002) Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11-12): 1195–208.

Al-Zuhair S. (2007). Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 1: 57-66.

Arad S. (1988). Production of sulfated polysaccharides from red unicellular algae. *En: Algal Biotechnology*. Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y. Morvan, H y Cristiaen, D. (eds), Elsevier Applied Science Pub., Amsterdam. pp: 65-87.

Arredondo-Vega B. O. y Vázquez-Duhalt R. (1991) Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 99-111.

Arredondo-Vega B.O. y Votolina D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. CIBNOR. 97p.

Bachofen R. (1982). The production of hydrocarbons by *Botryococcus braunii*. *Experientia* 38: 47.

Banerjee A., R. Sharma., Y. Chisti. y Banerjee U. C. (2002). *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*. 22, 3: 245–279.

Barnwal B. K. y Sharma M. P. (2005). Prospects of biodiesel production from vegetables oils in India. *Renew Sustain Energy Rev.* 9:363–78.

Becker E. W. (1994). *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge Press. 293 pp.

Ben-Amotz A. (1996). Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 32: 272-275.

Ben-Amotz A. y Avron M. (1989). The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. *En: Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Cresswell, R.C., Ress, T.A. & Shah, N. (eds.). Longman Scientific and Technical Press. London.

Ben-Amotz A., S. Mokady y Avron M. (1988). The beta-carotene-rich alga *Dunaliella bardawil* as a source of retinol in rat diet. *Br. Journal Nutrition*. 59: 443.

Ben-Amotz A., T.G. Tornabene y Thomas W. H. (1985). Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phyco.* 21: 72-81

Ben-Amotz, A. y Avron M. (1983). On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 72: 593-597.

Blackburn S. I., C. J. S. Bolch., K. A. Haskerd y Hallegraeff G. M. (2001). Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*. 40: 78-87.

Bligh G. E. y Dyer J. W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. and Physiol.* 37(3): 911-917.

Borowitzka L J., M. A. Borowitzka y Moulton T. (1984). Mass culture of *Dunaliella*: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia* 116/117: 115–121.

Borowitzka M. A. y Borowitzka L. J. (1988a). *Dunaliella* *En: Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka, M.A. and y Borowitzka, L.J. (eds), Cambridge University Press. Cambridge. pp: 27-58.

Borowitzka, M. A. y Borowitzka L. J. (1988b). Fast, oils and hydrocarbons. *En: Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka, M.A. and y Borowitzka, L.J. (eds), Cambridge University Press. Cambridge. pp: 27-58.

Boussiba S. (1988). N₂-fixing cyanobacteria as nitrogen biofertilizer a study with the insolate *Anabaena azollae*. *Symbiosis* 6: 129-138.

Brown, M.R., S.W. Jeffrey y Garland C.D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in marine culture. A literature review. *CSIRO Marine Reports*, No. 205. 44 pp.

Casadevall, D E. Dif, C. Largeau, C. Gudin, D. Chaumont, y Desant O. (1985). Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition, *Biotech. Bioeng.* 27 286–295.

Chisti Y. (1980-81) An unusual hydrocarbon. *J Ramsay Society*. 27–28, 24–26.

Chisti Y. (2005). Down the drain and forgotten: Biotreatment of wastewater. *Biotechnol. Adv.* 23: 175-176.

Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.

Cohen Z. (1986). Products from microalgae. *En: Handbook Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (Ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp.: 421-454.

Dismukes G.C., D. Carrieri., N. Bennette., G.M. Ananyev y Posewitz M.C. (2008) Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr Opin. Biotechnol.* 19:235- 240.

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

Dunahay T. G., E. E. Jarvis, S. S. Dais y Roessler P. G. (1996). Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57–58:223– 31.

Dunstan, W. M y Tenore K. R. (1972). Intensive outdoor culture of marine phytoplankton enriched with treated sewage effluent. *Aquaculture* 1: 181-192.

Eisenberg, D. G., W. J. Oswald., J. R. Benemann., R. D. Goebel y Tiburzi T.T. (1979). Methane fermentation of microalgae. *En: Proceedings of the 1st International Symposium on Anaerobic Digestion*. Cardiff: University Colleges. Pp: 123-135.

Fedorov A. S., S. Kosourov., M.L. Ghirardi y Seibert M. (2005). Continuous H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel two-stage, sulfate-limited chemostat system. *Applied Biochemistry Biotechnology*; 121(1-3): 403–412.

