



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala



**“Caracterización de la morfología, aislamiento y crecimiento de
Botryococcus Kützing (Chlorophyta) de un lago somero del
Estado de Puebla México”.**

Que para obtener el título de Biólogo

PRESENTA

Geovani Vazquez Cortes

Directora

M. en C. María Guadalupe Oliva Martínez



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al CCH-Azcapotzalco, la FES-Iztacala y la UNAM por formarme y mostrarme el camino.

A la M. en C. María Guadalupe Oliva Martínez por la beca otorgada para la financiación del presente trabajo, por brillar para mí como una estrella al proveerme de su amistad, tiempo y disposición, siempre.

Al Dr. José Luis Godínez Ortega, por el privilegio de dejarme acercar a su persona y laboratorio.

A los profesores Dr. Alfonso Lugo Vázquez, Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez y Mtra. Laura Peralta Soriano, por su entrega al revisar este proyecto y apoyarme con sus observaciones, además de enseñarme aspectos académicos.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias por su buen humor al mostrar el uso del microscopio electrónico de barrido.

Al Dr. Agustín de Jesús Quiroz Flores por su guía en el laberinto de la química.

A la Bióloga Itzel Moctezuma Pérez por el amor tan lindo que me brinda.

A mi mama Calletana Cortes Galindo y papa Abad Vazquez Castillo por darme la oportunidad de habitar este mundo.

A todos los amigos y familiares, que en cuerpo presente o a la distancia estuvieron junto a mí en este proceso, gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.-Antecedentes.....	2
1.2.- Justificación.....	3
2.- OBJETIVOS.....	4
3.-Area de estudio.....	5
4.-MATERIAL Y MÉTODO.....	6
4.1.-Trabajo de Campo.....	6
4.1.1.-Estaciones de muestreo.....	6
4.1.2.- Variables fisicoquímicas.....	7
4.2.-Trabajo de Laboratorio.....	7
4.2.1.- Aislamiento.....	8
4.2.2.-Experimentos de cantidad de luz para comparar crecimiento.....	10
4.2.3.-Estudios de morfología.....	12
4.2.4.-Estadística.....	13
5.-RESULTADOS.....	13
5.1.- Caracterización morfológica de la especie <i>Botryococcus braunii</i> ...	13
5.2.- Variables ambientales.....	18
5.3.-Experimento de radiación lumínica.....	19
6.-DISCUSIÓN.....	22
7.-CONCLUSIONES.....	29
7.1.-Perspectivas.....	29
8.-REFERENCIAS.....	30

1.- INTRODUCCIÓN

Las algas son organismos eucariotas fotosintéticos; contribuyen aproximadamente con el 50% del oxígeno atmosférico y forman parte de las comunidades acuáticas como fitoplancton, compuesto por organismos, microscópicos, que se desarrollan en la columna de agua, especialmente en la zona fótica, o fitobentos, organismos que crecen sobre diferentes tipos de sustratos, como plantas, animales, rocas, arena y arcilla. En los ambientes acuáticos las algas inician el flujo de energía, al ser el primer eslabón en la cadena trófica. (Preisig y Andersen, 2005; Gómez, 2007).

Cultivar microalgas es útil para diversos propósitos, como el conocer de una manera más directa las condiciones ambientales que influyen en su crecimiento en los ambientes acuáticos, así como también ser una alternativa básica para determinar las características taxonómicas y la identificación de las especies, conocer aspectos de su ciclo de vida, reproducción, fisiología, bioquímica y determinar el potencial biotecnológico de las especies (Preisig y Andersen, 2005).

Otras aplicaciones en las que su cultivo ha demostrado su potencial son: la alimentación para animales o humanos por su alto contenido de proteínas y lípidos, tal es el caso de algunas diatomeas y cianobacterias como *Spirulina* (Jaime-Ceballos *et al.*, 2007). También se pueden obtener sustancias para la industria farmacéutica y cosmetológica como algunos carotenos de *Haematococcus pluvialis* (Sosa, 2009) o de *Botryococcus sp.*, microalga que utiliza

una mezcla de ácidos grasos libres como sustancias tóxicas contra depredadores (peces) y organismos del zooplancton, por ejemplo rotíferos de los géneros *Keratella* y *Brachionus*, o cladóceros como *Bosmina* (Chiang *et al.*, 2004; Donne *et al.*, 2008). *Botryococcus* puede llegar a formar florecimientos que disminuyen la transparencia y el oxígeno disuelto del agua, formando natas de color naranja por el contenido de hidrocarburos (Huang *et al.*, 1988; Chiang *et al.*, 2004; Ikawa, 2004; Wu *et al.*, 2006). En un lago de Filipinas, se ha presentado este fenómeno durante los meses de mayo a septiembre, registrando la densidad más alta en julio. En una laguna hipereutrófica de Colombia, *Botryococcus* fue dominante, y aunque puede asociarse con diatomeas (*Cyclotella meneghiniana*) y euglenofitas (*Euglena oxyuris*), es capaz de reemplazar a otras Chlorococcales (*Keratococcus*, *Scenedesmus* y *Tetraedron*) e incluso a florecimientos de *Microcystis* y otras cianobacterias como *Aphanizomenon* y *Anabaenopsis* (Ramírez y Corbacho, 2004; Ramírez, 2005; Donne *et al.*, 2008). A *Botryococcus*, por su alto contenido lipídico se le denomina especie oleaginosa (Arredondo-Vega y Vázquez-Duhalt, 1991; Rodríguez y Ottone, 2003; Metzger y Largeau, 2005).

1.1.- Antecedentes

Casadevall *et al.* (1985) examinaron cultivos de *B. braunii* a partir de la Colección Gottingen (807/ 1), donde midieron el crecimiento algal, la producción de polisacáridos extracelulares, los hidrocarburos totales, la variación del pH del medio de cultivo, y la ultraestructura celular. Singh y Kumar (1992) estudiaron la producción de los lípidos e hidrocarburos con respecto a la limitación de nitrógeno

en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Zhang *et al.* (2011) determinaron el efecto del carbono orgánico sobre el crecimiento de *B. braunii*. Sakamoto *et al.* (2012) investigaron las condiciones óptimas de luz en *Botryococcus braunii*.

Weiss *et al.* (2012), hacen un estudio de la organización de la colonia de *B. braunii*, particularmente la vaina extracelular utilizando microscopio de fluorescencia y confocal.

En México se han realizado estudios florísticos del género *Botryococcus*, en los que se registraron las especies *B. braunii*, *B. prutuberans* y *B. sudetica* de ambientes lénticos como lagos, lagunas y embalses de los estados de Guanajuato, Puebla Michoacán y Estado de México (Ortega, 1984; Sánchez-Rodríguez y Vázquez, 1990; Mendoza-González *et al.*, 1985).

1.2.-Justificación

Esta microalga colonial ha despertado interés desde hace muchos años, debido a que produce y acumula cadenas largas de hidrocarburos líquidos que son precursoras de combustibles (Demetrescu, 1998; Rao *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2010). Las microalgas, como *Botryococcus*, son también adecuadas para limpiar aguas residuales con exceso de nitrógeno y fósforo (Salazar, 2006; Órpez *et al.*, 2009). En México no se han realizado investigaciones relacionadas con el cultivo y caracterización morfológica de las especies nativas de *Botryococcus* de lagos mexicanos, por lo que este estudio es una contribución al conocimiento de la morfología, taxonomía y cultivo de una especie nativa de un lago somero del Estado de Puebla. Por lo anterior, los objetivos planteados en este trabajo son:

2.-OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterización de la morfología, aislamiento y crecimiento de *Botryococcus* sp. de un lago somero del Estado de Puebla, México.

Objetivos particulares

1.- Determinar las características morfológicas del género *Botryococcus* presente en un lago somero artificial, utilizando microscopia de luz (ML) y microscopia electrónica de barrido (MEB).

2.- Medir las variables ambientales del sitio de colecta como pH, temperatura, oxígeno disuelto, porcentaje de saturación de oxígeno, conductividad eléctrica, nutrientes como nitratos, amonio y fósforo reactivo disuelto.

3.- Aislar un cultivo monoespecífico de *Botryococcus*.

4.- Estimar el crecimiento de *Botryococcus*, con base en la Densidad Óptica (D.O) y concentración de clorofila *a*, comparando su crecimiento a dos irradiancias (baja y alta), durante 15 días.

3. Área de estudio

En la localidad hacienda de Apulco municipio de Zacapoaxtla, Puebla se encuentra un lago somero artificial, ubicado en la latitud $19^{\circ} 54' 48''$ y longitud $97^{\circ} 36' 43''$ y a 1386 m.s.n.m. (Fig. 1). Este cuerpo de agua está dentro de la región hidrológica RH27 cuenca B (INEGI, 2005) y es alimentado por el Río Apulco, que con una corriente caudalosa y un largo recorrido por la Sierra Norte, baña la parte septentrional de oeste a este y sirve de límite por más de 10 kilómetros con Xochitlán, Nauzontla y Cuetzalan, Puebla. Este río presenta numerosos arroyos intermitentes que se unen a ríos colindantes, manantiales y acueductos. En el margen del río Apulco el clima es templado y subhúmedo ($C_{(m)}$), con lluvias en verano (1200 a 1500 mm) y densos bancos de niebla (Villa-Bonilla *et al.*, 2008.). Tal es así que la cascada la Gloria, ubicada en la misma localidad de Apulco, donde se encuentra el lago de estudio, presenta una gran riqueza de helechos y elevada humedad al estar situada en un bosque mesófilo de montaña (Jano-Tolano y Andrés-Hernández, 2012).

