



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MONOCULTIVOS
DE FITOPLANCTON EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO
DE EMISIONES GASEOSAS DE CO₂**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

ILSE HUITRÓN RODRÍGUEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARMANDO GONZALEZ SÁNCHEZ**

**ASESOR INTERNO:
DR. JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO
CDMX, Marzo 2019**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTE TRABAJO DE TESIS SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL DEL INSTITUTO DE INGENIERÍA DE LA UNAM QUE CUENTA CON CERTIFICADO DE CONFORMIDAD OTORGADO POR EL ORGANISMO ACREDITADO CERTIFICACIÓN MEXICANA, S.C., POR HABER IMPLEMENTADO Y MANTENER UN SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE CONFORMIDAD CON LOS REQUISITOS DE LA NORMA INTERNACIONAL ISO 9001:2015 NO. DE CERTIFICADO CMX C SGC 155 2017, VÁLIDO EN EL PERÍODO DEL 09 DE NOVIEMBRE DE 2017 AL 09 DE NOVIEMBRE DE 2020

“Solo podemos ver poco del futuro. Pero lo suficiente para darnos cuenta de que hay mucho por hacer.”

-Alan Turing

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

-Marie Curie

Dedicatoria

A ti mamá por ser el motor de vida, por enseñarme que no hay razones suficientemente buenas para caerse y no levantarse. Por brindarme siempre tu apoyo en cada una de mis decisiones, por creer en mí, por escucharme siempre. Por la educación que me has impartido todos estos años para formar la persona que soy, porque hay valores que no se enseñan en un salón de clases. Porque gracias a ti, sé que los sueños se pueden cumplir. Porque sin ti, yo no estaría aquí. Te amo.

A ti papá por apoyar siempre mi formación académica, por recorrer cientos de kilómetros todos estos últimos años para recogerme de la escuela. Por tu comprensión y mi formación como persona, gracias por todo.

A ti Víctor, por tu apoyo en mis decisiones, por tu paciencia al enseñarme siempre como resolver problemas matemáticos. **A ti Dani**, por siempre hacerme reír, porque somos cómplices en algunas aventuras. A mis hermanos, por su apoyo, porque sin ustedes la vida no sería la misma.

A ti Abue, por ayudarme en todo, por ser mi segunda mamá, por preocuparte siempre si me encuentro bien. Por escucharme y sobre todo por cuidarme.

A ti Otho, por darme tu amor y apoyo incondicional. Por tomar mi mano y recorrer juntos este camino lleno de experiencias y proyectos. Por siempre recordarme la persona que soy, de lo que soy capaz y estoy hecha. Estoy segura de que también tu cumplirás todas las metas que te propongas. Te quiero.

Agradecimientos

A mi alma mater la **Universidad Nacional Autónoma de México** por abrirme sus puertas, brindarme tantas oportunidades de aprender y formarme profesionalmente.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** por encaminarme al éxito.

Al **Instituto de Ingeniería** por dejarme ser parte y por la experiencia adquirida.

Al proyecto CEMIEBIO 247006 del fondo SENER-CONACyT por su apoyo financiero.

Al proyecto PAPIIT IT-100317 por su financiamiento parcial.

Al **Instituto de Ciencias del Mar y Limnología** y en especial a la **M. en C. Laura Elena Gómez Lizárraga** por el apoyo en la toma de fotografías en microscopía electrónica de barrido.

Al **Dr. Armando González Sánchez** por aceptarme a formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y asesoría en la elaboración de esta tesis.

A mi co-asesora la **M. en C. Claudia Granada Moreno** por transmitirme todos sus conocimientos, por su apoyo en la realización de este trabajo y por introducirme al interesante mundo de la biología molecular. Mi admiración y respeto siempre. Muchas gracias.

A mi asesor interno el **Dr. Jorge Antonio Valdivia Anistro** por su tiempo en leer el escrito, su sinceridad al darme sus observaciones para enriquecer este trabajo.

A mis sinodales la **Dra. Alejandrina Graciela Ávila Ortiz**, el **Dr. Antonio Valencia Hernández** y a la **Biól. Angélica Elaine González Schaff** por sus comentarios y observaciones en el presente trabajo.

Al **Dr. David Uriel Hernández Becerril** por ayudarme con la identificación de las especies, apoyarme y motivarme a cumplir mis sueños.

A todos los docentes que creyeron en mí y me brindaron sus conocimientos a lo largo de mi vida académica.

A Natalia, Mariana, Bety, Darynka y Janeth por su amistad, por escucharme siempre, por su aportación de ideas, su apoyo y comprensión, por todas esas risas, viajes y fiestas. Se que son lo suficientemente capaces para seguir cumpliendo sus metas y sueños Las quiero.

A Arnold por tu amistad, apoyo y asesoría para trabajar dentro y fuera del laboratorio. A los chicos del cubículo 314, **Claudia, Mariana, Abdiel, Magdalena, Tania**, por compartir sus risas, experiencias y enseñanzas.

¡Muchas gracias!

Contenido

1	RESUMEN	12
2	INTRODUCCIÓN	13
3	ANTECEDENTES	15
3.1	Fotosíntesis.....	17
3.1.1	Fijación biológica del CO ₂	18
3.1.2	Problemática ambiental del CO ₂	20
3.2	Fitoplancton	21
3.2.1	<i>Cyanophyta</i>	22
3.2.2	<i>Chlorophyta</i>	25
3.2.3	<i>Bacilliarophyta</i>	27
3.3	Identificación de fitoplancton	30
3.3.1	Microscopía	30
3.3.2	Técnicas moleculares.....	31
3.4	Cinéticas de crecimiento	34
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
5	HIPÓTESIS	37
6	OBJETIVOS	38
6.1	Objetivo general	38
6.2	Objetivos particulares.....	38
7	MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1	Origen de las muestras.....	39
7.2	Medios de cultivo.....	39
7.2.1	Medio de cultivo para diatomeas marinas.....	41
7.2.2	Medio marino sólido	41
7.3	Obtención de monocultivos.....	41
7.4	Identificación de fitoplancton	42
7.4.1	Microscopía óptica y electrónica	43

7.4.2	Identificación molecular	43
7.5	Cinética de crecimiento	48
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
8.1	Obtención de monocultivos a partir de consorcios de fitoplancton.....	50
8.2	Identificación de los monocultivos por microscopía óptica y electrónica..	52
8.2.1	Descripción de <i>Pseudanabaena sp.</i>	52
8.2.2	Descripción de <i>Chlorella sp.</i>	53
8.2.3	Descripción de <i>Navicula sp.</i>	55
8.3	Identificación genética de los monocultivos	57
8.4	Amplificación de la región V3-V5 del gen ARNr 16S por PCR	58
8.5	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante	58
8.7	Cinética de crecimiento	61
8.7.1	Cinética de crecimiento de <i>Pseudanabaena sp.</i>	61
8.7.2	Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i>	63
8.7.3	Cinética de crecimiento de <i>Navicula sp.</i>	66
8.7.4	Productividad.....	68
9	CONCLUSIONES	69
10	PERSPECTIVAS	70
11	REFERENCIAS	71
	ANEXOS.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Experimentos cinéticos.....	36
Tabla 2. Reactivos utilizados para la preparación del agua marina sintética (AMS).	40
Tabla 3. Soluciones nutritivas.....	40
Tabla 4. Concentraciones de nutrientes colocadas en la solución salina	41
Tabla 5. Mezcla total de carga para electroforesis.....	44
Tabla 6. Reactivos y cantidades empleados para una reacción de PCR.	45
Tabla 7. Ciclos de temperatura para la amplificación por PCR de la región del gen de ARNr 16S.	46
Tabla 8. Reactivos empleados para soluciones desnaturalizantes.....	47
Tabla 9. Cuantificación de ADN de monocultivos.....	57
Tabla 10. Cuantificación de ADN en las bandas seleccionadas a partir del PCR- DGGE.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ecuación estequiométrica general de la fotosíntesis.....	17
Figura 2. Ciclo de Calvin-Benson. Tomado de Curtis et al., 2008.	19
Figura 3. Diversidad de microorganismos pertenecientes al fitoplancton. a) <i>Aulacoseira granulata</i> , b) <i>Cyclotella alchichicana</i> , c) <i>Closterium acutum</i> , d) <i>Eudorina elegans</i> , e) <i>Phacus longicauda</i> y g) <i>Monactinus simplex</i> . Tomado de Oliva-Martínez y Godínez-Ortega, 2014.....	21
Figura 4. Variedades morfológicas en cianobacterias. A) <i>Oscillatoria sp.</i> , B) <i>Nostoc sp.</i> , C) <i>Synechococcus sp.</i> , D) <i>Gloethece sp.</i> y E) <i>Microcystis sp.</i>	23
Figura 5. Variedades morfológicas en clorofitas. A) <i>Pediastrum sp.</i> , B) <i>Scenedesmus sp.</i> , C) <i>Volvox sp.</i> , D) <i>Micrastenas sp.</i> , E) <i>Chlorella sp.</i> y F) <i>Chlamydomonas sp.</i>	26
Figura 6. Variedades morfológicas en diatomeas. A) <i>Cymbella sp.</i> , B) <i>Skeletonema sp.</i> , C) <i>Cyclotella sp.</i> , D) <i>Licmophora sp.</i> , E) <i>Pinnularia sp.</i> y F) <i>Pseudo-nitzschia sp.</i>	28
Figura 7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
Figura 8. Diseño de fotobiorreactor tubular cerrado.....	48
Figura 9. Obtención de monocultivos desde colonias aisladas en placa de agar, hasta su escalamiento a un volumen de 1000 mL. A) cianobacteria, B) clorofita y C) diatomea.....	51
Figura 10. Micrografías de <i>Pseudanabanea sp.</i> A) 40X y B) 100X	52
Figura 11. Micrografías de <i>Chlorella sp.</i> A) 40X y B) 100X.....	54
Figura 12. Micrografías de <i>Navicula sp.</i> A) 40x y B) 100X.....	55
Figura 13. Micrografías de <i>Navicula sp.</i> en microscopio electrónico de barrido. A) Cultivo de diatomeas, B) longitud del rafe, C) Terminación del rafe y poros de la frústula y D) Frústulas de <i>Navicula sp.</i>	56
Figura 14. Productos de la amplificación por PCR de la región V3-V5 del gen ARNr 16S con un peso molecular de 566pb. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (M), carril 2: control positivo (C+), carril 3: Clorofita (Cl), carril 4: Cianobacteria (Ci), carril 5: Diatomea (Di) y carril 6: Control negativo (C-)	58

Figura 15. DGGE de grupos monoalgales. Las bandas encerradas en color rojo fueron las seleccionadas y cortadas para re-amplificarse nuevamente por PCR.....	59
Figura 16. Productos de PCR del fragmento del gen ARNr 16S purificados. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (M), B1: banda 1, B2: banda 2 y B3: banda 3.....	60
Figura 17. Cinética de crecimiento en botellas del cultivo de <i>Pseudanabaena sp.</i>	62
Figura 18. Cultivo de <i>Pseudanabaena sp.</i> en fotobiorreactor tubular.....	62
Figura 19. Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> A) Cultivo en botellas, B) Cultivo en fotobiorreactor tubular	64
Figura 20. Velocidad de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> en botellas de borosilicato	65
Figura 21. Velocidad de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> en fotobiorreactor tubular	65
Figura 22. Cinética de crecimiento de <i>Navicula sp.</i> en botellas de borosilicato	66
Figura 23. Velocidad de crecimiento de <i>Navicula sp.</i> en botellas.....	67
Figura 24. Cultivo de <i>Navicula sp.</i> en fotobiorreactor	67
Figura 25. Productividad medida en los tres cultivos obtenidos crecidos en botellas de borosilicato y en fotobiorreactor tubular	68

1 RESUMEN

El fitoplancton marino es una comunidad de microorganismos fotosintéticos muy diversos en cuanto a formas, tamaños y ciclos de vida. *Cianophyta* (cianobacterias), *Chlorophyta* (clorofitas) y *Bacillariophyta* (diatomeas), son grupos pertenecientes al fitoplancton, los cuales se pueden encontrar en diversos hábitats, desde suelos, hasta aguas dulces y marinas. Realizar la caracterización taxonómica, bioquímica, fisiológica o cinética del fitoplancton, es muy importante, debido a que muchas especies son usadas como bioindicadores, explotadas en empresas farmacéuticas o industriales y para el tratamiento de aguas residuales y de emisiones gaseosas.

En este trabajo se lograron aislar dos cultivos monoalgales pertenecientes a los grupos *Chlorophyta* y *Bacillariophyta* a partir de un consorcio de fitoplancton marino, y un tercer cultivo monoalgal perteneciente al grupo *Cianophyta* a partir de un consorcio alcalófilo. El consorcio de fitoplancton marino proviene de las costas del océano pacífico en el estado de Colima, México, y el consorcio alcalófilo pertenece al exLago de Texcoco. Ambos consorcios fueron crecidos y adaptados a condiciones de laboratorio, y anteriormente utilizados en el tratamiento de emisiones gaseosas. Para el aislamiento se utilizó la técnica de diluciones seriadas y siembra en cajas de Petri. Los tres cultivos lograron identificarse con ayuda de claves taxonómicas. El cultivo de cianobacterias se identificó como *Pseudanabaena sp.*, el de clorofitas como *Chlorella sp.* y el de diatomeas como *Navicula sp.*

Los tres cultivos fueron alimentados con CO₂ y evaluados cinéticamente, el primer experimento se llevó a cabo en botellas de vidrio y el segundo en un fotobiorreactor tubular cerrado. El cultivo de *Chlorella sp.* inoculado en el fotobiorreactor resultó ser el más productivo con un valor de 0.288 g/L d y una concentración final de biomasa de 4.1 g/L, además de una velocidad de crecimiento alta, en comparación con el resto de los cultivos. Los resultados obtenidos nos indican cual cultivo es el óptimo para su uso en fotobiorreactores y la asimilación de emisiones de CO₂.