Felizardo P., M.J.N. Correia., I. Raposo., J.F. Mendes., R. Berkemeier y Bordado J.M. (2006). Production of biodiesel from waste frying oil. *Waste Manage.* 26(5): 487– 94.

Fried A., A. Tietz., A. Ben-Amotz y Echenberger W. (1982). Lipid composition of the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil*. *Biochemical at Biophysical Acta* 713:419-426.

Fukuda H., A. Kondo y Noda H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 405-416.

Garibay-Hernández A., R. Vázquez-Duhalt., M. P. Sánchez, L. Serrano y Martínez-Jiménez A. (2009). Biodiesel a partir de Microalgas. *Bioteconología Vol. 13* No. 3.

Gavrilescu M. y Chisti Y. (2005). Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*. 23(7-8):471–99.

Geider, R. J. y la Roche J. (2002). Redfield revisited: variability of C: N: P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology* 37: 1-17.

Geldenhays D. J., R. D. Walmsley y Toerient D. F. (1985). Laboratory studies on the suitability of a fertilizer-tap water medium for mass culture of algae. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1572-1576.

Ghirardi M. L., L. Zhang., J. W. Lee., T. Flynn., M. Seibert., E. Greenbaum y Melis A. (2000). Microalgae: a green source of renewable H₂ (2). *Trends Biotechnol.* 18:506–511.

Gouveia L y Oliveira A.C. (2009). Microalgae as raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 269- 274.

Granum E., S. Kirkvold y Myklestad S. M. (2002). Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology and Progress Series* 242: 83-94.

Guillard R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *En: W. L. Smith y M. H. Chanley (Eds.). Culture of Marine Invertebrates Animals.* Plenum Publishing. New York. 29-60.

Guillard, R. R. L. y Ryther J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. Journal of Microbiology*. 8: 229-239.

Guillard, R. y Hargraves P. E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a Chrysophyte. *Phycol.*, 32, 234-236.

Guschina I. A y Harwood J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. 45, 2: 160–186.

Harder R. y Von-Witsch H. (1942). Über Massenkultur von diatomeen. *Ber. Bot. Ges.* 60: 142.

Harrison P.J., R.E. Waters y Taylor F.J.R. (1980). A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal Phycology*. 16: 28-35.

Hu Q., M. Sommerfeld., E. Jarvis., M. Ghirardi., M. Posewitz., M. Seibert y Darzins A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-639.

Humphrey G. F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light dark regimes. *Journal of Experimental Marine biology and Ecology*. 40: 63-70.

Jeffrey S. W. y Humphrey G. F. (1975). New spectrophotometric equation for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural populations. *Biochimie and Physiology Pflanze*. 167: 191-194.

Kapdan I. K. y Kargi F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 5: 569–582.

Keller M.D., R.C. Selvin., W. Claus y Guillard R.R.L. (1987). Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *Journal Phycology*. 23: 663-638.

Kulkarni M. G y Dalai A. K. (2006). Waste cooking oil and economical source for biodiesel: A review. *Ind. Eng. Chem. Res.*; 45:2901–13.

Lerche W. (1973). Untersuchungen über die Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Archiv für Protistenkunde* 88: 236-239.

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

Liang X. Z., H. Choi., K. E. Kunkel., Y. Dai., E. Joseph., J. X. L. Wang y Kumar P. (2004). Development of the regional climate-weather research and forecasting model (CWRf). Part A: *Journal of Climate*.

Liu B. y Zhao Z. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82: 775-780.

Loeblich A. R. y Smith V. E. (1968). Chloroplast pigments of the marine dinoflagellate *Gyrodinium resplendens*. *Lipids*. 3: 5-13.

Loeblich L. A. (1982). Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of the Marine Biological Association. United Kingdom* 62: 493-508

Lowry O. H., N. J. Rosenbrough. A. L. Farr y Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry* 193: 265-

Ma F. y Hanna M. A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresour Technology*. 70: 1- 15.

Marsh B. J. y Weinstein B.D. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *J. of Lipid Res.* 7: 574-576.

Mata M. T., A. Martins y Caetano S. N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217–232

Materassi R., C. Paoletti., W. Balloni y Florenzano G. (1980). Some considerations on the production of lipids substances by microalgae and cyanobacteria. *En: Algae Biomass. Production and Use*. C.J. (eds.) pp: 265. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.