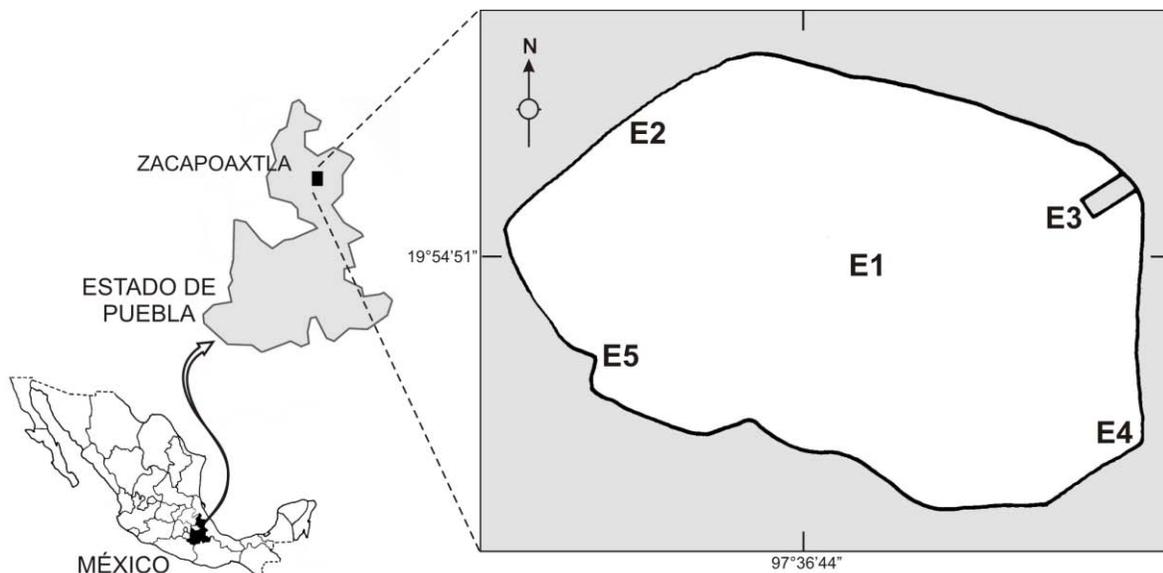


Figura 1. Localización del área de estudio y ubicación de las estaciones de muestreo.

4.-MATERIAL Y MÉTODOS

En la figura 2 se muestra el diagrama de flujo, que integra la metodología seguida para este estudio.

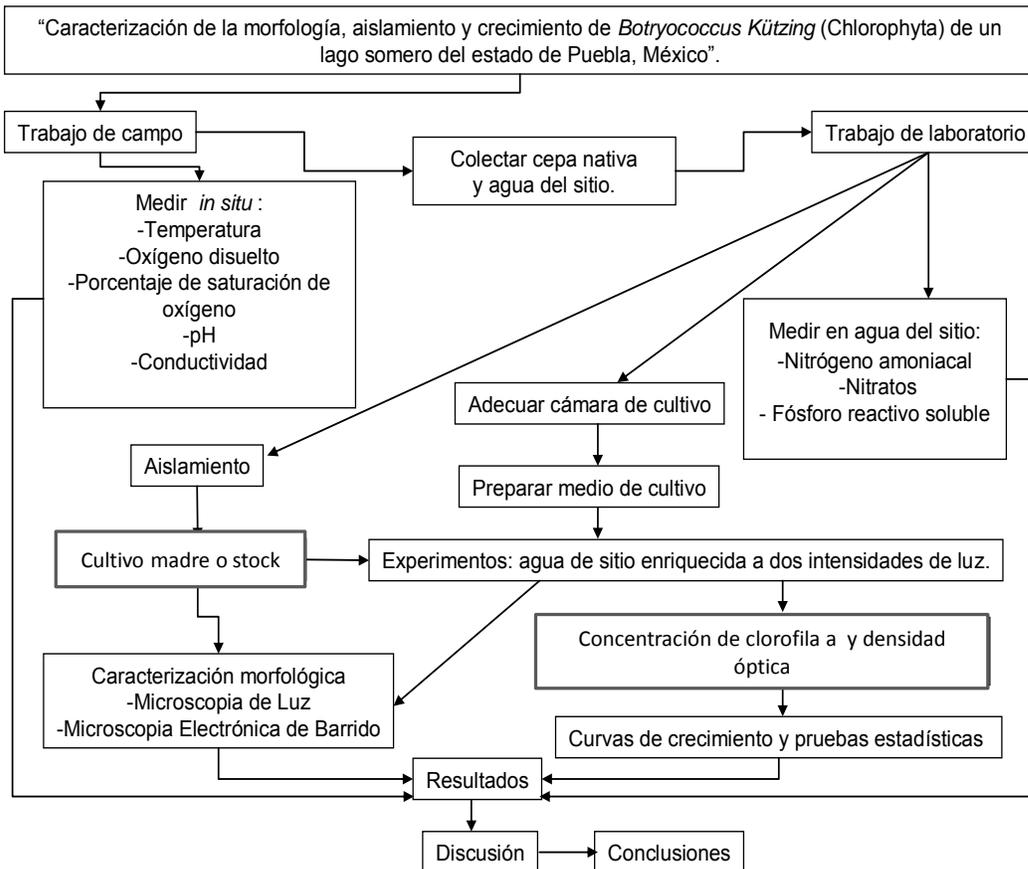


Figura 2. Diagrama de Flujo de la metodología.

4.1. Trabajo de Campo

4.1.1. Estaciones de muestreo

Se realizó una visita prospectiva en junio de 2012, se establecieron 5 estaciones y se hicieron observaciones preliminares en las que se observó una densa población de *Botryococcus*. En febrero y julio del 2013 se realizaron los

muestreos y la colecta formal en las cinco estaciones de muestreo establecidas (Fig. 1).

4.1.2. Variables fisicoquímicas

En cada estación, se midieron *in situ* temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxígeno disuelto (mg L^{-1}), porcentaje de saturación de oxígeno (S.O %), conductividad ($\mu\text{S/cm}$) y pH con un equipo multisensor YSI, modelo 556 MPS, y la turbidez con un disco de Secchi (cm). La radiación fotosintética activa (PAR $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) se analizó con un radiómetro marca LI-COR, modelo LI-250. Se colectó agua del sitio (80 L) para usar como medio de cultivo, utilizando filtros de 50, 1 y 0.22 μm de apertura de malla, para retener la mayor cantidad de partículas suspendidas y microorganismos (Preising y Andersen, 2005). Se obtuvo una muestra representativa de *Botryococcus* con una red de arrastre (20 μm de apertura de malla) y se suspendió en el agua ya filtrada del sitio de coleta. En cada estación, se tomaron muestras de agua del lago, en frascos de 500 ml y se conservaron a baja temperatura (4°C).

4.2.-Trabajo de Laboratorio

Una vez en el laboratorio, a las muestras se les determinaron, nitratos, amonio y ortofosfatos por método colorimétrico, de acuerdo con los métodos oficiales recomendados por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998).

Nitrógeno amoniacal por el método del salicilato, en donde los compuestos de amoníaco se combinan con el cloro para formar monocloramina y la monocloramina reacciona con salicilato formando 5-aminosalicilato, el cual se oxida en presencia de un catalizador de nitroprusiato sódico y se mide a 655 nm.

Nitrógeno de nitratos por el método de reducción de cadmio, en donde el cadmio metálico reduce a nitrito el nitrato presente en la muestra y el ión nitrito reacciona en medio ácido con el ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio intermedia, la cual reacciona con ácido gentísico y se mide a 500 nm.

Fósforo reactivo (ortofosfato) por el método del ácido ascórbico, en donde el ortofosfato reacciona con molibdato en un medio ácido, formando un complejo de fosfomolibdato, el cual es reducido por el ácido ascórbico y se mide a 880 nm.

4.2.1. Aislamiento

En el laboratorio se filtró la muestra obtenida de *Botryoccus* con una red de fitoplancton de 20 μm de abertura de malla. La suspensión se lavó con agua destilada estéril y agua del sitio filtrada. Las colonias se seleccionaron con una pipeta Pasteur, para depositarse en un embudo de separación, donde se eliminaron impurezas por medio de la sedimentación, la bifase se separa y la masa algal se lava varias veces hasta obtener una suspensión pura (Fig. 3) (Pérez, 1995; Guillard, 2005).