2 INTRODUCCIÓN

El aire está compuesto principalmente por nitrógeno (N_2) en un 78% vol, oxígeno (O_2) en un 21% vol, argón (Ar) en un 0.9% vol y el resto lo conforman cientos de gases de abundancia menor, entre los cuales destaca el dióxido de carbono (CO_2) en un 0.03% vol. Ésta composición puede variar por efecto de las emisiones gaseosas contaminantes. Las principales fuentes de emisiones gaseosas antropogénicas que promueven la contaminación atmosférica son de naturaleza estacionaria y móvil. Las fuentes de contaminación estacionarias son producto de la actividad industrial, por ejemplo: las plantas metalúrgicas, las refinerías de petróleo y las fábricas de productos químicos. Las fuentes de contaminación móvil incluyen a vehículos de carretera (coches y camiones), y otros medios de transporte, como ferrocarriles, aviones, lanchas y barcos (Masters y Wendell, 2008).

La Ciudad de México es una de las urbes más grandes y contaminadas por emisiones antropogénicas de origen estacionario y móvil a nivel mundial. Estas emisiones contienen compuestos inorgánicos como monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO_2), óxidos de nitrógeno (NO_x) y óxidos de azufre (SO_x) y material particulado. Además, la atmósfera recibe diversos compuestos orgánicos volátiles que al concentrarse reaccionan entre sí con ayuda de la luz solar, formando una niebla tóxica conocida como *smog* o neblumo (Manahan, 2006).

Debido a la demanda energética y la contaminación atmosférica, en varios países se han desarrollado diferentes tecnologías para la obtención de energías alternativas y renovables. Estas tecnologías se enfocan en disminuir los efectos producidos por los gases de efecto invernadero. Los biocombustibles son una de estas energías, que son obtenidos a partir de compuestos orgánicos (Salinas y Gasca, 2009). Entre los biocombustibles emergentes, se encuentra el biogás, que se obtiene a partir de procesos de digestión anaerobia de materia orgánica residual (Nachwachsente, 2010; Scarlat et al., 2018).

El biogás está compuesto por metano (CH_4) en un 50 a 70% vol, dióxido de carbono (CO_2) en un 30 a 50% vol, ácido sulfhídrico (H_2S) en un 0.005 a 2% vol y de otros gases traza (Maile et al., 2017). Todos estos compuestos son considerados como contaminantes atmosféricos. El biogás tiene amplias aplicaciones, destacan su uso como sustituto al gas natural para su consumo en el hogar y en el sistema de transporte. Para su uso eficiente es necesario que el biogás, cuente con la purificación adecuada para eliminar los compuestos contaminantes que contiene (Scarlat et al., 2018), la cual, dependiendo del uso energético que se le dé al biogás, se definirá la técnica de purificación (Arrellano et al., 2017).

En los procesos biológicos se utilizan microorganismos fotosintéticos como herramientas biotecnológicas para la captación de CO_2 (Angelidaki et al. 2018). Los microorganismos que se emplean para este tipo de tratamientos son algas microscópicas formando consorcios. Un consorcio de microalgas se define según Ochoa y Montoya (2010), como una asociación natural de dos o más poblaciones de diferentes especies de microalgas que trabajan en conjunto viéndose beneficiados mutuamente. El uso de estas algas se debe a su capacidad para fijar CO_2 , por su capacidad adaptativa, por su manipulación sencilla y además por su rápido crecimiento en comparación con otros organismos fotosintéticos.

Actualmente la situación energética ha dado un nuevo impulso a estas iniciativas buscando reducir la dependencia del petróleo y la emisión de gases de efecto invernadero.

3 ANTECEDENTES

El fitoplancton tiene un potencial biotecnológico alto por la producción de sustancias de interés farmacéutico, pigmentos fotosintéticos, producción de proteína alimentaria, de biocombustibles, así como para el tratamiento de aguas residuales y mitigación de emisiones de CO₂ (Ruiz-Martínez et al., 2012; Collins et al., 2014; D' Alessandro y Antoniosi-Filho, 2016; Liu et al., 2017; Sathasivam et al., 2017; Shumbulo-Shuba y Kifle, 2018). Su aplicación biotecnológica se debe a que el cultivo de fitoplancton es reportado de manejo fácil, de crecimiento rápido y con una tasa alta de fijación de CO₂.

El fitoplancton es un grupo muy diverso filogenéticamente, algunos de los grupos de algas que lo componen son: dinoflagelados, diatomeas, clorofitas, cianobacterias, entre otros, y su composición varía de acuerdo con el ecosistema que habitan. En el mar, éste se compone mayormente por dinoflagelados y diatomeas (Simon et al. 2008). En aguas dulces, abundan las clorofitas y diatomeas, y en lagos alcalino-sódicos (lagos salobres) también habitan cianobacterias en abundancia (Grant, 2006).

A nivel biotecnológico, los grupos de fitoplancton más cultivado son clorofitas y cianobacterias de agua dulce, principalmente (Sung et al., 1998; Liu et al., 2017, Pereira et al., 2018; Troschl et al., 2018). Por otro lado, el cultivo de fitoplancton marino o de lagos alcalino-sódicos, no es tan frecuente, pero también puede ser empleado a nivel biotecnológico. Los cultivos de fitoplancton marino y alcalófilo, son de gran interés debido a que la solubilidad de los gases aumenta con el pH. En el mar se tiene un pH de 7.5 a 8.4 y en lagos alcalino-sódicos el pH va de 8 a 10.5 (Sorokin & Kuenen, 2005). Se han hecho estudios sobre cianobacterias marinas en fotobiorreactores tubulares (Henrard et al., 2011) y para clorofitas y diatomeas marinas en fotobiorreactores en columna (Yanfei et al., 2016; Ozkan and Rorrer, 2017).

Desde hace varias décadas hasta la actualidad, existen distintos estudios sobre la biodiversidad de fitoplancton en el Pacífico mexicano, en las costas de Jalisco, Nayarit, Michoacán y Guerrero, siendo los dinoflagelados y diatomeas los más abundantes (Santoyo, 1974; Bravo-Sierra, 1999; Hernández-Becerril y Salazar-Paredes 2012; Meave-Del Catillo et al., 2012; Hernández-Becerril, 2014), así como para el Golfo de California (Gárate-Lizárraga et al., 2009). Así también se han llevado a cabo investigaciones relacionadas con biomasa y toxicidad (Gómez-Aguirre et al., 2004; Sosa-Avalos et al., 2013).

Para el estado de Colima, Esqueda-Lara (2003) es el único trabajo que ha reportado la presencia de cianobacterias en las zonas de Bahía Santiago y Bahía Manzanillo.

Por otro lado, en estudios de lagos alcalino-sódicos han logrado cultivar cianobacterias y clorofitas con potencial uso biotecnológico (Granada-Moreno et al., 2017; Zamora-Barríos et al., 2017), siendo más frecuente el cultivo de la cianobacteria *Spirulina sp.* (Coca et al., 2015; Ainas et al., 2017; Mosquera et al., 2018).

Debido a lo anterior, surge la necesidad de obtener cultivos de fitoplancton a partir de muestreo en ecosistemas acuáticos nacionales. Estos cultivos pueden ser susceptibles a ser empleados en el tratamiento de emisiones gaseosas con altas concentraciones de CO₂. La identificación y la caracterización de su cinética de crecimiento, así como su capacidad de fijación de CO₂, permitiría delinear su potencialidad para ser aplicados en la mitigación de emisiones de CO₂.

En el grupo de investigación liderado por el Dr. Armando Gonzáles Sánchez, en el Instituto de Ingeniería de la UNAM, se tienen antecedentes exitosos de cultivos de fitoplancton alcalino-sódico, en fotobiorreactores abiertos (Franco-Morgado, 2017; Franco-Morgado, 2018) y cerrados (De los Cobos-Vasconcelos et al., 2016; Anbalagan et al., 2017). Sin embargo, todos estos trabajos se han realizado en forma

de consorcios, de los cuales se tienen identificados a tres grupos de algas que lo componen (Granada et al., 2017). Por todo lo anterior, el aporte de esta tesis es significativo, ya que explora las capacidades cinéticas de monocultivos.

3.1 Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso metabólico en el cual la energía de la luz solar es captada y utilizada para transformar moléculas inorgánicas de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O), a moléculas orgánicas como la glucosa, liberando oxígeno gaseoso (O_2) como subproducto de este proceso químico (Figura 1; Falkowski and Knoll, 2007).

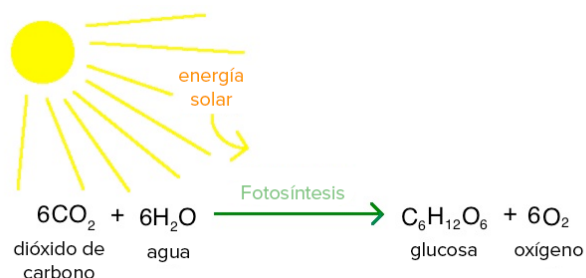


Figura 1. Ecuación estequiométrica general de la fotosíntesis

Este proceso metabólico es realizado por diversos organismos, como *eucariontes fotosintéticos* (plantas y algas), los cuales, realizan la fotosíntesis en organelos especializados conocidos como *cloroplastos*. Dentro de los cloroplastos se encuentra un sistema de “sacos” en forma de discos interconectados, llamados *tilacoides*. Los procariontes son organismos que también puede realizar fotosíntesis, los cuales carecen de cloroplastos, sin embargo, poseen tilacoides en el citoplasma o están unidos a la membrana celular, como es el caso de las *cianobacterias* (Curtis et al., 2008).

La fotosíntesis es un proceso de múltiples reacciones bioquímicas que se dividen en dos etapas, en la primera etapa, llamada de *reacciones luminosas* o *dependientes de luz*, la energía de la luz solar es absorbida y promueve la síntesis de

adenosin trifosfato (ATP) y de la coenzima *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato* (NADPH). El ATP y el NADPH promueven la síntesis de carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O , ésta segunda etapa conocida como de *reacciones oscuras* o *reacciones independientes de luz*. Cada etapa de reacciones se lleva a cabo en lugares distintos (Audesirk et al. 2003).

Para que la energía de la luz sea transformada, se necesitan un tipo de moléculas que capten la energía, esta función la realizan los pigmentos fotosintéticos como las *clorofilas* (Manrique, 2003). Las clorofilas son clasificadas en diferentes tipos: *a*, *b*, *c* y *d*. La diferencia entre estos tipos de clorofitas es su ubicación dentro del cloroplasto, y la longitud de onda en la que absorben la energía de la luz (parte azul y roja del espectro electromagnético) (Beer et al., 2014). Además de las clorofilas también existen otros pigmentos accesorios, los *carotenoides*, y las *ficobiliproteínas* que contienen las cianobacterias. La función de los pigmentos accesorios, además de absorber luz y transferir la energía a los centros de reacción, es brindarle protección contra daño oxidativo al aparato fotosintético, al disipar el exceso de luz absorbida por los pigmentos principales (Solarte et al. 2010).

3.1.1 Fijación biológica del CO_2

Durante la fotosíntesis el CO_2 que proviene de la atmósfera es fijado para ser convertido en carbohidratos dentro del cloroplasto (*reacciones oscuras* o *independientes de luz*). Esta serie de reacciones forman el denominado *ciclo de Calvin-Benson* (Márquez et al., 2013), el cual se divide en tres etapas: *a) Carboxilación o fijación de CO_2* , *b) Reducción* y *c) Fase de recuperación*. El ciclo comienza cuando el CO_2 se une a una pentosa llamada *ribulosa 1,5-bifosfato* (RuBP) y se forman dos moléculas de *3-fosfoglicerato* (3-PGA). Durante esta reacción interviene una enzima catalizadora denominada *ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa* (RuBisCO), la cual es la enzima más abundante de la Tierra (Jiménez y Merchant, 2003).

En la etapa de reducción comienzan a sintetizarse triosas fosfato a partir de 3-PGA. Para que esta reacción ocurra se necesita de ATP y NADPH obtenidos a partir de la primera etapa de la fotosíntesis (*reacciones luminosas*). La enzima *3-fosfoglicerato quinasa* utiliza el ATP y forma *1,3-bifosfoglicerato*, a este compuesto lo reduce el NADPH y se forma *gliceraldehído 3-fosfato* (PGAL) y *dihidroxiacetona 3-P*. Una vez que el carbono ha sido convertido en triosas fosfato, es almacenado en forma de gránulos dentro del cloroplasto o utilizado para sintetizar sacarosa (Nelson y Cox, 2009).