McGinnis K.M., T. A. Dempster y Sommerfeld M. R. (1997) Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*, *J. Appl. Phycol.* 9: 19–24.

Melis A. (2002). Green algae hydrogen production: progress, challenges and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(11-12):1217–1228.

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

Metting F.B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal Industrial Microbiology y Biotechnology*. 17(5-6):477–489.

Metzger P y Largeau C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology Biotechnology*. 66, 5: 486–96.

Mihnea, P. E. y Voinescu I. (1977). Mass production of unicellular algae in outdoor cultures by utilized waste water as a tropic source. *Rech. Mar.* 10: 155-168.

Nagasawa, H., R. Konishi., K. Yamamoto y Ben-Amotz A. (1989). Effects beta-carotene-rich algae *Dunaliella* on reproduction and body growth in mice. *In vivo*. 3: 79-82.

Nagle N. y Lemke P. (1990). Production of methyl-ester fuel from microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24–25, 1: 355–361.

Olaizola M. (2003). Commercial development of microalgas biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Review Science* 5: 1-8.

Paoletti M. (1976). Unsaponifiable matter of green and blue-green algal lipids as a factor of biochemical differentiation of their biomasses. 1. Total unsaponifiable and hydrocarbon fraction. *Lipids* 11: 258-265.

Rabbani, S., P. Beyer., J. Linting., P. Huegueney y Kleining H. (1998). Induced β -carotene synthesis driven by Triacylglycerol Deposition in the Unicellular Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 116:1239-1248.

Rittmann B. E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 203-212.

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

Roessler P. G., L. M. Brown., T. G. Dunahay., D. A. Heacox., E. E. Jarvis. Y Schneider J. C. (1994). Genetic engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 566:255–70.

Sawayama S., S. Inoue., Y. Dote y Yokoyama S. Y. (1995). “CO₂ fixation and oil production through microalga”. *Energy Convers Manag*. 36:729–31.

Schenk P.M., S.R. Thomas-Hall., E. Stephens., U.C. Marx., J.H. Mussgnug., C. Posten., O. Kruse y Hankamer B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res*. 1: 20-43.

Seshadri, C.V. y Thomas S. (1979). Mass culture of *Spirulina* using low cost nutrients. *Biotechnol. Left*. 1: 287-291.

Shariati M. y Hadi M. R. (2011) “Microalgal Biotechnology and Bioenergy in Dunaliella” *Biomedical Engineering*. 482-506.

Sharma Y. C., B. Singh y Upadhyay S. N. (2008). Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel*. 87: 2355-2373.

Sheehan J., T. Dunahay., J. Benemann y Roessler P. (1998). “A Look Back at the U.S. Department of Energy’s Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae”. *National Renewable Energy Laboratory (NREL) Report NREL/TP-580-24190*. Golden, CO.

Soeder, C.J. (1980). The scope pf microalgae for food and feed. *En: Algae Biomass. Production and use*. Shelef, G. and Soeder, C.J. (eds.), Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp: 9-20.

Song D., J. Fu y Shi D. (2008). Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chin. J. Biotech.* 24: 341-348.

Spolaore P., C. Joannis-Cassan, E. Duran y Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 101, 2:87–96.

Stanier R. Y., R. Kunisawa., M. Mandel y Cohen-Bazire G. (1971) Purification and properties of unicellular bluegreen algae (Order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35: 171205.

Strickland J.D. y Parsons T. R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. Pigments analysis. Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. *Fish Resource Building Canada Bulletin.* 167: 185-199.

Tseng M. M. y Jiao J. (2001). *Mass Customization, in: Handbook of Industrial Engineering, Technology and Operation Management* (3rd ed.). New York, NY: Wiley.

Vasudevan P.T. y Briggs M. (2008). Biodiesel production current state of the art and challenges. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology.* 35: 421-430.

Vázquez-Suárez A., M. Guevara., G. Salazar., Arredondo-Vega B. O. (2007). Crecimiento y composición bioquímica de cuatro cepas de *Dunaliella* para ser utilizadas en acuicultura. *Aquaculture* 41: 181-192.

Venkataraman L. V. (1986). Blue-Green Algae as biofertilizer. *En: Handbook of Microalgal Mass Culture.* Richmond, A. (ed), CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 455-472.

Waltz E. (2009). Biotech's new gold? *Nat. Biotechnol.* 27: 15-18

Williams P.J. (2007). Biofuel: microalgae cut the social and ecological costs. *Nature*, 450: 478.