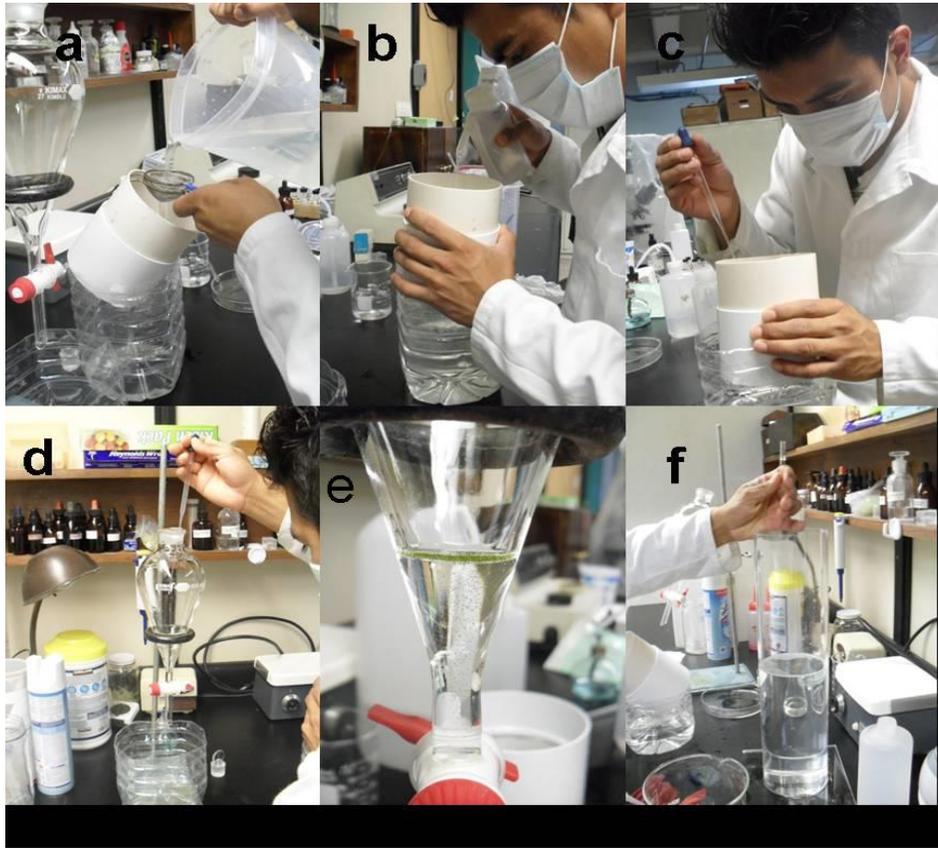


Figura 3. Aislamiento. a) filtración de partículas mayores a un milímetro y menores a 20 μm , b) lavadas con agua destilada estéril, c) selección de colonias, d) sedimentación, e) lavar con agua filtrada del sitio y separar, f) suspensión pura.

Para el cultivo en laboratorio se adecuó una cámara de incubación y con esta fue posible controlar condiciones esenciales en grado óptimo para el trabajo experimental (Fig. 4).

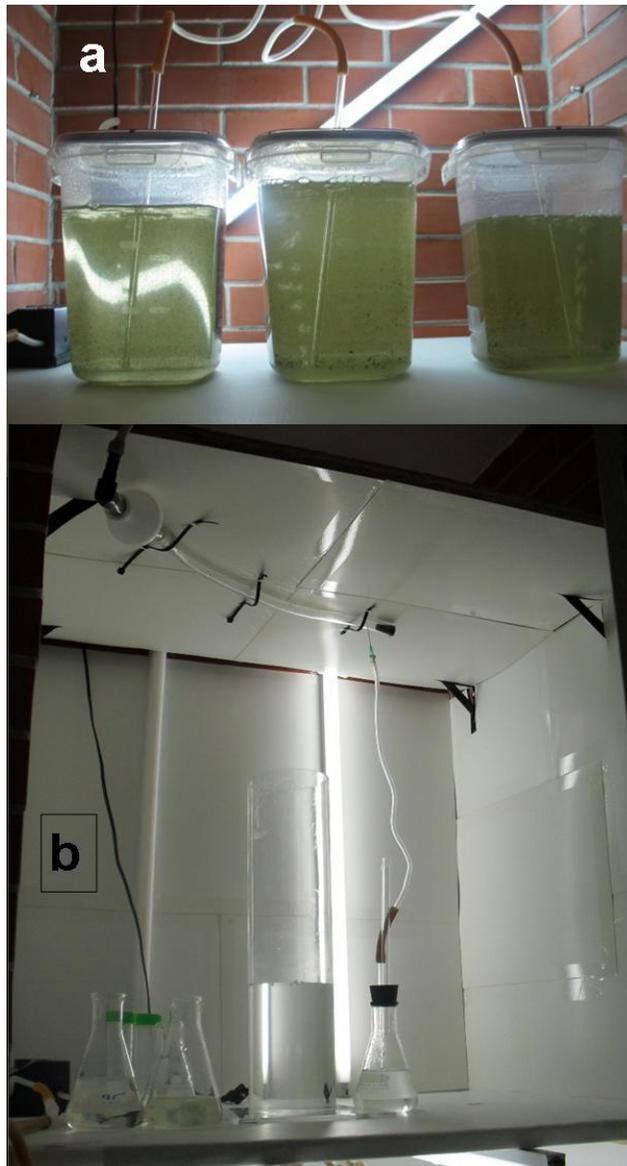


Figura 4. Cámara de incubación con cultivos stock (madre). a) cultivo stock, b) suspensión pura en cultivo.

4.2.2. Experimentos de cantidad de luz para comparar crecimiento.

Se llevó a cabo un experimento de baja radiación de luz ($40 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y otro de alta radiación de luz ($100 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bajo condiciones

controladas de laboratorio. Para cada tratamiento de luz se probó un inóculo de 20 mL de microalga del cultivo stock de cerca de 0.254 de D.O. , los cuales fueron colocados en 12 matraces con 150mL de agua del sitio, enriquecida al 20 % de medio Detmer +A₅ (Halperin, 1963) y con aireación continua libre de contaminantes a través de un filtro de alta eficiencia (0.2 μm) y trampa de agua destilada estéril (Kawachi y Noël. 2005).

Los matraces fueron mantenidos a 24±2°C con un termostato automático y una bomba de agua recirculante dentro de un contenedor (30 x 40 x 20 cm) con agua destilada. El crecimiento algal fue medido en el curso de 2 semanas tomando muestras al azar (20 mL) cada tercer día hasta completar 15 días (Fig. 5).



Figura 5. Lote de matraces en condiciones controladas durante cultivo experimental.

Densidad óptica

La tasa de crecimiento fue medida por el incremento de la densidad óptica y el porcentaje de transmisión de las colonias en suspensión a intervalos de tiempo

utilizando un espectrofotómetro, marca Bausch & Lomb modelo Spectronic 21, que detectó el incremento de la turbidez a 750 nm (Sorokin, 1973), utilizando la siguiente ecuación $T=I/I_0$ donde

I= La transmitancia de la muestra en porcentaje del blanco.

I_0 = Transmitancia ajustada para leerla a 100%

T= transmitancia la cual es convertida en Densidad Óptica (D.O.)

$$D.O.=\log (I_0 / I)$$

Clorofila a

Se filtraron tres muestras de 5 mL para determinar la concentración de clorofila a por el método de fluorescencia usando un fluorómetro Turner Designs modelo 10-AU por extracción en frío con acetona al 90% (Arar y Collins, 1997).

4.2.3. Estudios de morfología

Para los estudios de microscopia de luz (ML) se fijó con formol al 4% y se elaboraron preparaciones permanentes teñidas con distintos colorantes como verde brillante, azul de anilina y eritrosina azulosa (Kumar y Sing, 1979). Para contrastar la vaina mucilaginosa de las colonias se utilizó tinta china. Las preparaciones fueron revisadas con un microscopio marca Zeiss con cámara integrada Canon Photoshop y el software Axiovision 4.6.2.

Para los estudios de microscopia electrónica de barrido (MEB) las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2% (Largeau *et al.*, 1980) y deshidratadas con alcohol etílico en intervalos ascendentes hasta llegar al 100%. Posteriormente el alga se

llevó a punto crítico, se montó en platina y se observó en el MEB marca Hitachi modelo SU1510 en el Instituto de Biología, UNAM.

4.2.4 Estadística

Los datos fueron probados para la normalidad y homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas en las poblaciones comparadas). Las variables de D.O. y concentración de clorofila *a* fueron relacionadas contra el tiempo mediante una regresión lineal (SPSS Inc., 2008). Para los tratamientos de cantidad de luz (baja y alta) fueron comparados a través de su valores promedio utilizando la prueba estadística t-Student (Aguayo, 2007).