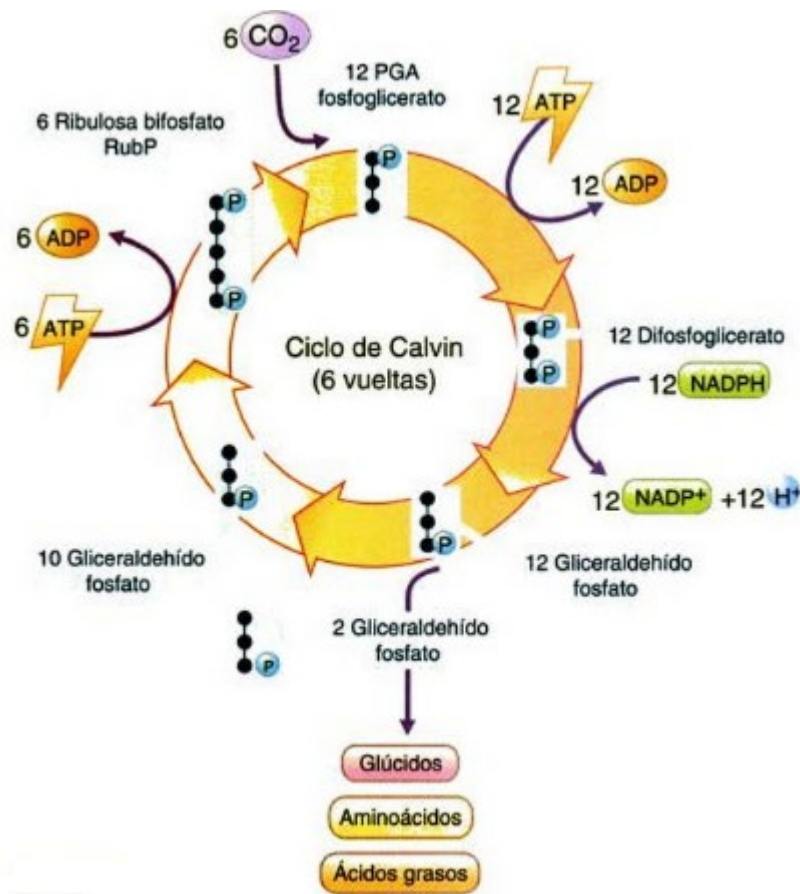


Figura 2. Ciclo de Calvin-Benson. Tomado de Curtis et al., 2008.

En la última etapa se lleva a cabo la regeneración de RuBP, para obtener dos moléculas de 3-PGA y la fijación de dos moléculas de CO₂, que reaccionan con RuBP, que se utiliza para la síntesis de carbohidratos. Las moléculas de 3-PGA se reducen

por NADPH y genera una molécula de RuBP. Tres vueltas a este ciclo fijan tres moléculas de CO₂, lo que es equivalente a un azúcar de tres carbonos y se produce una molécula de PGAL. Se necesitan 6 vueltas de este ciclo para generar un azúcar de seis carbonos como la glucosa (Beer et al., 2014) (**Fig.2**).

3.1.2 Problemática ambiental del CO₂

El CO₂ es un gas que se genera por la oxidación completa de material orgánico, principalmente. Esta oxidación puede ser realizada por el metabolismo aerobio de cualquier ser vivo o por la combustión de materia orgánica. A pesar de que en la atmósfera se encuentra en menos del 0.03%, la contaminación antropogénica puede incrementar su concentración en un 25%. Este porcentaje es alarmante ya que el CO₂ produce un aumento en la temperatura de la Tierra (*efecto invernadero*). Además de efectos diversos en la salud humana por sobreexposición en ambientes cerrados de trabajo, generando dolores de cabeza, desmayos y asfixia.

Existen diversas tecnologías empleadas en la mitigación del CO₂ divididas en tecnologías físico-químicas y biológicas. Las tecnologías biológicas o *biotecnologías* son más económicas en su operación, no producen contaminación secundaria y son ambientalmente amigables en comparación con las tecnologías físico-químicas. Los *fotobioreactores* son contenedores donde se intensifica el proceso de fotosíntesis, los cuales son los más empleados en la mitigación de emisiones de CO₂. Estos suelen ser de diferentes configuraciones y emplean microorganismos fotosintéticos, que en términos coloquiales suelen llamarse “microalgas”, pero éste término se refiere a lo que biológicamente se denomina Fitoplancton (Arrieta-Bolaños, 2008; Borowitzka, 2018).

3.2 Fitoplancton

El término *Fitoplancton* proviene del griego $\phi\upsilon\tau\omicron\nu$ (*phyton*) que significa planta, y $\pi\lambda\alpha\upsilon\kappa\tau\omicron\varsigma$ (*planktos*) que significa errante (Oliva-Martínez et al. 2014), el cual está representado por una gran diversidad de especies algales, protistas y bacterias, con diversas formas y tamaños, así como estrategias reproductivas y fisiológicas (Raymont, 1980).

De acuerdo con Not et al. (2012) el fitoplancton se divide en cuatro grupos de acuerdo con su tamaño: *picoplancton* (0.2-2 μm), *nanoplancton* (2-20 μm), *microplancton* (20-200 μm) y *mesoplancton* (200-2000 μm). Estos grupos pueden encontrarse en forma solitaria, y en ocasiones formando colonias o cadenas.

Dentro del fitoplancton podemos encontrar organismos procariontes (*Cyanophyta*) como organismos eucariontes (*Bacilliarophyta*, *Dinophyta* y *Chlorophyta*) (Fig. 3). Se estima que las diatomeas, los dinoflagelados, las haptofitas y las algas verdes son los grupos eucariotas con mayor diversidad dentro del fitoplancton, representando el 40, 40, 10 y 6% respectivamente (Simon et al. 2008).

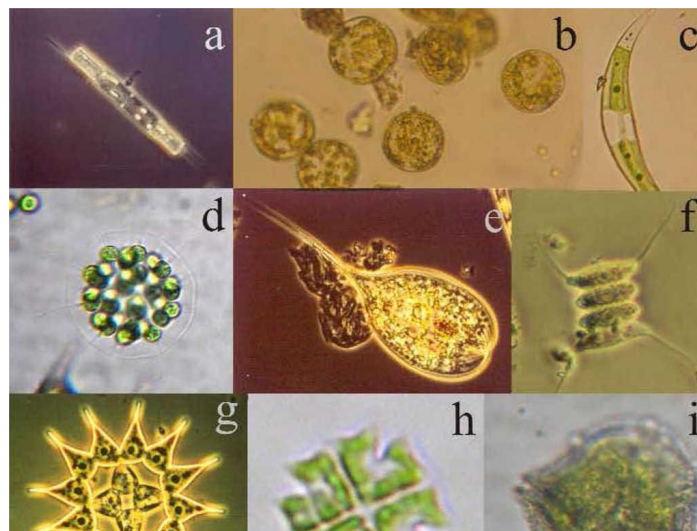


Figura 3. Diversidad de microorganismos pertenecientes al fitoplancton. a) *Aulacoseira granulata*, b) *Cyclotella alchichicana*, c) *Closterium acutum*, d) *Eudorina elegans*, e) *Phacus longicauda* y g) *Monactinus simplex*. Tomado de Oliva-Martínez y Godínez-Ortega, 2014.

El fitoplancton es de gran importancia ya que las especies que lo integran son consideradas los principales productores primarios dentro de las cadenas tróficas, ya que son los responsables del 45% de la producción primaria neta (Simon et al., 2008). Además de realizar fotosíntesis y fijar CO₂, el fitoplancton posee una gran diversidad de capacidades metabólicas, las cuales influyen en los ciclos biogeoquímicos globales (Rynearson y Palenik, 2011).

En los últimos 10 años se ha analizado la diversidad de grupos taxonómicos del fitoplancton o el de sus grupos taxonómicos, a través de técnicas de microscopía óptica y electrónica, análisis de composición de pigmentos y técnicas de biología molecular (Not et al. 2012; López-Magaña et al., 2016). Esto resulta ser importante ya que muchas de estas especies participan en temas que son importantes para el ser humano, como la calidad del agua, el cambio climático, así como los florecimientos algales de especies productoras de toxinas (Hernández-Becerril, 2014).

3.2.1 *Cyanophyta*

El grupo *Cyanophyta* o comúnmente conocido como el grupo de *cianobacterias* o *algas verde-azules*, son microorganismos procariotas fotosintéticos que carecen de organelos como mitocondrias, núcleo, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y cloroplastos (Van den Hoek et al., 1995). Su pared celular está hecha de peptidoglucano, típica de bacterias Gram-negativas. Las cianobacterias fueron los primeros seres *fotoautótrofos*, los cuáles contribuyeron con la formación de la atmósfera oxigénica que actualmente conocemos (Madigan et al., 2004).

La fotosíntesis que realizan las cianobacterias es la misma que algunos organismos eucariontes, pues contienen *lamelas fotosintetizadoras* o *tilacoides*. Actualmente, gracias a las técnicas moleculares, se sabe que los cloroplastos de los eucariontes fotosintéticos derivan de una cianobacteria endosimbionte primitiva

(Govannoni et al. 1988; Simon et al., 2008), lo que confirma su larga historia evolutiva, desde hace 3 500 millones de años en la era Proterozoica (Oren, 2014).

En cuanto a la diversidad morfológica las cianobacterias se pueden encontrar en forma unicelular o filamentosa o, en algunos casos formando colonias (**Figura 4**). A nivel celular, su tamaño varía de 0.5 a 60 μm de diámetro, poseen pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *c*) y pigmentos accesorios como ficobilinas, (*ficocianina* y *aloficocianina*), lo que les otorga su color característico azul-verdoso (Vincent, 2009). Sin embargo, algunas cianobacterias producen *ficoeritrina* (ficobilina roja) y estas especies suelen ser de color rojizo.

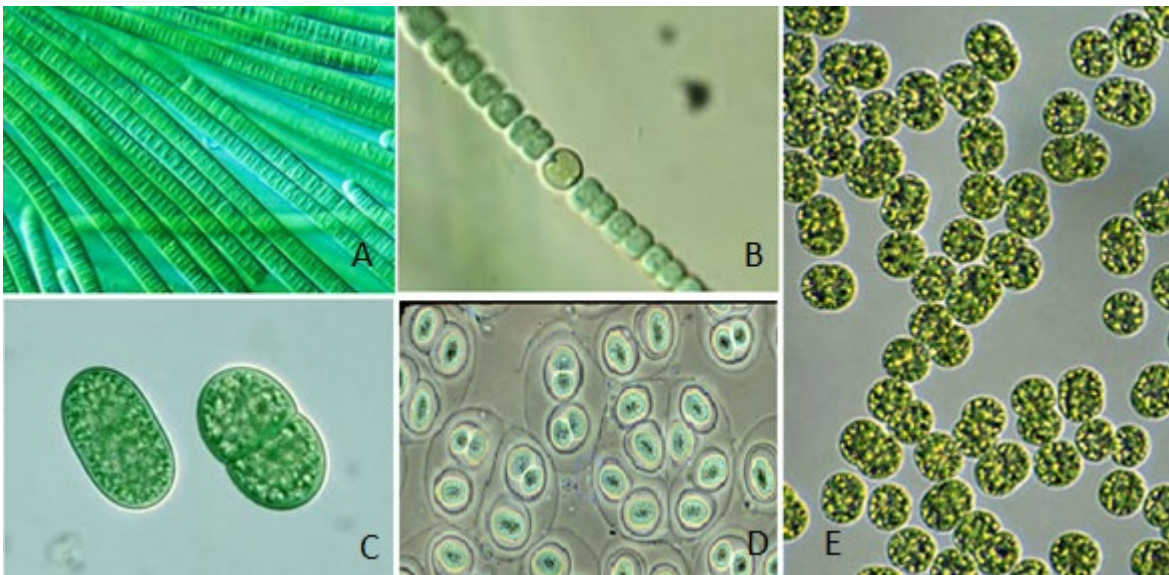


Figura 4. Variedades morfológicas en cianobacterias. A) *Oscillatoria* sp., B) *Nostoc* sp., C) *Synechococcus* sp., D) *Gloethece* sp. y E) *Microcystis* sp.

Otra de las características de las cianobacterias es la presencia de vacuolas de gas que les ayudan a controlar la flotabilidad y por lo tanto su posición en la columna de agua. Este tipo de estructuras se encuentran en *especies planctónicas* o especies que viven en aguas libres. En el caso de cianobacterias filamentosas, algunas especies no solo contienen vacuolas de gas si no también *heterocistos*, los cuales son células redondas diferenciadas, sin color y con paredes gruesas en donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2). Este tipo de células carecen del fotosistema

II, el fotosistema productor de oxígeno y que genera poder reductor a partir de H_2O , por lo que son incapaces de fijar CO_2 . Van der Hoek et al. (1995) indican que la pared gruesa que presentan los heterocistos, funciona como una barrera para formar un ambiente libre de oxígeno dentro de la célula, ya que la enzima (*nitrogenasa*) encargada de catalizar la reducción de N_2 a NH_4^+ , es sensible al oxígeno. Las cianobacterias son de gran importancia dentro del ciclo del nitrógeno, pues son uno de los principales grupos de procariontes capaces de fijar este elemento (Oren, 2014).

La reproducción en cianobacterias se lleva a cabo de manera asexual. En algunas formas unicelulares o coloniales la reproducción es por fisión binaria. Otro tipo de división asexual que realizan las cianobacterias es el agrandamiento celular, por lo que cada protoplasto se divide en varias *células hijas*, dentro de la pared celular parental. Estas células hijas se llaman *endosporas*. Una vez maduras, la pared celular se rompe y las endosporas son liberadas (Van der Hoek et al., 1995).