5.-RESULTADOS

5.1.- Caracterización morfológica de la especie *Botryococcus braunii*

Las colonias están compuestas de subcolonias, con células aglomeradas dispuestas en forma radial y periféricamente en grandes racimos botrioides, como uvas. Tienen un intervalo de longitud de 40.27-141.04 μm x 46.5-153.64 μm de intervalo en el diámetro (Fig. 6 a, b). El color puede variar entre, amarillo, verde, pardo, dorado y oscuro (Fig. 6 c-g). Las colonias están interconectadas por puentes e hilos de mucílago (Fig. 6 h-i). Las células se encuentran organizadas radialmente (Fig. 6 j) con la célula apical visible que emerge 1/3 de la copa mucilaginoso; en la parte apical se observa un copete de celulosa y pectina (Fig. 6 k) dentro de una matriz que mantiene unidas a las células con un pedúnculo, formado por dos o más ramas, cada una incluye uno o dos pares de individuos donde las células están incrustadas (Fig. 6 l-p). Las células aparecen como

individuos encapsulados con una pequeña cantidad de mucílago, de 4.7-8 μm de ancho y de 10.3-16.1 μm de largo (Fig. 6 q), la célula contiene organelos citoplasmáticos como: gránulos intracelulares (Fig. 6 r), pirenoide regularmente basal, a veces indistinto, no visible en las células de las colonias jóvenes (en los cultivos) (Fig. 6 s), cloroplasto parietal apical, núcleo, gotas de aceite, almidón, y pared celular (Fig. 6 t), que se sella a la matriz por un collar (Fig. 6 u); reproducción asexual por la formación de 4 autosporas (Fig. 6 v). Los ejemplares colectados en el lago Apulco coinciden con los caracteres morfológicos y las dimensiones celulares descritas por Largeau, *et al.* 1980; Prescott, 1982; Casadevall, *et al.*, 1985; Dillard, 1989; Komárek, y Marvan, 1992; Comas, 1996; Demetrescu, E. 1998; John, *et al.*, 2002; Guiry y Guiry, 2014, por lo cual se determinó que la especie corresponde a *Botryococcus braunii* Kützing.

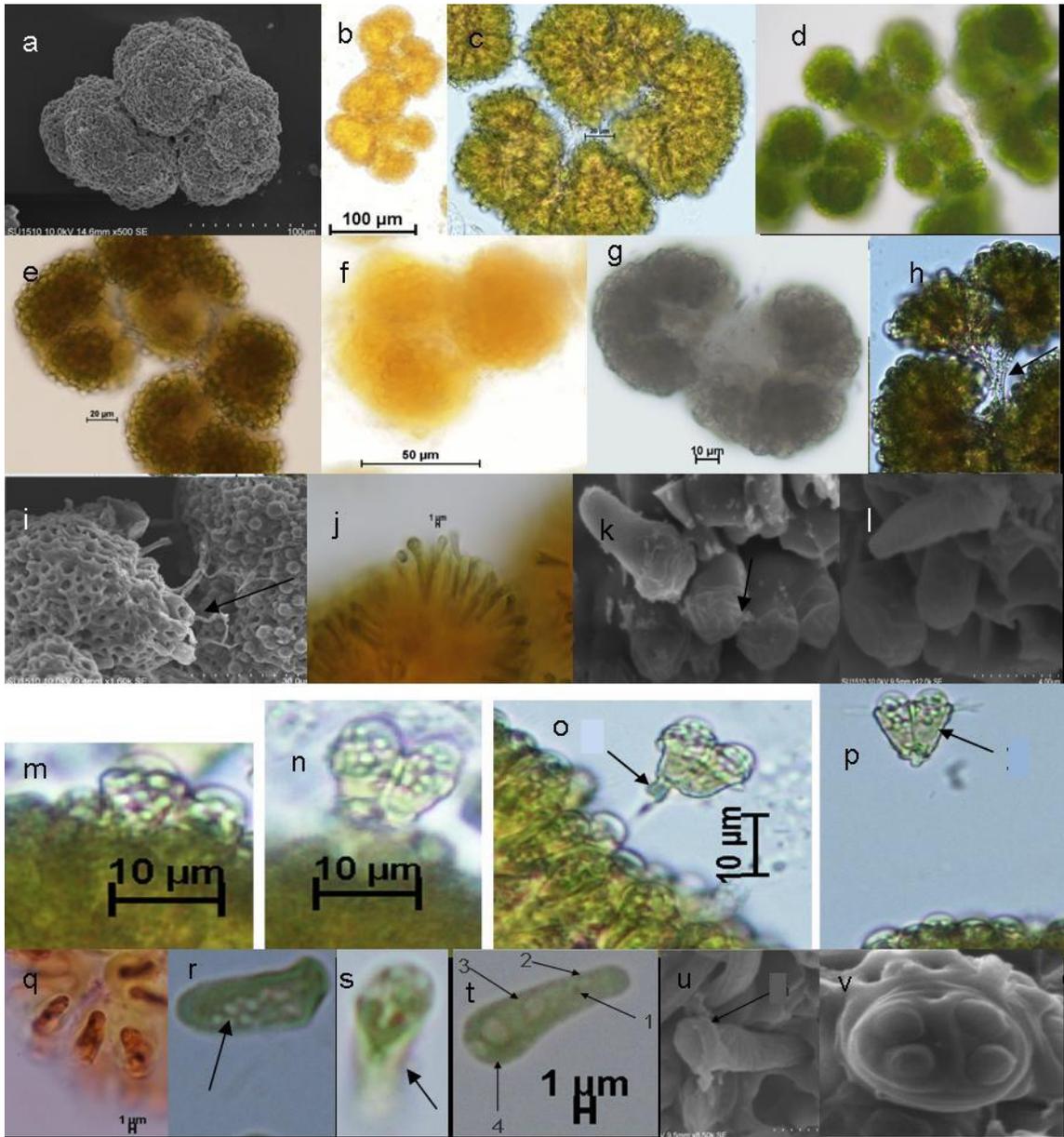


Figura 6. Imágenes en MEB y ML. a) y b). Colonia con una escala de 100 µm. c-g). Variación del color de las colonias. h) Puente de unión de las colonias. i) Hilos o hebras de mucilago. j). Arreglo radial de las células. k) Tapa apical. l) Detalle de las células insertadas en la matriz. m-p) Separación de las células conectadas a la matriz, o) pedúnculo, p) cutícula q) Envoltura mucilaginosa teñida con eritrosina azulosa. r) lípidos intracelulares teñidos con sudan III. s) Pirenoide. t) Señala: (1) Núcleo, (2) gotas de aceite, (3) almidón, (4) cloroplasto, u) Collar. v) Autosporas.

OBSERVACIONES

Algunas observaciones realizadas de las muestras de campo y del laboratorio características de *B. braunii* fueron: la expulsión de las gotas de aceite que salen de la matriz (Fig. 7 a-e). Presencia de células en forma de pera (Fig. 7 f) envuelta por una vaina mucilaginosa (Fig. 7 g), que alcanza al menos dos tercios de la longitud de la célula o casi se superpone a su ápice, pero nunca es completamente cerrada ya que son cubiertas desde el exterior por finos copetes mucilaginosos incoloros que según Casadevall *et al.* (1985) están compuestas por celulosa y pectina, también conocidos como tapa celular (Fig. 6 o, 7 h, i). Se llegó a ver la presencia de fibrillas o apéndices mucilaginosos los cuales son útiles para la captura de nutrientes como nitrógeno (Komárek y Marvan, 1992) (Fig. 7 j-k).

Al principio de su ciclo de vida, el mucílago es incoloro, se vuelve amarillento hasta amarillo/marrón formando la matriz mucilaginosa la cual protege y mantiene juntas a varias colonias que confluyen en una masa amorfa central (Fig. 7 l), al expulsar las células (Fig. 7 n) deja ver una matriz esquelética con cutículas vacías (Fig. 7 i, m). Se observó también a las células en proceso de división longitudinal (Fig. 7 ñ).