La identificación de las cianobacterias solía guiarse únicamente por características morfológicas simples, sin embargo, en las últimas décadas se han tomado en cuenta las características ecológicas, se han realizado análisis ultraestructurales, bioquímicos y moleculares, lo que ha influido en la clasificación de las especies, sufriendo cambios radicales (Kómarek y Johansen, 2015).

Las cianobacterias se desarrollan en cualquier tipo de hábitat. Se pueden encontrar en aguas marinas, aguas dulces y suelos; al ser fijadoras de nitrógeno tienen una amplia representación en ambientes donde el nitrógeno es un nutriente limitante, especialmente en suelos tropicales. Muchas cianobacterias termófilas crecen en aguas termales neutras o alcalófilas, donde son los microorganismos predominantes de esos ambientes (Kómarek y Johansen, 2015). Al crecer en ambientes extremos también se pueden encontrar distintas especies en los desiertos y en cuerpos de agua con eutrofización desarrollándose de manera masiva durante los meses calurosos del año (especies filamentosas generalmente). El desarrollo de este tipo de *floraciones* puede traer consecuencias sobre otras especies que vivan en

los cuerpos de agua, ya que agotan el suministro de oxígeno disuelto del medio (Stanier et al., 1992, Bukaveckas et al., 2018).

Algunos géneros de cianobacterias como *Synechococcus sp.* y *Pseudanabaena sp.* son utilizadas para la producción de biocombustibles y otras como alimento debido a su alto valor nutritivo (Śliwińska-Wilczewska et al., 2017; Aoki et al., 2018). El interés en la investigación de cianobacterias se debe a la gran cantidad de compuestos activos que éstas contienen y el uso potencial que se les puede dar. Dentro de esta variedad están los *lipopéptidos*, a los cuáles se les ha atribuido actividades antivirales, antibióticas, antimaláricas, antimicóticas, reversoras de multirresistencia a antibióticos herbicidas e inmunosupresoras (Arrieta-Bolaños, 2008, Xue et al., 2018). Por otro lado, se tienen registros de que un cierto número de especies también pueden producir agentes dermatotóxicos, neurotóxicos o hepatotóxicos, que pueden causar muertes en animales y, en ocasiones, en humanos (Lang-Yona et al., 2018).

3.2.2 *Chlorophyta*

El grupo de las *Clorofitas* o algas verdes fitoplanctónicas, son microorganismos eucariotas fotosintéticos, unicelulares o coloniales, en las que se encuentran cerca de 7 000 especies, y miden alrededor de 0.2 a 20 μm . Presentan una gran variedad de formas, algunas de ellas con flagelos y por lo general con escamas orgánicas externas ornamentadas (**Figura 5**; Hernández-Becerril, 2014).

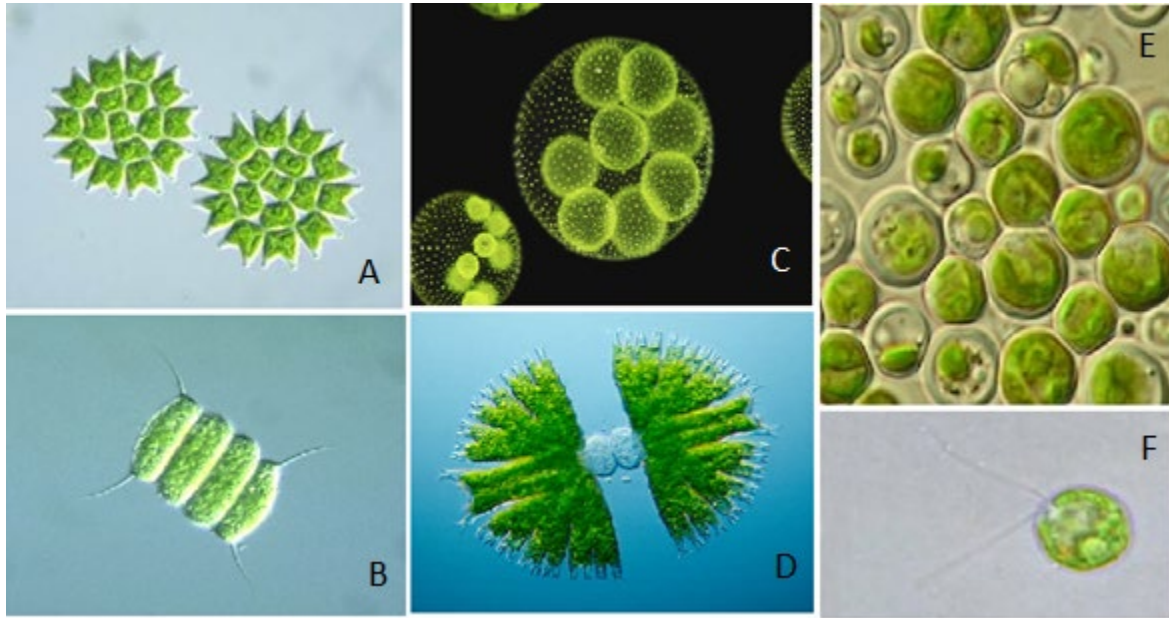


Figura 5. Variedades morfológicas en clorofitas. A) *Pediastrum sp.*, B) *Scenedesmus sp.*, C) *Volvox sp.*, D) *Micrasterias sp.*, E) *Chlorella sp.* y F) *Chlamydomonas sp.*

Este grupo de algas verdes es resultado de la endosimbiosis entre una cianobacteria y una célula eucariota heterotrófica (Not et al., 2012). Sus cloroplastos contienen una doble membrana y poseen pigmentos fotosintéticos como clorofila *a* y *b*, y también pigmentos accesorios como β -carotenos, destacando entre ellos la luteína (Becker, 1994; Lee, 2008). Su pared celular está compuesta por celulosa, manosa o xilosa y cuando una célula envejece por falta de nutrientes, esta puede tomar un color de amarillo a naranja (p ej. *Chlorosarcinopsis*).

Las algas verdes contienen una estructura que sirve para almacenar lípidos, llamada *pirenoide*, el cual puede estar inmerso o en la periferia del cloroplasto y puede ser usado como un carácter taxonómico para la identificación de algunos géneros, para lo cual suele ser teñido con lugol (Carmona et al., 2004; Shubert y Gärtner, 2016).

A partir de lo anterior, la identificación de las clorofitas suele ser difícil porque muchas de las especies presentan una gran variedad de características morfológicas, por lo que, deben ser examinadas a nivel estructural por medio de

microscopio electrónico de transmisión (MET) y barrido (MEB), o usando técnicas moleculares y realizando pruebas bioquímicas (Shubert y Gärtner, 2016).

Las clorofitas se reproducen de manera sexual y asexual. En el caso de la reproducción sexual, esta puede ser isógama o heterógama. Para la reproducción asexual lo hacen por medio de zoosporas, las cuales en algunas especies estas pueden ser flageladas o inmóviles. En el género *Chlorella sp.*, las células se comportan como autosporas que se reproducen asexualmente por mitosis, formando de cuatro a ocho células hijas dentro de la célula madre. Una vez que estas células han madurado, la pared de la célula madre se rompe y las células hijas son liberadas (Abbayes et al., 1989).

La mayoría de las especies de clorofitas se encuentra en aguas dulces, solo el 10% de las especies son marinas, aunque también se pueden encontrar en suelos, zonas árticas o formando relaciones simbióticas (Taylor, 2009). En cuanto a su importancia, algunas especies son utilizadas como suplementos alimenticios, para evaluar su tolerancia a metales pesados, para el tratamiento de aguas residuales, para la mitigación de CO₂ y como indicador de actividad antimicrobiana (Liu y Chen, 2014; Stabili et al., 2014; Abinandan and Shanthakumar, 2015; Moenne et al., 2016)

3.2.3 *Bacilliarophyta*

Las *Bacillariofitas* o diatomeas son algas microscópicas eucarióticas y unicelulares que pueden medir desde 5.0 a 200µm, y en algunas ocasiones pueden alcanzar hasta 1.0 mm de longitud (Sabater, 2009). Existen alrededor de 12, 000 especies de diatomeas y son una de las comunidades biológicas más diversas, por lo que son un componente importante para los recursos de los ecosistemas acuáticos (Pandey et al., 2018). Las diatomeas son organismos de vida libre, que realizan la fotosíntesis a través de las clorofilas *a*, *c*, y presentan pigmentos accesorios como β-

carotenos, destacando entre ellos la fucoxantina lo que les otorga su color característico marrón-dorado (Lee, 2008).

Una de las principales características de las diatomeas, es una pared celular rígida constituida por sílice, denominada *frústula*, la cual está conformada por dos tecas (una superior *epiteca* y una inferior o *hipoteca*), simulando una caja de Petri (Balech y Ferrando, 1964; De Tommasi et al., 2017). En las tecas se pueden encontrar estructuras y ornamentaciones, que sirven para el transporte de gases y nutrientes hacia el interior de la célula y también son utilizados como caracteres para su identificación a nivel de especie (Figura. 6). De acuerdo con la morfología que presentan, las diatomeas se dividen en dos grupos principalmente: 1) centrales, con simetría radial y 2) pennadas, con simetría bilateral (Lee, 2008).

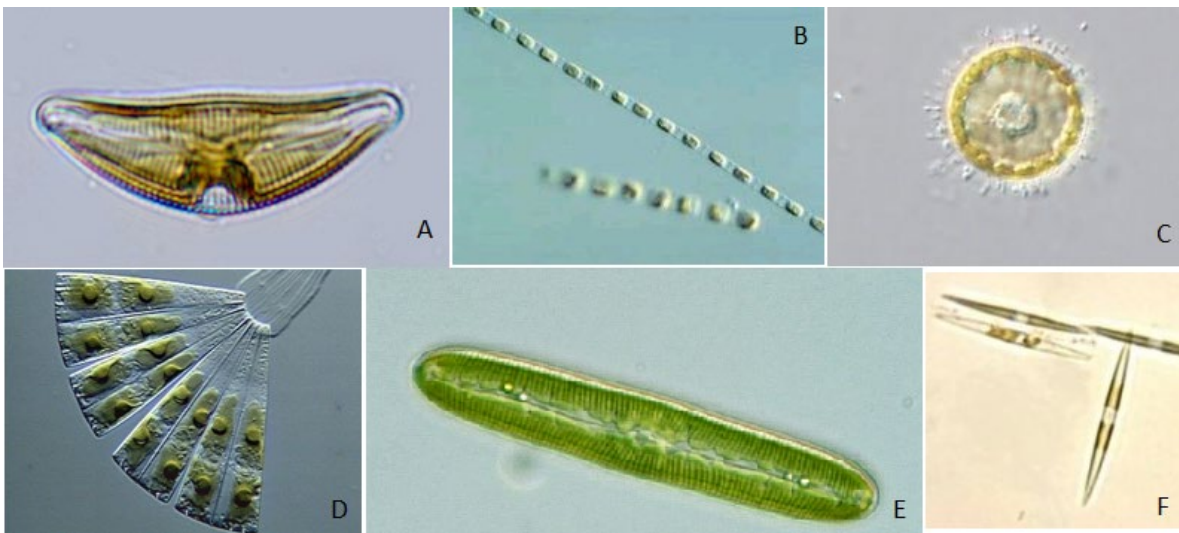


Figura 6. Variedades morfológicas en diatomeas. A) *Cymbella sp.*, B) *Skeletonema sp.*, C) *Cyclotella sp.*, D) *Licmophora sp.*, E) *Pinnularia sp.* y F) *Pseudo-nitzschia sp.*

Las diatomeas pueden reproducirse de forma asexual y sexual. En la reproducción asexual, las células se dividen por fisión binaria y dos células hijas se forman dentro de la frústula parental, estas nuevas células reciben una teca de la célula madre como *epiteca*, la división celular se ve finalizada al producir una *hipoteca* cada célula hija. En este tipo de reproducción, la longitud de la

descendencia va disminuyendo al realizar cada división por lo que una población de diatomeas tiene la necesidad de restaurar el tamaño celular y lo hacen a través de la formación de auxosporas (Hasle y Syvertsen, 1997). La formación de auxosporas se lleva a cabo cuando los gametos se unen y forman el cigoto el cual, tiene forma de esfera que está rodeada por una membrana orgánica. Dentro de esta esfera, se forma una nueva frústula de tamaño máximo, esta nueva célula emerge de la auxoespora y el ciclo comienza de nuevo (Not et al, 2012).

Las diatomeas contribuyen con el 40% de producción primaria neta en los océanos, además desempeñan papeles principales en las redes alimenticias y en los ciclos biogeoquímicos pues son responsables del 20 % de fijación global de CO₂ (Pandey et al., 2017). Debido a su importancia ambiental, las diatomeas son utilizadas como *bioindicadores* de cambios en las condiciones ambientales, pues responden rápidamente a parámetros físicos, químicos, y biológicos (Sabater, 2009).

Se ha observado que algunas especies del género *Pseudo-nitzschia sp.* producen toxinas como mecanismo de defensa contra la depredación, una de estas toxinas es el *ácido domoico* (AD), que es una neurotoxina soluble en agua, que afecta a los organismos marinos y a los humanos (Hernández-Becerril et al., 2007; Lundholm et al., 2018).

En condiciones naturales la frústula se encuentra cubierta por un mucílago, que es excretado por las mismas diatomeas, el cual, llega a cubrir las ornamentaciones de la pared silíceas, por lo que es difícil observar estas estructuras bajo un microscopio óptico. Es por ello que se emplea la microscopía electrónica de barrido, para observar los detalles en las ornamentaciones, siendo este análisis un criterio de evaluación de la calidad y resolución de los microscopios (Sabater, 2009).