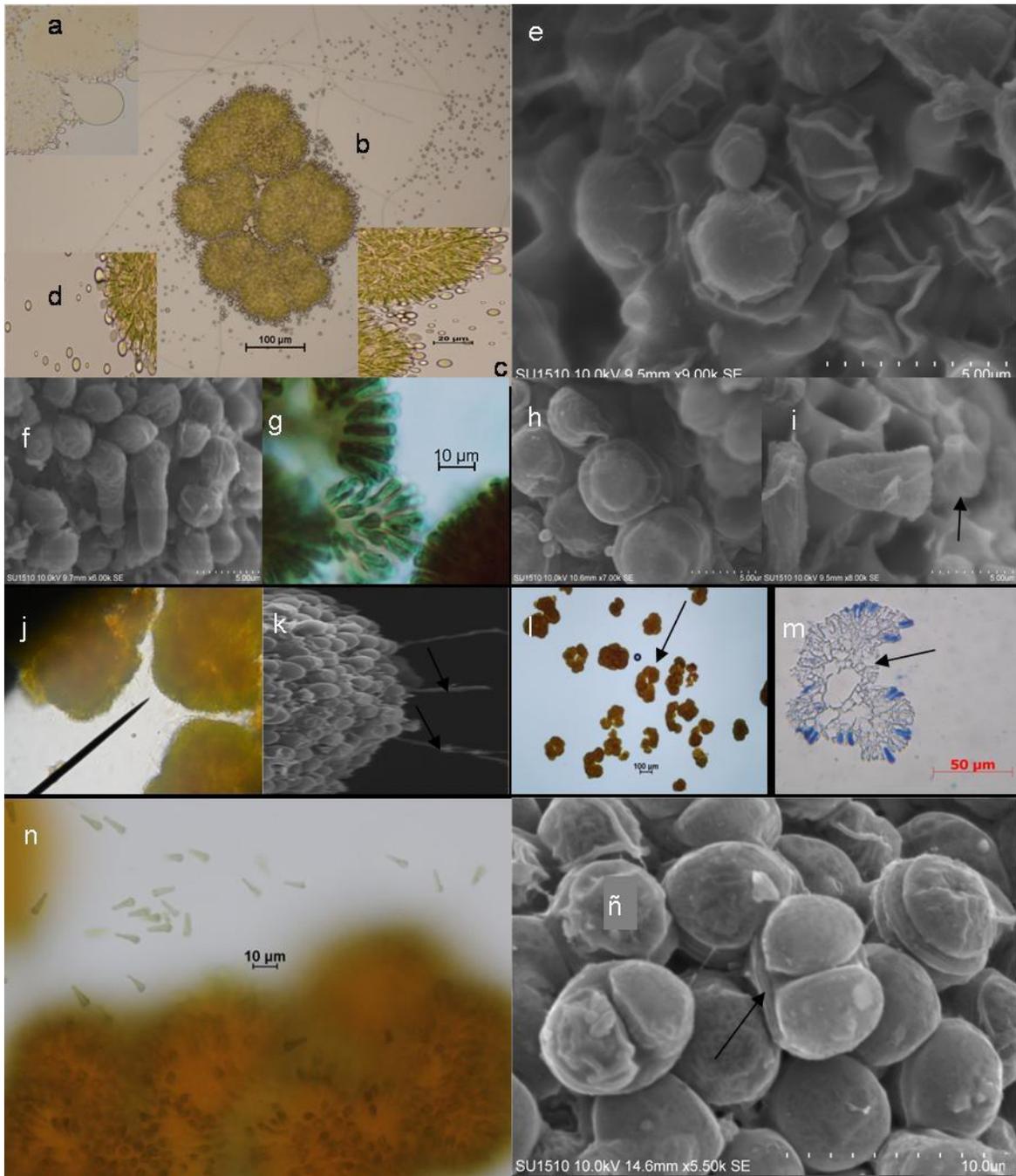


Figura 7. Imágenes en ML y MEB. a-e) Matriz expulsando gotas de aceite. f). Células. g) Células teñidas con verde brillante. h-i) Tapa celular. j-k) Apéndices de mucílago. l) Matriz con células. m) Matriz esquelética. n) Células expulsadas de la matriz. ñ) división celular

Ecología y distribución

Botryococcus braunii es una microalga distribuida en ambientes de agua dulce, lagos salobres y salinos, embalses o pequeños estanques situados en zonas continentales templadas a tropicales (Zalocar et al, 1998; Metzger & Largeau, 2005; Donne et al, 2008). En el mundo, *B. braunii* se ha registrado en las siguientes regiones:

Ártico: la isla de Ellesmere. Europa: Mar Báltico, Gran Bretaña, Alemania, Polonia, Rumania España. América del Norte: Arkansas, Ontario. Islas del Caribe: Martinica. América del Sur: Brasil. Asia: Turquía, China, Corea, Taiwán, Singapur. Oceanía: Nueva Zelanda Australia; Nueva Gales del Sur, Territorio del Norte, Queensland, Tasmania, Victoria (Guiry y Guiry, 2014). Recientemente *B. braunii* se encontró en lagos cráter, cenotes y estanques someros de Veracruz, Yucatán y Michoacán (Vázquez *et al.*, 2005; López-Adrián y Barrientos-Medina, 2005; Hernández-Morales *et al.*, 2008). En el área de estudio se encontró en el lago artificial de la Hacienda de Apulco, Puebla formando un florecimiento.

5.2.- Variables ambientales

Se realizaron tres muestreos en junio del 2012, febrero del 2013, y julio del 2013, en el sitio de colecta en el estado de Puebla, México. En la Tabla 1 se muestran los valores de las variables ambientales medidas *in situ* y en el laboratorio del lago de Apulco.

Tabla 1. Valores de las variables ambientales medidas en el presente estudio.

Fecha		08/06/2012				
Amonio (N-NH ₄ ⁺) mg L ⁻¹	0.103					
Nitratos (N-NO ₃ ⁻) mg L ⁻¹	0.466					
Ortofosfatos (P-PO ₄ ⁻³) mg L ⁻¹	0.223					
Fecha		17/02/2013				
Estación	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	
PAR $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Superficie	870.5	826.8	809.7	765.3	211.2	
PAR $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Interior (20cm)	376.9	326.9	322.5	306.2	128.3	
Temperatura °C	16.7	16.9	16.9	17.3	17.0	
pH	8.1	8.5	8.5	8.4	8.1	
Oxígeno disuelto mg L ⁻¹	9.5	9.5	9.6	10.0	9.5	
conductividad $\mu\text{S/ cm}$	96.5	99.0	100.1	104.1	98.8	
Fecha		28/07/2013				
Hora	12:10					
Profundidad cm	210	120	210	50	140	
Transparencia Secchi cm	24	26	22	20	30	
PAR $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Superficie	989.3	674.3	334.8	459.7	315.4	
PAR $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Interior (20cm)	1085.1	195.9	213.1	390.1	178.1	
Temperatura °C	22.2-25.0	22.4-25.2	22.3-24.3	25.8	22.3-25.5	
% de saturación de Oxígeno	57-111.2	100-108	53.3-162.2	108.8	92.5-109.6	
Oxígeno disuelto mg L ⁻¹	4.9-9.4	8.8-8.9	4.9-9.6	8.8	8.0-8.8	
pH	5.9-6.6	6.8-7.1	6.6-6.8	7.2	6.9-7.3	
conductividad $\mu\text{S/ cm}$	0.04	0.09-0.1	0.07-0.09		0.094-0.095	

5.3.-Experimento de radiación lumínica

En la figura 8 se muestra el crecimiento de los cultivos medido a través de su densidad óptica a 750 nm (Fig. 16 A, B) y la concentración de clorofila ($\log_{10} \mu\text{g L}^{-1}$) (Fig.16: C, D)

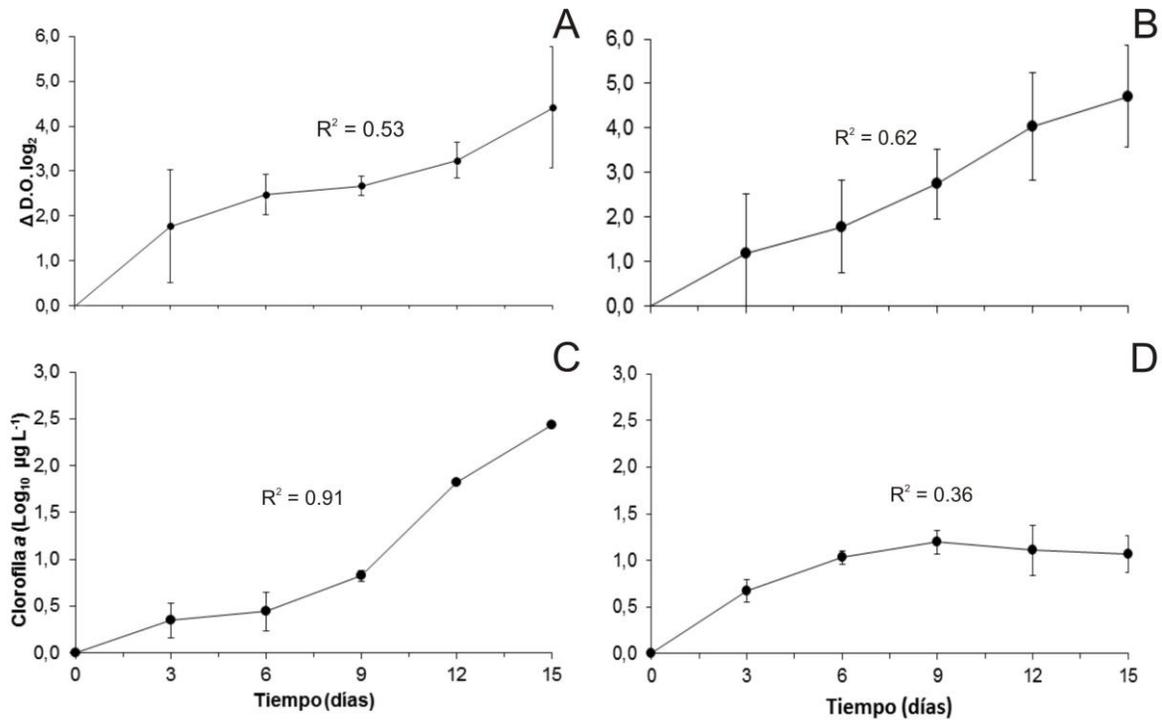


Fig.8. Curvas de crecimiento de *Botryococcus braunii*: A: Densidad óptica (750 nm) cultivada en baja irradiancia (40 $\mu\text{moles fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$). B: alta irradiancia (100 $\mu\text{moles fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$). C: concentración de clorofila a ($\log_{10} \mu\text{g L}^{-1}$) en baja irradiancia y D: concentración de clorofila a ($\log_{10} \mu\text{g L}^{-1}$) alta irradiancia durante 15 días.

En la figura 8 se observa la fase de crecimiento exponencial (Figs. 8: A y B) mostrando que el ajuste de la regresión lineal es ligeramente alta y significativa lo cual quiere decir que el tiempo explica un 53 % y 62% respectivamente el incremento de la densidad óptica ($R^2= 0.53$, $P=0.001$ y $R^2=0.62$, $P<0.05$). En la figura 8: C y D se muestran las fases exponenciales, específicamente en baja irradiancia con una alta significancia de la regresión ($R^2=0.91$, $P<0.05$) y en la cepa expuesta a alta irradiancia se observa una fase exponencial a los 9 días, seguido de una fase estacionaria con una regresión moderada contra el tiempo ($R^2=0.36$, $P<0.05$).