3.3 Identificación de fitoplancton

3.3.1 Microscopía

El microscopio sigue siendo una herramienta básica para el estudio de la Biología, ya que es un instrumento útil para observar microorganismos y estructuras que son invisibles para el ojo humano. Los microscopios suelen clasificarse en dos: los ópticos y los electrónicos, y tienen una amplia aplicación en el estudio de varios aspectos de las estructuras celulares. (Pereira-da-Silva y Ferri, 2017).

Los *microscopios ópticos* son capaces de aumentar el tamaño de los objetos hasta mil veces, ya que la mayoría de las células que se encuentran entre 1 y 100 μm de diámetro pueden ser observadas en el microscopio óptico, sin embargo, no es lo suficientemente poderoso para observar pequeños detalles estructurales. El límite de resolución del microscopio óptico es de 0.2 μm , dos objetos separados por menos de esta distancia aparecen como una única imagen, en lugar de distinguirse una de otra. La resolución no depende solo de del sistema óptico, si no de la longitud de onda de la luz visible (Tortora et al. 2007).

Debido a que la resolución del microscopio óptico es limitada, y no era posible observar las estructuras celulares, fue necesario crear una técnica de microscopía más poderosa, es así como surgió la microscopía electrónica desarrollada en 1930 (Cooper y Hausman, 2008). El microscopio electrónico puede alcanzar una resolución mucho mayor en comparación con el microscopio óptico, esto se debe a que este equipo ocupa una longitud de onda de electrones en lugar de luz. Obteniendo una resolución de 0.2 nm (Tortora et al., 2007). Dentro de los microscopios electrónicos se encuentran los de transmisión y de barrido.

Estos microscopios, son especialmente útiles para estudiar las estructuras de las células y de los virus, durante la practica pueden discriminar objetos separados

por una distancia de apenas 20nm y suelen producir un aumento de 1 000 a 10 000 X (Olivas y Alarcón, 2004).

3.3.2 Técnicas moleculares

3.3.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN una técnica que consiste en aislar y purificar moléculas de ADN para su posterior uso, con el paso de los años se han diseñado distintos protocolos y kits comerciales con la finalidad de obtener la máxima cantidad y calidad de ADN. Los kits incluyen soluciones de lisis que contienen incluso perlas magnéticas para el rompimiento de células, soluciones de unión y lavado. El empleo de estos kits reduce el tiempo de extracción, pues reducen las etapas del procedimiento y garantizan una extracción de alta pureza. Cabe mencionar que existen muchos kits diferentes dependiendo de la muestra a tratar; tejidos, células, sangre, suero, plantas y muestras forenses.

3.3.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa mejor conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*) es una técnica que consiste en la amplificación exponencial *in vitro* de fragmentos de específicos ADN, la cual produce millones de copias del mismo fragmento (Madigan et al., 2004). Esta técnica fue creada por Kary Mullis en 1983, lo cual lo hizo ganador del Premio Nobel de Química en 1993 (Butler, 2011).

La PCR se lleva a cabo mediante tres pasos principales (Rosenberg, 2017):

- 1) La *desnaturalización* ocurre alrededor de los 92-98°C en la cual la doble cadena de ADN es separada, dejando una sola cadena como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN.

- 2) Una vez separadas, ocurre la *alineación*, a una temperatura de entre 50 a 60° C. En este paso los iniciadores o *primers* se alinean en sitios específicos de la cadena molde, de modo que sus extremos 3' se dirigen uno hacia otro.
- 3) En el último paso denominado como *extensión*, ocurre a una temperatura de 70°C, la polimerasa termoestable (Taq polimerasa), va agregando los dNTP's en los extremos 3' de los iniciadores, sintetizando una nueva cadena.

Estos tres pasos forman un ciclo el cual se repite sucesivamente, pues en cada ciclo se amplifica la región de interés de las dos cadenas complementarias (**Figura 7**). Así los productos generados van aumentando su concentración de manera exponencial, pues cada cadena nueva sirve como molde en los ciclos subsecuentes (Stephenson, 2010; Serrato et al. 2014). Esta técnica se ha convertido en una herramienta muy importante en la Biología Molecular pues sus aplicaciones van desde la genética de poblaciones, la evolución molecular, el análisis de enfermedades genéticas, hasta la medicina forense (Karp, 2008).

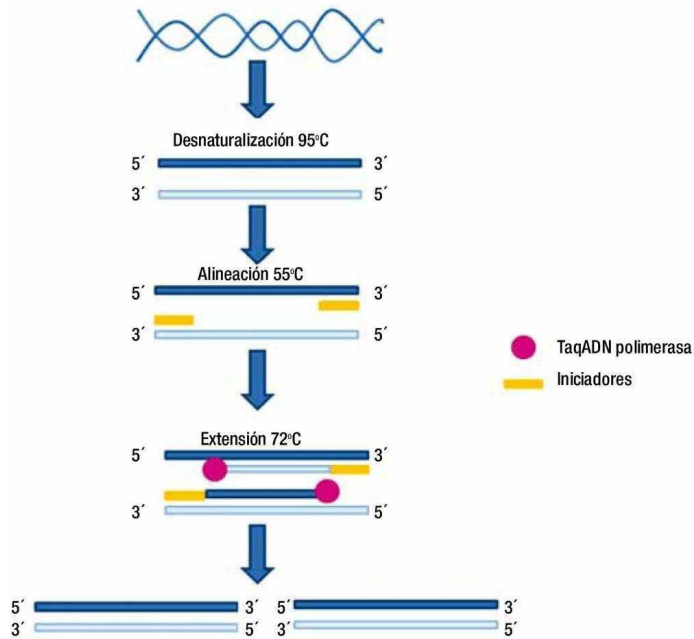


Figura 7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.3.2.4 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

La *electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante* (mejor conocida como DGGE por sus siglas en inglés), utilizada por primera vez por Gerayd Muyzer en 1993 para el análisis de la diversidad genética de poblaciones microbianas. El procedimiento se basa en la electroforesis de fragmentos de ADN_r amplificados por PCR y separados en geles de poliacrilamida, que contienen un gradiente de desnaturalizantes (urea y formamida) que aumenta de manera lineal. En esta técnica se pueden separar fragmentos de ADN de la misma longitud, pero con diferentes secuencias de pares de bases (Muyzer et al., 1993). Un fragmento de ADN bicatenario se desplaza por el gel y cuando llega a una determinada concentración desnaturalizante, las cadenas de ADN se separan y el desplazamiento se interrumpe.

La separación de las cadenas de ADN depende de las diferencias en la secuencia de bases, por lo que las bandas observadas en un gel de DGGE describe

las variaciones en las secuencias amplificadas. Las bandas obtenidas del DGGE pueden cortarse y posteriormente secuenciarse. Una vez secuenciadas estas bandas, se pueden determinar las especies presentes en la comunidad comparando con secuencias de especies conocidas registradas en bases de datos (Madigan et al., 2004).

3.4 Cinéticas de crecimiento

Realizar la caracterización taxonómica, bioquímica o fisiológica de los microorganismos, es muy importante, debido a que muchas especies son usadas como bioindicadores o son empleadas en empresas farmacéuticas o industriales, por lo que es necesario el desarrollo de diferentes técnicas de cultivo para su aprovechamiento (Leal et al., 2001). Durante el cultivo de los microorganismos suelen medirse parámetros como pH, salinidad, temperatura, oxígeno disuelto, concentración de nutrientes, principalmente información que puede ser utilizada para el tratamiento de aguas residuales o depuración de biogás, esto con el fin saber cómo responden a ciertas condiciones y seleccionar aquellas especies que son las más indicadas para su explotación (Zhao et al., 2011).

Para medir y estimar la productividad de estos microorganismos se necesita un modelo que nos brinde la información del rendimiento de los cultivos, lo que se le conoce como *modelos cinéticos*. Se han desarrollado diversos modelos cinéticos para comprender el crecimiento de microorganismos en hábitats naturales (**Tabla 1**), por ello por lo que en estas cinéticas se les proporcionan las condiciones lo más parecidas al lugar en el que habitan (Rezvani et al., 2015).

El crecimiento de los microorganismos en cultivo, generalmente se da en cuatro fases: Lag, exponencial, estacionaria y finalmente decrecimiento o muerte.

Durante la fase *Lag*, no es notable el crecimiento debido a los ajustes fisiológicos o a la estabilización de los microorganismos al nuevo medio de cultivo. Durante la *fase exponencial*, una vez estabilizadas las condiciones fisiológicas, los

microorganismos comienzan a consumir los nutrientes, y factores como la disponibilidad de luz se vuelven factores importantes para su crecimiento y así, poder reproducirse de manera exponencial. En la *fase lineal*, al aumentar la tasa de crecimiento, la luz comienza a ser un factor limitante, debido a la acumulación de la biomasa, por la que la división celular se vuelve lenta. Posterior a esto, comienza la *fase estacionaria*, donde los microorganismos ya no se dividen, pues factores como los nutrientes y el O₂ son muy escasos en el medio. Finalmente, se da la *fase de decrecimiento o muerte*, donde la concentración celular disminuye, esto se debe al agotamiento de nutrientes y cambios en el pH (Lee et al., 2015).

Tabla 1. Experimentos cinéticos

Autor	Cultivo	Parámetros medidos						
		pH	Temp	CO ₂	Luz	IC*	Pmax**	μ***
Leal et al., 2001	<i>Pseudanabaena galeata</i>	x	x		x			
Berenguel et al., 2002	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	x	x	x	x		x	
Spijkerman et al., 2011	<i>Chlamydomonas acidophila</i>			x			x	x
Zhao et al., 2011	<i>Chlorella sp.</i>	x		x		x	x	x
Eloka-Eboka and Inambao, 2011	<i>Chlorella vulgaris</i>	x	x	x	x		x	x
Nevarez et al., 2016	<i>Chaetoceros muelleri</i>	x	x	x	x		x	x
Franco-Morgado, 2018	Consorcio microalgas y bacterias alcalófilas.	x	x	x	x	x		x
Ramirez-Rueda, 2018	Consorcio microalgas y bacterias alcalófilas.	x	x	x	x	x		x

*Carbono inorgánico, **Productividad máxima, ***Velocidad de crecimiento

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué algas componen los consorcios empleados para el tratamiento de emisiones de CO₂?

¿Se pueden crecer como monocultivos?

¿Cómo podemos emplear estas diferencias para mejorar el proceso biotecnológico?

5 HIPÓTESIS

Los monocultivos algales provenientes de fitoplancton, tendrán diferentes capacidades de crecimiento reflejadas en sus diferencias morfológicas, así mismo, la productividad será alta, ya que, al tratarse de monocultivos, no habrá depredación por presencia de protozoarios u otros competidores. Estas diferencias ayudarían a elegir el monocultivo con facilidad de mayor crecimiento para su uso en fotobiorreactores para el tratamiento de emisiones de CO₂.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Obtener y caracterizar monocultivos de fitoplancton empleados para el tratamiento de emisiones gaseosas de CO₂

6.2 Objetivos particulares

- Aislar diferentes colonias de fitoplancton a partir de consorcios empleados en el tratamiento de emisiones de CO₂
- Obtener cultivos monoalgales en medio líquido y optimizarlos
- Identificar los diferentes cultivos monoalgales obtenidos
- Caracterizar cinéticamente el crecimiento de los cultivos monoalgales en un fotobiorreactor tubular cerrado para el tratamiento de CO₂

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Origen de las muestras

La experimentación para este trabajo comenzó a partir de los cultivos favorecidos que ya se encontraban en el laboratorio. Las muestras de fitoplancton fueron tomadas a partir de dos consorcios colectados anteriormente de diferentes regiones del país, los cuales se crecieron y se adaptaron a condiciones estándar de laboratorio. El primer cultivo fue de fitoplancton marino colectado en diferentes puntos de muestreo (incluyendo bahías de descarga) de la costa del estado de Colima, *utilizando la técnica de arrastre con red para fitoplancton* de 20 μ m de apertura de malla. El arrastre se realizó durante 7 minutos a 5 nudos de velocidad. A partir de esta colecta se desarrollaron tres diferentes cultivos de fitoplancton, favoreciendo condiciones para el crecimiento de cianobacterias, clorofitas y diatomeas respectivamente.

El segundo consorcio proviene del ex lago de Texcoco, en el Estado de México, donde el consorcio cultivado se identificó previamente por Granada-Moreno et al. (2017).

7.2 Medios de cultivo

Se preparó una solución de agua marina sintética (AMS), basada en el medio ESAW (**Tabla 2**; Andersen, 2005) Para la preparación correcta del medio AMS, se disolvió por separado los reactivos anhidros de los hidratados. Una vez disueltos se mezclaron ambas soluciones y se aforró al volumen requerido. A este medio se le agregaron las soluciones nutritivas, basadas en el *medio Keller (K)* (**Tabla 3**; Andersen, 2005), las cuáles, contenían metales traza, vitaminas y otras fuentes de nutrientes. Ambas soluciones se esterilizaron con una autoclave durante 20 min a 120 °C y a una presión de 20 psi. Una vez estériles, el AMS se suplementó con nutrientes (esterilizados por filtración) a distintas concentraciones (**Tabla 4**), entre

ellos nitrato de sodio (NaNO_3) como única fuente de nitrógeno y $\text{Na}_2\text{-}\beta$ glicerofosfato como única fuente de fósforo.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la preparación del agua marina sintética (AMS).