Comparando la D.O. en los tratamientos de irradiancia baja y alta no se encontraron diferencias significativas ($t = -0.047$, $gl=33$, $P > 0.05$). Sin embargo en las curvas de clorofila *a* de irradiancia baja y alta si se encontraron diferencias significativas ($t = -2.6$, $gl=66$, $P = 0.01$).

Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento calculada por el incremento de la densidad óptica y el porcentaje de transmisión de luz de las colonias en el tiempo, se presenta en la Fig. 9. En comparación del experimento de radiación baja que varió $5.0\% \text{ día}^{-1}$ el experimento de luz alta tuvo $2.4\% \text{ día}^{-1}$. Sobre el curso de 15 días la tasa de crecimiento en radiación baja fue de 17.2 ± 1.3 , 18.2 ± 0.7 , 19.9 ± 0.4 , 14.9 ± 0.8 y 16.4 ± 2.6 para los días 3, 6, 9, 12 y 15 respectivamente. En radiación baja la tasa de crecimiento se incremento significativamente del tercer día ($17.2 \pm 1.3\% \text{ día}^{-1}$) al noveno día ($19.9 \pm 0.4\% \text{ día}^{-1}$) ($t=22.1$, $gl=8$, $P < 0.05$); por el contrario en radiación alta (12.8 ± 0.7 a $15.2 \pm 1.5\% \text{ día}^{-1}$) hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento observadas con aumento gradual entre el tercer día y el 15vo. día. (t -student: $t=5.8$, $gl=14$, $P < 0.05$). La luz afectó de forma diferencial entre la luz baja y alta (t -student: $t=4.7$, $gl=28$, $P < 0.05$); sin embargo con tasas de crecimiento más altas en luz baja (Fig. 9).

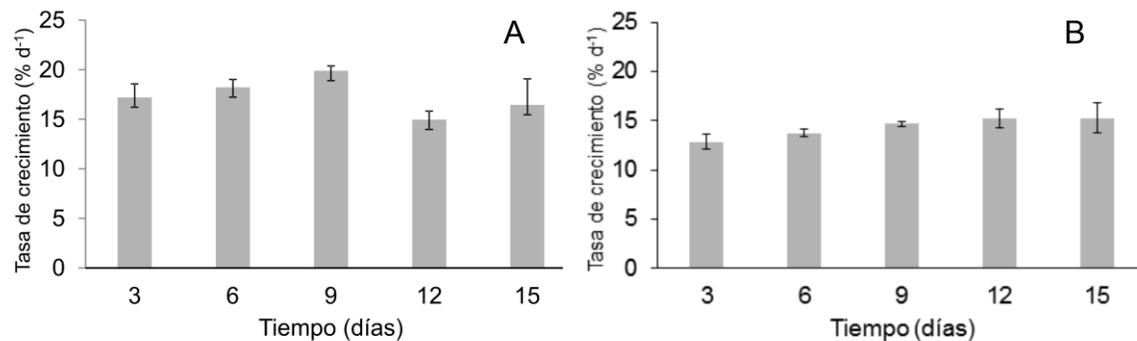


Figura 9. Tasa de crecimiento *Botryococcus braunii* (% día⁻¹) sujeto a dos tratamientos de intensidad de luz: A: 40 μmoles fotones m⁻²s⁻¹ y B: 100 μmoles fotones m⁻²s⁻¹, las barras negras muestran la desviación estandar.

pH

El pH (Fig. 10) en ambos experimentos se mantuvo estable entre 7-8.5 con un ligero aumento a partir del tercer día (7.75- 7.83) en ambos tratamientos (luz baja y alta), y un máximo en el 9º día (8.5) del tratamiento con radiación alta, esta medición nos permite conocer el intervalo de pH en el que *Botryococcus braunii* alcanza un mejor crecimiento.

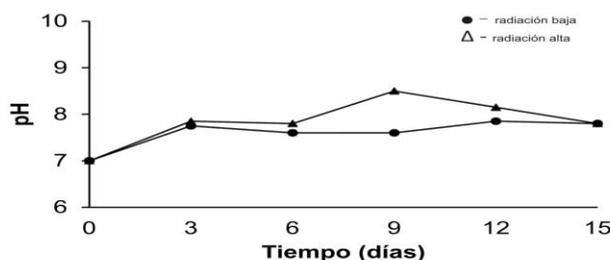


Figura 10. Comportamientos del pH en dos tratamientos de irradiancia (baja y alta) durante 15 días de crecimiento.

6.-DISCUSIÓN

Caracterización de la morfología

En el mundo se han registrado 12 especies del género *Botryococcus* (Guiry y Guiry, 2014) como por ejemplo: *B. comperei*, *B. australis* y *B. pila*; de acuerdo con

las características morfológicas y ecológicas observadas en los especímenes revisados, coinciden con la especie *B. braunii*, ya que por ejemplo a diferencia de *B. sudeticus* que presenta un mucilago delgado incoloro (Prescott, 1982), *B. braunii* presenta un mucilago grueso de color pardo principalmente, en colonias maduras cuando acumulan grasa. El color también se debe a la respuesta de la intensidad luminosa, ya que se incrementa la proporción de carotenoides (Sakamoto *et al.*, 2012), observaciones que coinciden con la especie de Apulco. Por su parte Metzger y Largeau (2005) mencionan que el contenido de nitratos y el crecimiento celular de la colonia influyen en la variación del color. Si su color se observa amarillo, verde claro a oscuro, indica la síntesis activa de olefinas no ramificadas, como el botryococceno; cuando es pardo-naranja significa un estado de reposo que conduce a la síntesis de hidrocarburos ramificados como el alcadieno y lycopodieno. Los cambios de coloración mencionados anteriormente fueron observados en las colonias estudiadas de *Botryococcus*.

El tamaño de la célula coincide con lo reportado en la bibliografía (Dillard, 1989; Parra *et al.*, 1983; Prescott, 1982). La forma de pera de la célula se diferencia de *B. fernandoi* con células ovoides, o en *B. calcareus* en forma de cuña usualmente con muescas (John, 2002). Otro carácter que confirma la especie *B. braunii* es la presencia de la tapa o copete celular, ausente en *B. neglectus* y *B. protuberans* (John, 2002; Prescott, 1982). De igual manera fueron confirmadas las biomoléculas características, es decir gránulos intracelulares de lípidos neutrales en forma de huevo (Sakamoto *et al.* 2012).

Se observó que la reproducción es por fragmentación o por formación de autosporas (Prescott, 1982) generalmente de 2 células (Fanes, 2009) y menos frecuente de 4, no se observaron autosporas de 8 células, característica que corresponde a *B. comperei* (Komárek y Marvan, 1992). Pueden preservarse en fase de autosporas hasta que las condiciones ambientales sean favorables; luego presentan su primera cutícula y por división longitudinal formando una nueva colonia, posteriormente éstas se unen por el mucílago y dan nacimiento a un agregado hecho de componentes coloniales (Demetrescu, 1998).

También los cambios morfológicos suelen presentarse en respuesta a modificaciones específicas de las condiciones del hábitat, por ejemplo el estado unicelular de desarrollo, puede indicar acumulación de metano (Metzger y Largeau, 2005), por lo cual es necesario conocer las variables ambientales.

Variables ambientales

Al hacer las medidas de las variables ambientales, se consideró a los nitratos y al amonio ya que son una fuente de nitrógeno, útil para crecimiento celular (Zhang *et al.* 2011). Incluso la velocidad de crecimiento y el contenido de clorofila *a* decrecen significativamente bajo deficiencia de nitrógeno (Singh y Kumar, 1992). En el caso de los nitratos con 0.466 mg L^{-1} muestran un contenido elevado con respecto al lago Nevado de Toluca (0.02 mg L^{-1} , Ortega *et al.*, 1995), sin embargo se considera una concentración normal para este tipo de lago mesotrófico. En cuanto a los fosfatos totales, no debería exceder los 0.025 mgL^{-1} dentro del lago, para

prevenir el desarrollo de especies biológicas indeseables y controlar la eutrofización acelerada (Semarnat, 2005); y como parte de este total son los ortofosfatos (PO_4^{-3}) que resultó con 0.223 mgL^{-1} , el cual se encuentra dentro de los valores del Lago de Chapala ($0.16 - 0.31 \text{ mg L}^{-1}$, Ortega et al., 1995), lo cual muestra un contenido considerable de fosfato; en esas circunstancias *B. braunii* muestra ser capaz de almacenar un excedente de fósforo, cualidad que le permite un alto crecimiento en medio libre de fósforo. El fosfato no es un nutriente limitante, sin embargo el estrés nutricional con la limitación de varios nutrientes incluyendo nitrógeno, fósforo y acumulación de autotoxinas pueden llevar a los cultivos a una alta acumulación de grasas, tal como lípidos polares y triglicéridos (Singh y Kumar, 1992) como resultado de la continua fijación de carbono (Casadevall et al. 1985). A esta alga se le ha visto crecer desde aguas oligomesotróficas hasta sistemas hipertróficos (Ramírez, 2005; Rao et al., 2010); Ramírez, 2005); pero, debido a que se observan elevadas concentraciones de nutrientes durante los florecimientos de esta especie, sugiere que el estado trófico de las aguas puede indicar una susceptibilidad a la formación de florecimientos (Donne et al., 2008).