Reactivo	Cantidad usada (g/L)
Anhidros	
NaCl	21.194
Na_2SO_4	3.550
KCl	0.599
NaHCO_3	0.174
KBr	0.0863
H_3BO_3	0.0230
NaF	0.0028
Hidratados	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	9.592
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.344
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0218

Tabla 3. Soluciones nutritivas

Vitaminas (1)	Cantidad usada (por L)	Concentración final
Tiamina HCl (Vitamina B ₁)	0.1 g	2.96×10^{-7}
Biotina (Vitamina H)	1 mL	2.05×10^{-9}
Cianocobalamina (vitamina B ₁₂)	1 mL	3.69×10^{-10}
Metales traza (2)	Cantidad usada (por L)	Concentración final
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.220 g	1.00×10^{-4}
Fe-Na-EDTA $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	4.930 g	1.17×10^{-5}
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.150 g	1.17×10^{-5}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.178 g	9.00×10^{-7}
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL	8.00×10^{-8}
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL	5.00×10^{-8}
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL	3.00×10^{-8}
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mL	1.00×10^{-8}
NaNO_3 (3)	74.92 g	8.82×10^{-4}
$\text{Na}_2\text{-}\beta$glicerofosfato (4)	2.36 g	1.00×10^{-5}

Tabla 4. Concentraciones de nutrientes colocadas en la solución salina.

Nutrientes	Cantidad usada (mL/L)
Vitaminas (1)	1
Metales traza (2)	1
NaNO ₃ (3)	10
Na ₂ -βglicerofosfato (4)	20

7.2.1 Medio de cultivo para diatomeas marinas

El medio de cultivo para diatomeas se preparó a partir de la misma solución de agua marina sintética (AMS), descrita anteriormente. Los nutrientes utilizados son iguales a los que se muestran en la **Tabla 4**, suplementado con 5 g L⁻¹ Na₂SiO₃ como fuente de sílice (Si), al triple de concentración (3X), debido a la pared silíceas que presentan las diatomeas.

7.2.2 Medio marino sólido

A diferencia del medio líquido, a este medio se le agregó agar noble como agente gelificante (11 g). Primero se preparó la solución salina al doble de concentración en medio litro y en el otro medio litro se agregó agar al 1.1%. Posteriormente ambos medios se esterilizaron en autoclave por separado. Una vez estériles se dejaron enfriar a 60°C, aproximadamente, y se mezclaron ambas soluciones en condiciones de esterilidad. Finalmente se vertieron las soluciones nutritivas, previamente esterilizadas por filtración, se mezcló cuidadosamente, y se vertió en cajas Petri.

7.3 Obtención de monocultivos

Para obtener cultivos monoalgales se utilizó la *técnica de diluciones seriadas* y se sembraron en cajas Petri. Se realizaron 10 diluciones seriadas en agua marina sintética (AMS) estéril por cada cultivo favorecido. Por cada una de las 10 diluciones

se sembraron tres cajas Petri. La siembra consistió en tomar 100 μ L de las muestras procedentes de cada uno de los tres cultivos favorecidos, los cuales, se sirvieron en cajas de Petri con medio AMS y se colocaron de 10 a 15 perlas de vidrio estériles. Posteriormente, se taparon las cajas y agitaron homogéneamente durante 5 minutos. Se retiraron las perlas de vidrio y las cajas se colocaron en una incubadora con luz de led a una irradiancia fotosintéticamente activa de 150 μ mol m⁻²s⁻¹, sin agitación a 30°C de temperatura. Las cajas inoculadas se mantuvieron en estas condiciones durante siete días. Después de este periodo se observó el crecimiento de colonias en algunas cajas. Se aislaron aquellas que poseían una coloración verde-azul, verde, amarilla o café. Las colonias seleccionadas fueron nuevamente estriadas en cajas de Petri. Este procedimiento se repitió alrededor de diez veces hasta obtener colonias completamente aisladas y cajas homogéneas con un solo tipo de colonia.

A partir de las cajas de Petri finales, se tomaron las colonias aisladas. Cada colonia diferente se sembró en tubos estériles de 10 mL con tapa, con 2 mL de medio AMS y se dejaron crecer durante siete días, en una incubadora con agitación orbital a 160 rpm a 30°C de temperatura. Posteriormente, se procedió a escalar los cultivos a frascos de borosilicato estériles de distintos volúmenes (desde 50mL hasta 1000mL) con tapas adaptadas para evitar la fuga de gases, cada una con 10% (v/v) de cultivo monoalgal.

7.4 Identificación de fitoplancton

La identificación del fitoplancton en cultivos monoalgales se realizó mediante la comparación morfológica y por análisis a nivel molecular. En la identificación morfológica se realizó por microscopía óptica y electrónica de barrido (MEB), comparando la morfología de las algas utilizando claves dicotómicas específicas para cada grupo. También se realizó una identificación molecular con la técnica PCR-DGGE.

7.4.1 Microscopía óptica y electrónica

Se tomaron muestras de cada uno de los cultivos y se observaron en un microscopio óptico (LSM-800; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), acoplado a una cámara digital (Axiocam 506 colour; Carl Zeiss) para asegurarse que los cultivos aún se conservaran monoalgales. Posteriormente, a los mismos cultivos monoalgales se les realizaron observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB; equipo JEOL JSM6360LV). Este procedimiento se llevó a cabo en el *Laboratorio de Microscopia Electrónica de Barrido* en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología a cargo de la M. en C. Laura Elena Gómez Lizárraga.

Dependiendo del tipo celular, las muestras fueron sometidas a diferentes pretratamientos. Para diatomeas se le realizaron tres lavados independientes con agua destilada, en donde en cada uno se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, esto con el fin de eliminar las sales presentes en el medio. Posteriormente se dejaron en cloro comercial al 80% durante 16 horas. Después se volvieron a realizar tres lavados con agua destilada, en esta ocasión para retirar el exceso de cloro.

Una vez pretratadas las muestras se colocaron en cubreobjetos circulares, se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente y, posteriormente se les colocó una capa de oro. Una vez obtenidas las imágenes se procedió a identificar las células observadas con ayuda de claves dicotómicas: cianobacterias (Oscillatoriales) claves de Komárek et al (2005); para clorofitas claves de Shubert y Gaärtner (2015), y diatomeas pennadas: claves de Kociolet et al. (2015).

7.4.2 Identificación molecular

Los cultivos monoalgales, fueron sometidos a una identificación molecular utilizando la técnica de PCR-DGGE de una región del gen ARNr 16S. Para esta identificación se aplicaron una serie de técnicas básicas que se describen a continuación:

7.4.2.1 Extracción de ADN

A partir de los cultivos aislados se realizó la extracción de ADN utilizando el Kit comercial llamado *ZR Plant/Seed DNA MicroPrep™* (Zymo Research, USA), siguiendo el protocolo descrito en el apartado de anexos. La concentración y calidad del ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría con ayuda de un NanoDrop 2000® (Thermo Scientific) y por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

7.4.2.2 Electroforesis en geles de agarosa

Una vez extraído el ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% para verificar la presencia y calidad del ADN. Se pesaron y disolvieron 0.3g de agarosa en 30 ml de solución búfer TBE al 1X. Posteriormente se calentó en microondas hasta observar que la solución homogénea. Una vez que esta se enfrió, se colocaron 3µL de colorante para ácidos nucleicos (SYBR Safe DNA Gel Stain) al 10,000X y se vertió en un molde para cámara de electroforesis. Cuando el gel solidificó se colocó en la cámara de electroforesis con solución búfer TBE al 1X. Para cada uno de los carriles se realizó una solución de 12µL de total de la mezcla (**Tabla 5**). Utilizando como colorante de corrida al reactivo "*DNA Loadin Dye*" (6X; Thermo Scientific) y como marcador de peso molecular *Mass Ruler Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific).

Tabla 5. Mezcla total de carga para electroforesis

Reactivos	Marcador	ADN
H2O libre de nucleasas	5	8
Colorante (6X)	2	2
ADN o PCR	0	5
Marcador de peso molecular	5	0

Una vez cargadas todas las muestras y el marcado de peso molecular se prosiguieron a la electroforesis. El gel se corrió a 80 volts durante 60 minutos y se observó en un fotodocumentador de luz UV.

Posteriormente se colocaron las muestras en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Nexus GSX1 y se sometieron a los ciclos de temperatura descritos en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Ciclos de temperatura para la amplificación por PCR de la región del gen de ARNr 16S.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 Desnaturalización	94° C	5 min
20 Alineación	94° C	1 min
	65° C	1 min
	72°C	3 min
15	94°C	1 min
	55° C	1 min
	72°C	3 min
1 Extensión	72°C	7 min
2 Conservación	4°C	∞

7.4.2.4 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, DGGE

La Electroforesis en Gel en Gradiente Desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés) se utiliza para separar los fragmentos de un gen amplificado acorde a sus diferencias filogenéticas.

Para realizar esta electroforesis, el material se limpió con SDS (Dodecil Sulfato de Sodio): placas de cristal, espaciadores y peine, posteriormente se enjuagaron con agua destilada. Los cristales se enjuagaron con etanol y se secaron. Las placas de cristal fueron montadas en el sistema de ensamblaje y se verificó que los cristales estuvieran nivelados (burbuja de nivelación). Se verificó que existiera espacio suficiente para introducir las *soluciones de alta y baja concentración 20 a 60%* (**Tabla 8**), y que el peine entrara bien entre los cristales. Se enjuagaron las jeringas y tuberías con agua destilada y se ajustó el sistema formador de gradiente El porcentaje de acrilamida que se eligió para el gel fue del 6%.

Tabla 8. Reactivos empleados para soluciones desnaturalizantes

Soluciones	Baja 20%	Alta 60%
Acrilamida	2.7 mL	2.7 mL
TAE 50X	0.36 mL	0.36 mL
Urea	1.512 g	4.536 g
Formamida	1.44mL	4.32 mL
H₂O MiliQ	12 mL	6.1 mL
Total	18 mL	18 mL

Se llenaron las jeringas con las *soluciones de alta y baja concentración* de acrilamida y se colocaron en el sistema formador de gradiente. Se llenó la cavidad de entre los cristales y se colocó el peine. Se dejó polimerizar 90 minutos, aproximadamente y se preparó el tanque de electroforesis con el búfer de corrida (TAE 1X).

El búfer de corrida se calentó por 90 minutos a ~60°C. Una vez polimerizado el gel, se colocó en el tanque de electroforesis y se cargaron las muestras. El total de carga por muestra fue de 20 mL. La electroforesis se corrió a 75 volts por 16 horas a una temperatura de 60°C. Una vez terminado este tiempo, se sacó el gel y se visualizó en un fotodocumentador de luz UV. Las bandas dominantes fueron enumeradas para posteriormente cortarse con un bisturí y colocarse en tubos de microcentrífuga de 0.6 mL con 60 µL de la solución bufer *DNA Elution*. Se incubaron a 37°C por 4 horas, posteriormente a 4°C por 24 horas y, finalmente, se re-amplificaron usando los *primers* BAC341F sin grapa -CG. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para asegurarse que la amplificación había sido exitosa y posteriormente, los productos de PCR fueron purificados con el kit comercial *DNA Clean & Concentrator™-5*, siguiendo el protocolo que se encuentra en el apartado de anexos. Una vez purificados, fueron leídos en NanoDrop 2000 para asegurarse de que los fragmentos se encontraran puros.

7.4.2.5 Secuenciación parcial

Una vez purificados, se procedió a realizar la secuenciación. Las muestras purificadas fueron enviadas al Instituto de Biotecnología de la UNAM, para ser procesadas.

7.5 Cinética de crecimiento

Una vez escalados los monocultivos a un volumen de 1000mL a partir de un volumen de cultivo de 300mL, se procedió a realizar la cinética de crecimiento de cada uno de los tres cultivos monoalgales. Estas cinéticas de crecimiento se llevaron en una incubadora con agitación orbital a una velocidad de 160 rpm por minuto.

Con la finalidad de evaluar la influencia de las condiciones de agitación dentro de la incubadora sobre el crecimiento de los cultivos monoalgales, las cinéticas de crecimiento se realizaron simultáneamente en un fotobiorreactor tubular cerrado con un volumen de 600 mL (**Figura 8**) (De los Cobos et al., 2016) el cual, tiene la capacidad de mantener el cultivo homogéneamente mediante agitación automática a un flujo de 250 Lmin^{-1} .

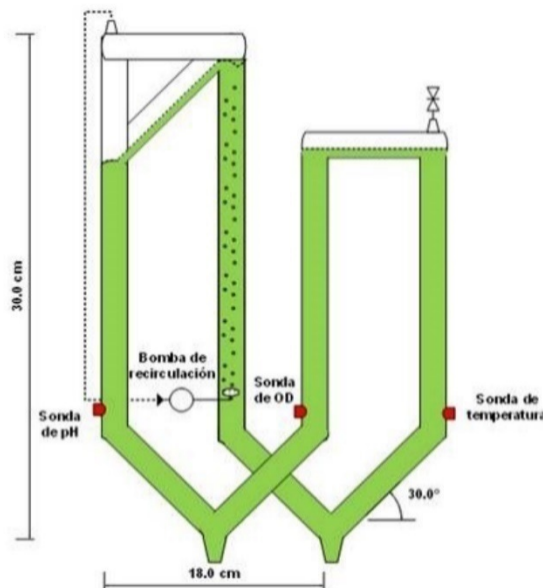


Figura 8. Diseño de fotobiorreactor tubular cerrado

En ambas configuraciones de cultivo, desde el día cero (0), hasta el final de cada cinética (15 días) se tomó registro cada 3er día de los parámetros de pH, oxígeno disuelto, temperatura y la concentración de biomasa.