La profundidad del lago estuvo entre 145 y 210 cm, lo cual coincide con la relación que hace Donne et al, (2008) de *Botryococcus braunii* con profundidades medias de 2 a 5 metros

En relación al pH, *B. braunii*, se comporta como una especie eurioica, ya que se midieron valores máximos de 8.53 (8.11 mínimo) en febrero, y valores ácidos de 5.9 en julio (7.35 máximo) (Rao et al., 2010).

Aunque en el lago estudiado la conductividad fue baja, durante florecimientos de esta especie en embalses se observaron valores mayores (de entre 2000 y 2700 $\mu\text{S cm}^{-1}$) de conductividad eléctrica, (Donne et al, 2008), valores que indican aguas con un mayor contenido mineral, (Ramírez, 2005).

Cultivo y crecimiento

La técnica aplicada en el presente trabajo para el cultivo y crecimiento de *Botryococcus* es un aporte importante en este campo. Anteriormente, Casadevall *et al.* (1985) mencionan que la producción de hidrocarburos es constante y se almacenan como líquido en el exterior de la pared, acumulándose normalmente fuera de la célula, en el espacio intercelular de la colonia. Los hidrocarburos pueden ser degradados lentamente por las bacterias asociadas a las cepas, lo cual complica su eliminación y la purificación aséptica.

Las cepas iniciales en volúmenes de 250 ml o menos se aislaron bajo luz y temperatura controladas, sin aereación; posteriormente se emplearon volúmenes de 250 mL a 4 L con temperatura e irradiancia más elevada y con aporte de aire; este modelo tiene la ventaja de funcionar como un fotobioreactor donde existe una mezcla vertical muy adecuada para la nutrición de las colonias. Por su alta eficiencia de luz, nutrición y fuente de carbono, en este trabajo se optó por emplear pequeños fotobioreactores de menos de 1 L, ya que proporcionan

excelentes condiciones de cultivo para el crecimiento celular (Casadevall et al., 1985; Zhang *et al.* 2011). Este estudio inicial servirá de base para futuros estudios en donde se pretenda realizar cultivos a mayor escala (Fig. 11).

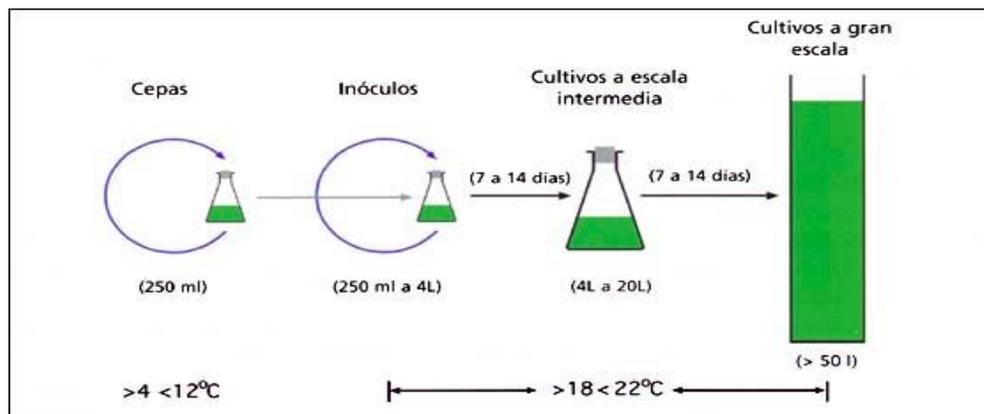


Figura 11. Etapas en la producción de algas (FAO, 2006).

Se programó un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, siguiendo el ciclo de luz de las condiciones naturales del alga y la existencia del ritmo circadiano (Donne et al., 2008). Las células tienen actividad fisiológica en la oscuridad, mantenida por el consumo de moléculas almacenadas, como azúcares y gránulos de lípidos intracelulares (Sakamoto *et al.*, 2012).

En otros trabajos se presentan gráficas de cultivo que van de los 11,13, 19 (Zhang *et al.* 2011), 20 (Sakamoto *et al.*, 2012), 21(Casadevall *et al.*, 1985), y 31 días (Singh y Kumar, 1992). Es probable que las curvas no se presenten más allá de este tiempo debido a la presencia de contaminantes. Las gráficas presentadas a $40 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, nos permiten ver un periodo de latencia de 0 al 7 días y una fase exponencial entre 7 y 12 días, tal como lo reportan en la bibliografía (FAO, 2006), cultivo que crece rápidamente durante un período de 7 a 14 días. No hubo

diferencias significativas entre luz baja y alta en la D.O. lo cual significa que el cultivo tuvo un crecimiento similar. El aumento de colonias siguió su curso, pero no todas del mismo tamaño y la misma cantidad de clorofila, cuestión que repercute en la gráfica de la concentración de clorofila a $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el día 12 cambia la pendiente de la curva lo cual coincide con el trabajo de Sakamoto *et al.* (2012), donde al buscar optimizar las condiciones de luz encuentra que con el incremento en la intensidad de luz disminuye su crecimiento, lo cual hace pensar que el fotosistema se satura a los $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se confirma con la gráfica de la concentración de clorofila (Fig. 8 D) que decrece al día 9, probablemente debido a la aclimatación celular con el fin de evitar daño por exceso de energía luminosa. *B. braunii* se vale de un incremento en la proporción de carotenoides/clorofila, los cultivos se pusieron de color amarillo en esta etapa. La tasa de crecimiento (Fig. 9) en luz baja y alta presenta diferencias significativas. Aunque parece que en luz alta el crecimiento se incrementa paulatinamente, el crecimiento es mayor en luz baja, cuestión que coincide con la gráfica de concentración de clorofila (8 C) y también se observa un decremento y estabilización de la concentración de clorofila con luz alta.

7. CONCLUSIONES

Al determinar las características morfológicas del género *Botryococcus* presente en un lago somero artificial del estado Puebla se concluye que pertenece a la especie *Botryococcus braunii*.

Se conocen las variables ambientales del sitio de colecta por registro en campo.

Fue posible aislar un cultivo unialgal de *Botryococcus braunii* a nivel de cepa.

La cepa mexicana de *B. braunii* tuvo un crecimiento exponencial en todos los tratamientos.

El mejor tratamiento fue con radiación baja ya que se observa un aumento en la tasa de crecimiento y de la concentración de clorofila, aspecto importante en su cultivo a gran escala.

7.1.-Perspectivas

Es necesario realizar el estudio bioquímico de los hidrocarburos de esta cepa mexicana que aunado a la caracterización estructural de *B. braunii* ayudará en la determinación de su raza química. Purificar asépticamente para indagar sobre el tipo y contenido de lípidos e hidrocarburos. Acortar o prolongar fases de crecimiento para controlar la densidad celular. Aplicar la técnica de aireación con aire enriquecido en CO₂. Proponer el cultivo de *B. braunii* en aguas residuales ya que el crecimiento celular es promovido por contenido de algunas sustancias orgánicas por ejemplo recursos orgánicos de carbón tal como glucosa, maltosa, sacarosa lactosa, glicerol y almidón.

8.-Referencias

- American Public Health Association (APHA). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. Clesceri LS, Greenberg AE, & Eaton, AD, (Eds); American Public Health Association(ed). 20th Edition. Washington, USA. 849pp.
- Aguayo, C. M. 2007. *Cómo realizar "paso a paso" un contraste de hipótesis con SPSS para Windows y alternativamente con EPIINFO y EPIDAT: (II) Asociación entre una variable cuantitativa y una categórica (comparación de medias entre dos o más grupos independientes)*. Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla), Servicio de Medicina Interna. DOCUWEB de la Fundación Andaluza Beturia para la investigación en salud. 20 pp.
- Arar, E.J. y G.B. Collins. 1997. *In vitro* determination of chlorophyll *a* and pheophytin *a* in marine and freshwater algae by fluorescence. National Exposure Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio 45268. 445.0:1-22.
- Arredondo-Vega, B.O. y R.Vázquez-Duhalt. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo* 17: 99-111.
- Baeza B.R.S e I.A. Ayala. 2004. Procesos de remoción en masa y riesgos asociados en Zacapoaxtla, Puebla. *Boletín del Instituto de Geografía, UNAM* 53:7-26.
- Casadevall, E., D. Dif, C. Largeau, C. Gudin, D. Chaumont y O. Desantit. 1985. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*.

- Hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate. *Nutrition, Biotechnology and Bioengineering* 27: 286-295.
- Chiang, I.Z., W.Y. Huang y J.T. Wu. 2004. Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 40: 474-480.
- Comas, A. G. 1996. Las Chlorococcales dulciacuícolas de Cuba. *Biblioteca Phycologica*. J. Cramer. Berlin. 99:192pp.
- Donne, R.P., J.T. Wu, S. Baldia, C. Cho, M.A.Cruz, A. Saguiguit y R. Aquino. 2008. Blooms of the colonial green algae, *Botryococcus braunii* Kützing, in Paoay lake, Luzon island, Philippines. *Philippine Journal of Systematic Biology* 11(1): 21-31.
- Dillard, G. E. 1989. Freshwater algae of the Southeastern United States. Part 2, Chlorophyceae. *Bibliotheca Phycologica* 83: 1-63
- Demetrescu, E. 1998. The chlorococcalean alga *Botryococcus* and its significance in hydrocarbon exploration. *GEO-ECO-MARINA* 4:155-160.
- Fanés, I.T. 2009. *Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España, 324 pp.
- FAO. 2006. Tercera parte Funcionamiento del criadero: cultivo de algas In: Helm, M.M., N. Bourne y A. Lovatelli Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Food and Agriculture Organization_of the United Nations Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, pp. 31-43. En español: disponible en línea en: <http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s07.htm> (consultado el 2 de marzo 2014)

- Gómez, L.M.L. 2007. Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. Revista Cubana de Química 19 (2): 3-20.
- Guillard, R.R.L. 2005. Purification methods for microalgae. *In*: Andersen R.A. (ed.). Algal culturing techniques. Elsevier Inc. New York, USA. 117-132.
- Guiry en Guiry M.D. y G.M Guiry. 2014. AlgaeBase. Publicación electrónica de todo el mundo, la Universidad Nacional de Irlanda, Galway. <http://www.algaebase.org>; buscado el 16 de agosto de 2014.
- Halperin, D.R. 1963. Colección de cultivos de cianofíceas. Darwiniana 12 (4): 559-567.
- Hernández-Morales, R., M.R. Ortega-Murillo, R. Alvarado-Villanueva, J.D. Sánchez-Heredia y F. Medrano-Zarco. 2008. Variación anual del fitoplancton en el Lago Cráter La Alberca de Tacámbaro, Michoacán, México. Biológicas 10:5-17.
- Huang, Z., C.D. Poulter, F.R. Wolf, T.C. Somers y J.D. White. 1988. Braunicene, a novel cyclic C₃₂ isoprenoid from *Botryococcus braunii*. Journal of American Chemical Society 110: 3959-3964.
- Ikawa, M. 2004. Algal polyunsaturated fatty acids and effects on plankton ecology and other organisms. UNH Center for Freshwater Biology Research 6 (2): 17-44.
- INEGI. 2005. Anuario Estadístico de Puebla, edición 2005. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. En español: disponible en línea en:

<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/aee05/info/pue/mapas.pdf> (consultado el 26 febrero 2014).

- Jaime-Ceballos, B., R.C. Civera, H. Villarreal, J.L. Galindo y L. Pérez-Jar. 2007. Uso de la harina de *Spirulina platensis* como atrayente en el alimento para el camarón *Litopenaeus schmitti*. *Hidrobiológica* 17 (2): 113-117.
- Jano-Tolano .H.R. y A.R. Andrés-Hernández . 2012. Diversidad de pteridofitas de la localidad la Gloria en Apulco, Puebla, México. *Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*. 09: 1-13
- John, D. M., B.A. Whitton y A.J. Brook. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University. United Kingdom.
- Kawachi, M. y M.H. Noël. 2005. Sterilization and sterile technique. *In: Andersen R.A. (ed.). Algal culturing techniques*. Elsevier Inc. New York, USA. 65-81.
- Komárek, J. y P. Marvan. 1992. Morphological Differences in Natural Populations of the Genus *Botryococcus* (Chlorophyceae). *Archive of Protistenkunde*. 141: 65-100.
- Kumar, H.D. and H.N. Sing. 1979. *A textbook on algae*. The Mac Millan Press LTD. United Kingdom.183-185.
- Largeau, C., E. Casadevall, C. Berkloff and P. Dhamelinourt 1980. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 19: 1043-1051.

- López-Adrián, S. y R. Barrientos-Medina. 2005. Diversidad y distribución del fitoplancton de agua dulce en la Península de Yucatán, México. *Ibugana* 13 (2):3-12.
- Mendoza-González, A.C., L. Huerta-Musquiz y C. Flores-Granados. 1985. Estudio florístico del fitoplancton del lago Zirahuén, Michoacán México. *Phytologia* 59 (1):1-7.
- Metzger, P. y C. Largeau 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. Mini-Review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 486-496.
- Ortega, M.M. 1984. Catálogo de algas continentales recientes de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México. 561 pp.
- Ortega, M.M., J.L. Godínez, G. Garduño y Ma. G. Oliva. 1995. Ficología de México, Algas continentales. AGT Editor. S.A.
- Órpez, R., M. Martínez, G. Hodaifac, Y.F. El, N. Jbarib y S. Sánchez. 2009. Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Desalination* 246: 625–630.
- Parra, O., Gonzales M. y Dellarossa V. 1983. Manual Taxonómico del Fitoplancton de aguas continentales. Editado por Universidad de Concepción. Chile.
- Pérez, C.D. 1995. *Cultivo Experimental de las Diatomeas Thalassiosira subtilis, Skeletonema costatum y Chaetoceros affinis en condiciones de laboratorio*

- para fines de acuacultura*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas- Universidad de Colima. 65 pp.
- Preising, H.R. y R.A. Andersen. 2005. Historical review of algal culturing techniques. *In*: Andersen R.A. (ed.). Algal culturing techniques. Elsevier Inc. New York, USA. 1-12.
- Prescott, G. W. 1982. Algae of the western great lakes area. Otto Koeltz Science Publishers. Alemania.
- Ramírez, R.J.J. 2005. Respuesta de la comunidad fitoplanctónica de una laguna ecuatorial hipereutrónica a la introducción de un nuevo ecodemo. *Limnetica*, 24(3-4): 295-304.
- Ramírez, J.J. y M. Corbacho. 2004. Population dynamics of *Botryococcus braunii* Kützing 1849 in a shallow tropical eutrophic lake. *Algological Studies* 15 (1): 129-143.
- Ramírez, L. y R. Olvera. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.) *Interciencia* 31 (9): 657-663.
- Rao, A.R., C. Dayananda, R. Sarada, T.R. Shamala y G.A. Ravishankar. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology* 98: 560–564.
- Rao, A.R., S. Ravi y A.R. Gokare. 2010. Enhancement of carotenoids in green Alga-*Botryococcus braunii* in various autotrophic media under stress conditions. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 4(2): 87-92.

- Rodríguez, A.C. y G.E. Ottone. 2003. La aplicación de *Botryococcus* (Chlorococcales) como indicador paleoambiental en el Triásico de Argentina. *Revista Española de Micropaleontología* 35(2): 161-169.
- Sánchez-Rodríguez, M. y G. Vázquez. 1990. Estudio bioecológico de la laguna de Atezca, Hidalgo, México. II. Análisis de la comunidad fitoplanctónica. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 33: 9-19.
- Salazar, G.M. 2006. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos* 59: 64-70.
- Sakamoto, K., M. Baba, I. Suzuki, M. Watanabe y Y. Shiraiwa. 2012. Optimization of light for growth, photosynthesis, and hydrocarbon production by the colonial microalga *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology* 110: 474-479.
- Semarnat. 2005. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. En español: disponible en línea en: http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_04/ (consultado el 2 de marzo, 2014). 380 p.
- Singh, Y. y H.D. Kumar. 1992. Lipid and hydrocarbon production by *Botryococcus* spp. under nitrogen limitation and anaerobiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8:121-124.
- Sosa, L.A.E. 2009. *Cultivo de la microalga Haematococcus pluvialis, en lote y fotobiorreactor para la producción de carotenoides*. Tesis Especialidad en

- Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. 40 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed volume and optical density. En Stein, J.R. (ed.).
Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and growth Measurement. Cambridge University. Cambridge. 448 pp.
- SPSS Inc. Released 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.
- Vázquez, G., S. Jiménez, M.E. Favila y A. Martínez. 2005. Seasonal dynamics of the phytoplankton community and cyanobacterial dominance in a eutrophic crater lake in Los Tuxtlas, Mexico. *Ecoscience* 12(4): 485-493.
- Villa-Bonilla B, O.R. Rojas-Soto, A.G. Colodner-Chamudis y C. Tejeda-Cruz. 2008. Inventarios municipales de avifauna y su aplicación a la conservación: el caso de Zacapoaxtla, Puebla, México. *Ornitología Neotropical*. 19: 531–551, 2008.
- Weiss, T.L., J.S. Johnson, K. Fujisawa, K. Sumimoto, S. Okada , J. Chappell y T.P. Devarenne. 2010. Phylogenetic placement, genome size, and GC content of the liquid-hydrocarbon-producing green microalga *Botryococcus braunii* strain Berkely (Showa) (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 46(3): 534-540.
- Weiss, T.L., R. Roth , C. Goodson , S. Vitha , I. Black , P. Azadi , J. Rusch , A. Holzenburg , T.P. Devarenne y U. Goodenough . 2012. Colony organization

- in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix. *Eukaryot Cell*. 11(12):1424-40.
- Wu, J.T., Y.R. Chiang, W.Y. Huang y W.N. Jane. 2006. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquatic Toxicology* 80: 338–345.
- Zalocar D. Y., V. M. Asselborn y S. L. Casco. Variaciones espaciales y temporales del fitoplancton en un lago subtropical de Argentina.1998. *Revista Brasileira de Biologia*. 58(3): 359-382.
- Zhang, H., W. Wang, Y. Li, W. Yang y G. Shen. 2011. Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. *Biomass and bioenergy* 35:1710-1715.