La medición de biomasa se determinó utilizando dos técnicas: 1) por *espectrofotométrica LV o UV*, midiendo la absorbancia de una alícuota del cultivo a una longitud de onda de 545nm y 2) por la *técnica de sólidos suspendidos totales (SST)*. Además, se determinó y la concentración de carbono inorgánico (CI) y nitrógeno total (NT), utilizando el sistema TOC-L CSH/CSN (Shimadzu).

Una vez obtenidos los resultados de la cinética de crecimiento, se calculó la productividad máxima de cada cultivo mediante la fórmula:

$$P_{max} = \frac{(X_f - X_i)}{(t_f - t_i)}$$

Donde:

X_f = Muestra final (g/L)

X_i = Muestra inicial (g/L)

t_f = Tiempo final (días)

t_i = Tiempo inicial (días)

Además, se calculó la velocidad de crecimiento (μ) midiendo la concentración de biomasa por día de muestreo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\ln(X_f/X_i)}{(t_f - t_i)}$$

Donde:

X = Biomasa muestreada (g/L)

Una vez obtenidos los resultados hasta el final de la cinética, se graficaron en función del tiempo. La velocidad de crecimiento resulta ser la pendiente de la ecuación de la recta.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Obtención de monocultivos a partir de consorcios de fitoplancton

Se lograron aislar dos cultivos monoalgales a partir de un consorcio de fitoplancton marino utilizando la técnica de diluciones seriadas (**Figura 9**). Para las muestras del lago alcalino-sódico, sólo fue posible aislar un monocultivo.

Los tres monocultivos obtenidos presentaban el color representativo del grupo algal buscado: color verde-azulado para las *cianobacterias* (**Figura 9 A**), un color verde intenso para las *clorofitas* (**Figura 9 B**) y color café-dorado para las *diatomeas* (**Figura 9 C**). Con ayuda del microscopio, se fue comprobando la presencia y la proporción de cada uno de estos grupos de microorganismos, además de cerciorarse que los cultivos continuaran siendo monoalgales.

El aislamiento y escalamiento de los monocultivos fue exitoso debido a las condiciones de esterilidad que se mantuvieron en el laboratorio.

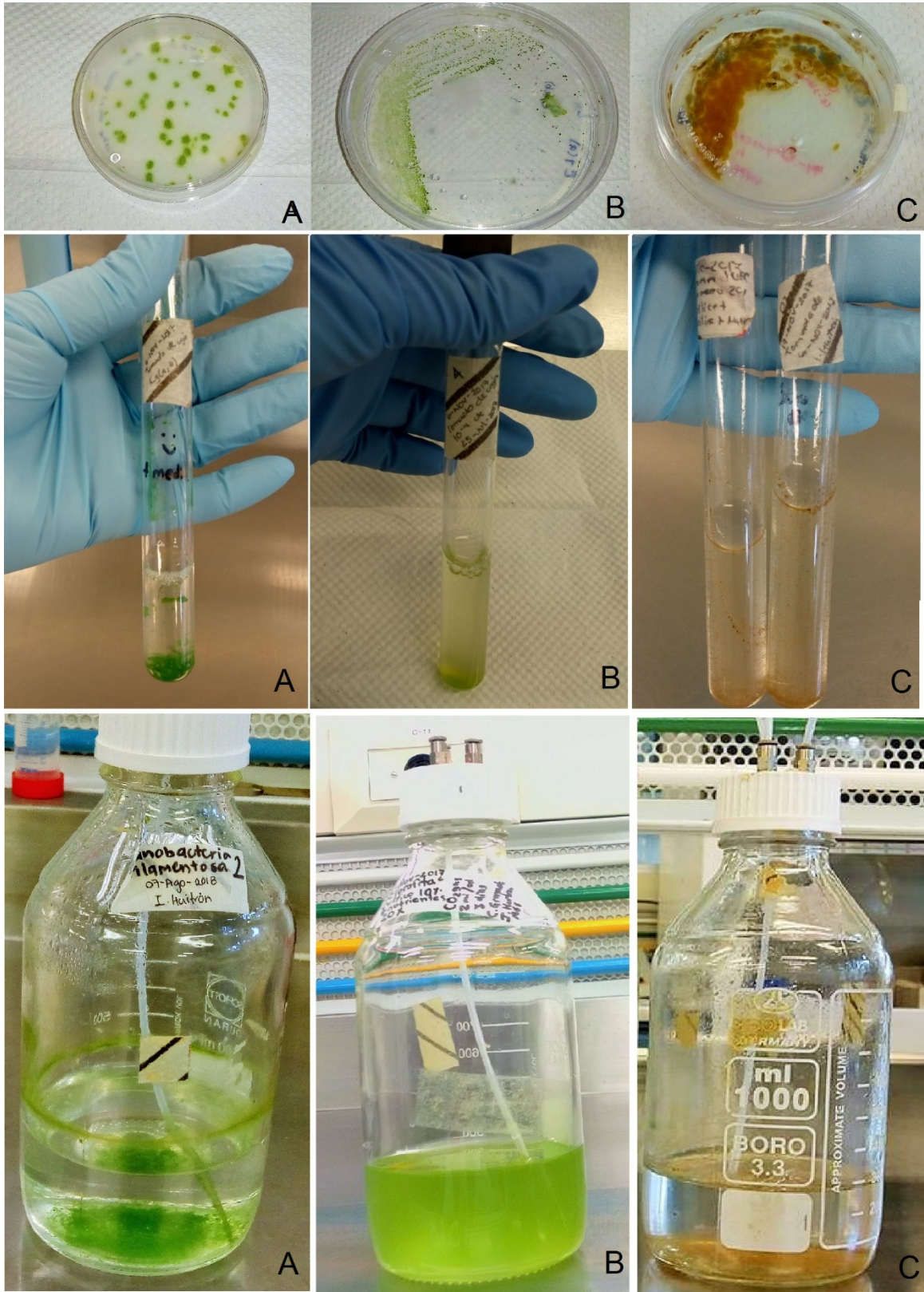


Figura 9. Obtención de monocultivos desde colonias aisladas en placa de agar, hasta su escalamiento a un volumen de 1000 mL. A) cianobacteria, B) clorofita y C) diatomea.

8.2 Identificación de los monocultivos por microscopía óptica y electrónica

La microscopía óptica y electrónica de barrido fueron utilizadas para la identificación de los tres cultivos obtenidos, apoyándose con claves dicotómicas específicas para los grupos que se obtuvieron en forma de monocultivos. Por lo que, el monocultivo de cianobacterias fue identificado como *Pseudanabaena sp.*, el monocultivo de clorofitas se trata de *Chlorella sp.*, y finalmente, el monocultivo de diatomeas como *Navicula sp.*

8.2.1 Descripción de *Pseudanabaena sp.*

A través del análisis de microscopía se logró describir el crecimiento filamentososo de la cianobacteria y su coloración característica verde-azulosa de las cianobacterias (**Figura 10**). La morfología celular fue cilíndrica con los extremos redondeados, caracteres propios del género *Pseudanabaena sp* (Zhu et al., 2015).

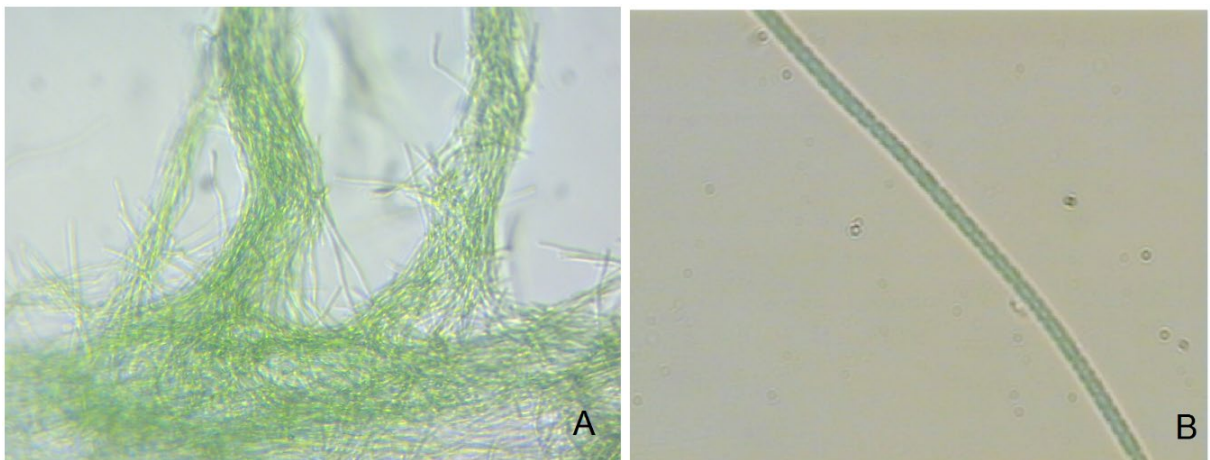


Figura 10. Micrografías de *Pseudanabanea sp.* A) 40X y B) 100X

El género *Pseudanabaena* está conformado por organismos con crecimiento filamentososo, son solitarios y sin ramificaciones. Los filamentos miden alrededor de 0.8 a 3 μm de ancho y están compuestos por células cilíndricas, rectas o curvas. Generalmente no presentan movimiento y en ocasiones se deslizan lentamente (Kómarek y Johansen, 2015).

La mayoría de las especies de este género son planctónicas o bentónicas, se encuentran en reservorios oligotróficos, mesotróficos a levemente eutróficos, otras especies crecen en el suelo o en el mucílago de otras algas. Guiry y Guiry (2018) mencionan que se conocen pocas especies de biotopos extremos (minerales y aguas termales, localidades salinas o hipersalinas), pero esta microalga fue recolectada en el exLago de Texcoco, por lo que las características concuerdan con los registros reportados anteriormente. Sin embargo, Acinas et al., (2009) describieron que el género *Pseudanabaena* ha sido poco investigado científicamente, pues existen muy pocos datos reportados sobre sus características fenotípicas y genéticas, por lo que, para este ejemplar, resulta difícil llegar a nivel de especie:

Dominio: Bacteria

Reino: Eubacteria

Phylum: Cyanobacteria

División: Cyanophyta

Clase: Cyanophyceae

Orden: Synechococcales

Familia: Pseudanabaenaceae

Género: *Pseudanabaena* sp.
(Lauterborn, 1915)

8.2.2 Descripción de *Chlorella* sp.

Para el caso del monocultivo de clorofita, fue determinado como *Chlorella* sp., el cual, presento células esféricas solitarias de color verde con una longitud de 5 µm, las cuales presentaron un cloroplasto y un pirenoide inmerso dentro del mismo (Figura 11).

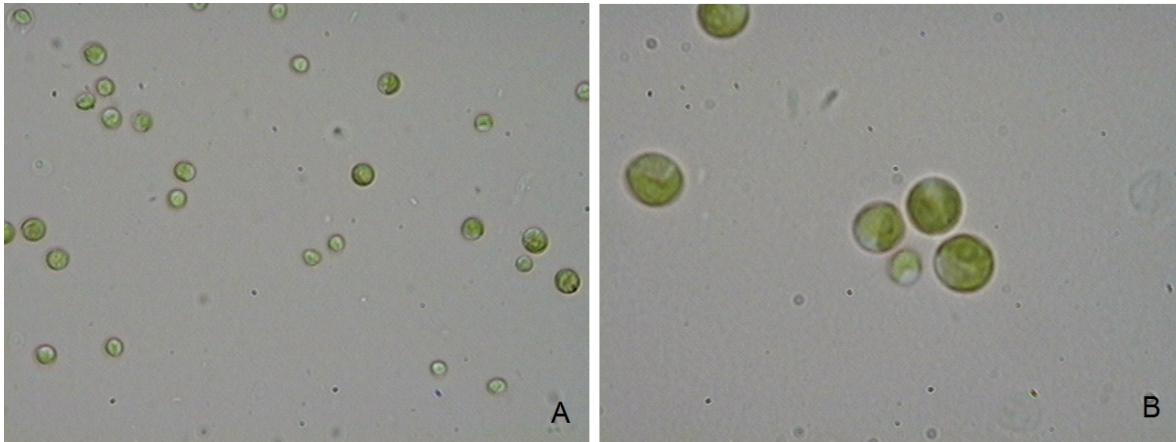


Figura 11. Micrografías de *Chlorella* sp. A) 40X y B) 100X

El género *Chlorella* se encuentra distribuido normalmente en cuerpos de agua dulce, sin embargo, Shubert y Gärtner (2015) mencionan que especies de este género pueden crecer en medios marinos o salobres. El monocultivo identificado en el presente estudio fue aislado de una muestra del mar del estado de Colima y fue crecido en medios salinos sintéticos, lo que concuerda con las características reportadas para este género:

Dominio: Eukarya

Reino: Plantae

Phylum: Chlorophyta

División: Chlorophyta

Clase: Trebouxiophyceae

Orden: Chlorellales

Familia: Chlorellaceae

Género: *Chlorella* sp. (Beyerinck, 1890)

8.2.3 Descripción de *Navicula sp.*

El monocultivo de diatomea fue clasificado como parte del género *Navicula sp.*, el cual, tiene células elípticas con ápices redondeados, de color café dorado, con un tamaño de 17 a 25 μm y con presencia de dos grandes cloroplastos (Kociolek et al., 2015) (Figura 12).

Con el pretratamiento realizado, fue posible observar características que con el microscopio óptico no eran visibles. Se pudo observar que *Navicula sp.* presenta rafe, recto y con terminación en forma de gancho (Figura 13).



Figura 12. Micrografías de *Navicula sp.* A) 40x y B) 100X

De acuerdo con los estudios de Hernández-Almeida et al. (2014), una de las principales limitantes para el estudio de las diatomeas es su identificación taxonómica, en particular para este género, pues no presentan caracteres distintivos que ayuden con su identificación. Es por ello, que esta especie únicamente fue identificada a nivel de género, ya que en México no existen claves taxonómicas o referencias que permitan conocer las variaciones morfológicas por regiones geográficas, lo que impide realizar comparaciones entre las distintas poblaciones de una especie.

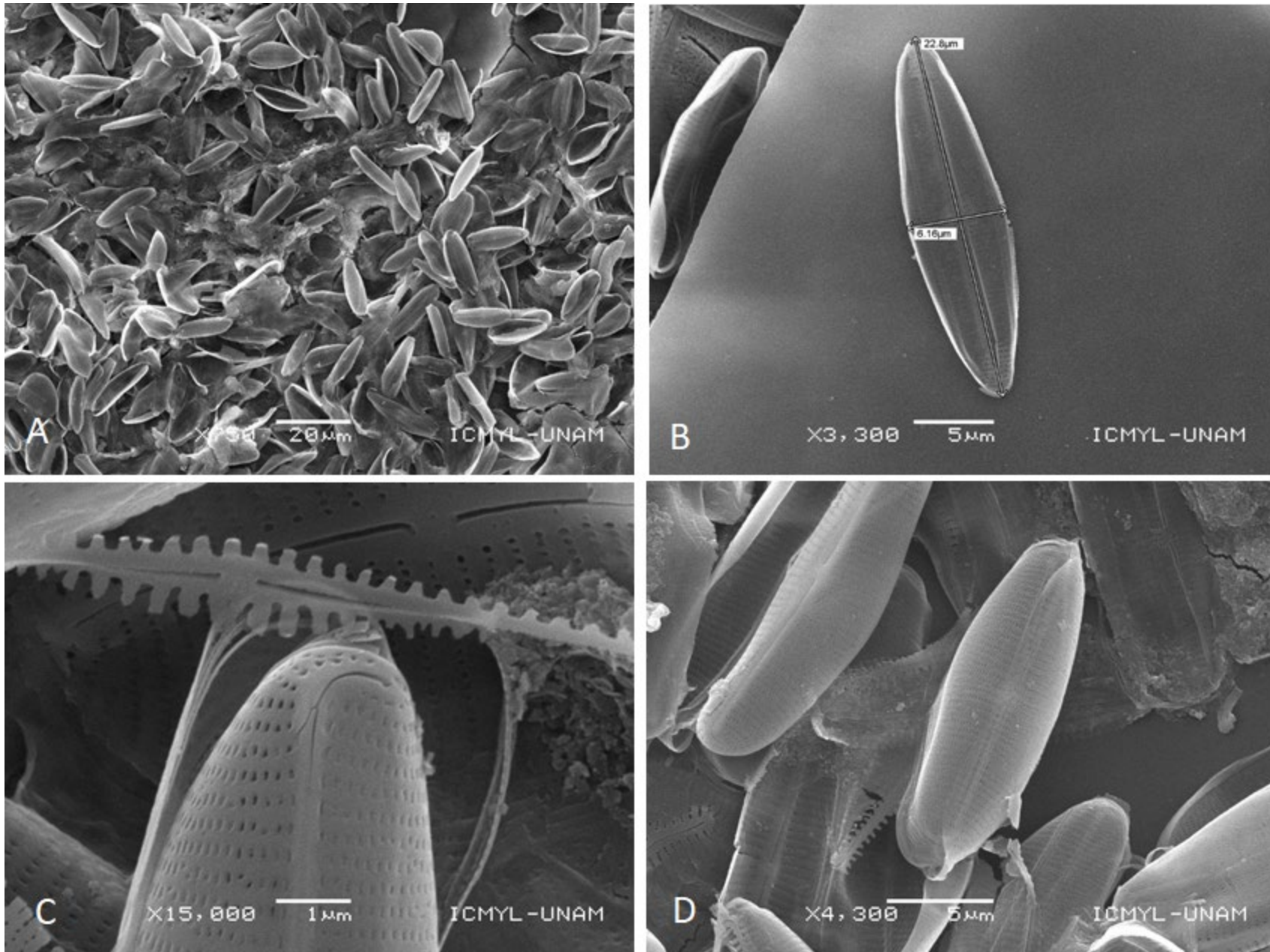


Figura 13. Micrografías de *Navicula sp.* en microscopio electrónico de barrido. A) Cultivo de diatomeas, B) longitud del rafe, C) Terminación del rafe y poros de la frústula y D) Frústulas de *Navicula sp.*

Dominio: Eukarya

Reino: Chromista

Phylum: Heterokonta

División: Bacillariophyta

Clase: Bacillariophyceae

Orden: Naviculales

Familia: Naviculaceae

Género: *Navicula sp.* (Bory, 1822)

8.3 Identificación genética de los monocultivos

Se logró extraer exitosamente el ADN de cada monocultivo, al cual se cuantificó la cantidad exacta de ADN extraído por medio de espectrofotometría (Tabla 9).

Tabla 9. Cuantificación de ADN de monocultivos

Nombre	Concentración	Absorbancia (nm)	
	ng/ μ L	260/280	260/230
Clorofita	109.4	0.89	0.34
Cianobacteria	74.8	0.95	0.29
Diatomea	73.4	0.97	0.3

Los datos obtenidos para 260/280 nm se encuentran alejados del rango 1.8-2.0 lo que nos indica que el ADN extraído de las tres muestras no está completamente puro o libre de proteínas (Thermo Scientific, 2012). En cuando a la absorbancia 260/230 nm los valores están por debajo del rango óptimo para indicar que el ADN se encuentra libre de contaminantes como solventes o sales (Matlock, 2015).

8.4 Amplificación de la región V3-V5 del gen ARNr 16S por PCR

Para la amplificación de la región V3-V5 del gen ribosomal 16S, se utilizó un volumen de reacción de 25 μ L para cada cultivo con la finalidad de optimizar las reacciones de PCR. Para la amplificación del fragmento del gen 16S se utilizaron *primers* que amplifican la región de 341 a 907 nucleótidos, con un tamaño de 566 pb (Figura 14).

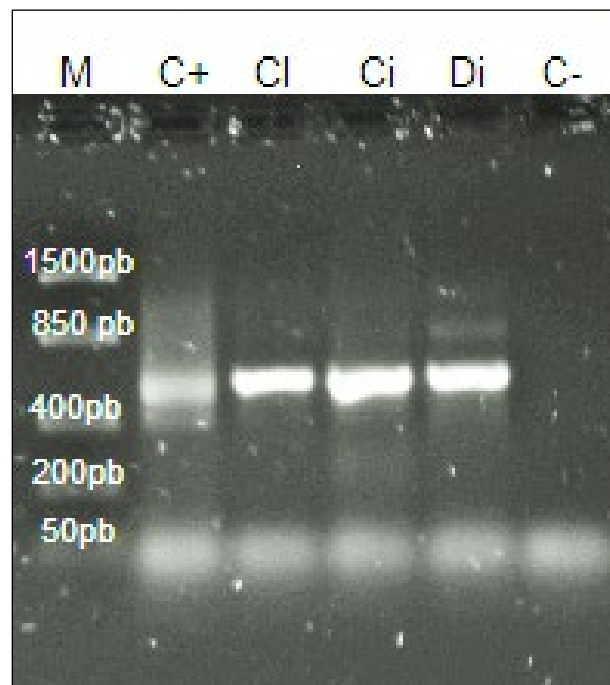


Figura 14. Productos de la amplificación por PCR de la región V3-V5 del gen ARNr 16S con un peso molecular de 566pb. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (M), carril 2: control positivo (C+), carril 3: Clorofita (Cl), carril 4: Cianobacteria (Ci), carril 5: Diatomea (Di) y carril 6: Control negativo (C-)

8.5 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

De la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, se obtuvo un total de ocho bandas (Figura 15), sin embargo, se puede observar que las bandas 4, 5, 6 y 7 se repiten en los carriles 2, 3 y 4, esto se debe a que los cultivos obtenidos son monoalgales, mas no áxenicos. Además, cabe mencionar que los *primers* utilizados son empleados para la identificación de bacterias. Es por ello por lo que se

seleccionaron aquellas bandas que no se encontraban repetidas y que se observaban con una coloración más intensa.

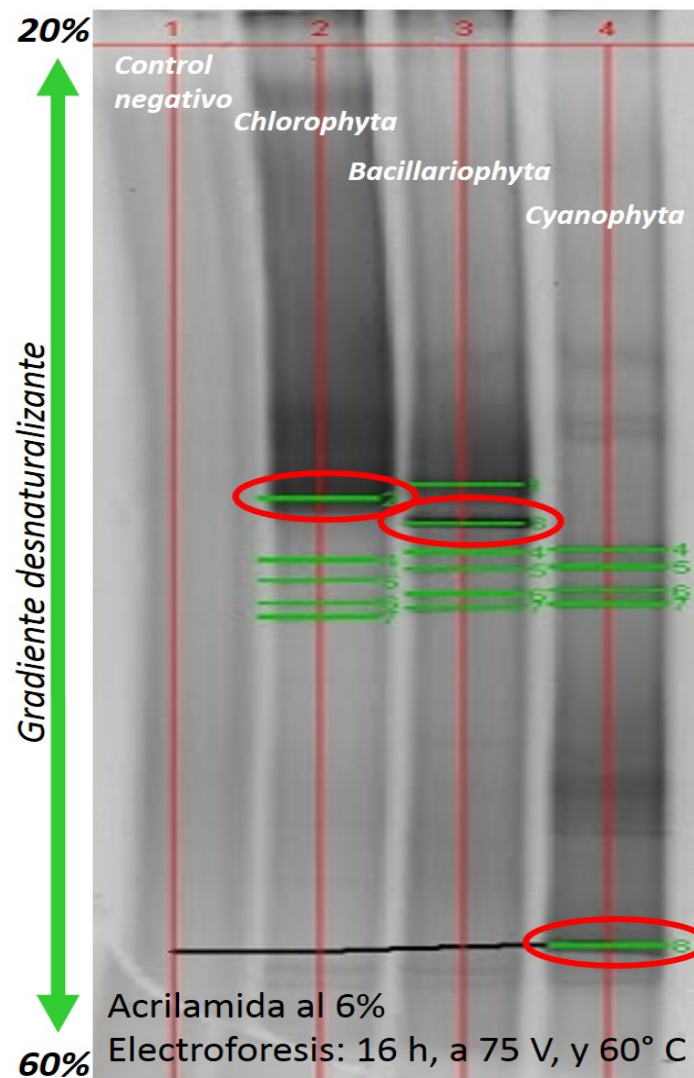


Figura 15. DGGE de grupos monoalgales. Las bandas encerradas en color rojo fueron las seleccionadas y cortadas para re-amplificarse nuevamente por PCR.

Las bandas seleccionadas fueron cortadas y eluidas en H₂O con grado para biología molecular durante 24 horas, posteriormente se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para re-amplificarlas por PCR. De acuerdo con la **Figura 17**, se puede observar la presencia de fragmento del gen, lo cual nos indica que la amplificación fue exitosa.

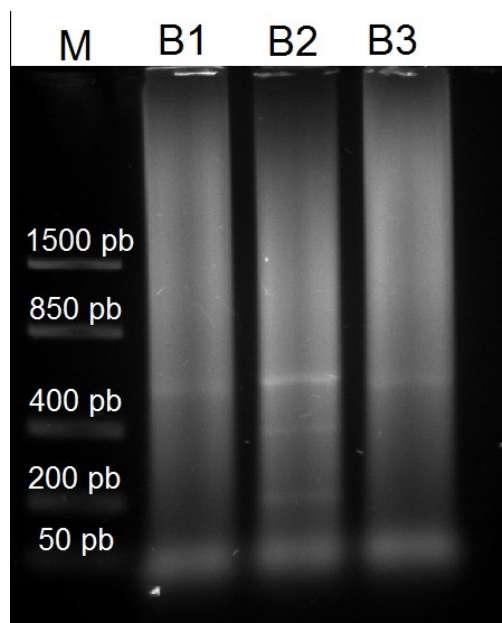


Figura 16. Productos de PCR del fragmento del gen ARNr 16S purificados. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (M), B1: banda 1, B2: banda 2 y B3: banda 3

Una vez realizada la electroforesis se procedió a purificar las bandas con el kit DNA Clean & Concentrator™-5 y posteriormente se les realizó una lectura en un Nanodrop para evaluar la concentración del gen dentro de las bandas además de su pureza (Tabla 10).

Tabla 10. Cuantificación de ADN en las bandas seleccionadas a partir del PCR-DGGE

Nombre	Concentración ng/μL	Absorbancia (nm)	
		260/280	260/230
Banda 1	84.4	1.88	1.54
Banda 2	80.3	1.86	1.91
Banda 3	73.4	1.88	2.04

Se puede observar que los datos obtenidos para 260/280nm de las bandas se encuentran dentro de los rangos 1.8-2.0, indicándonos la eliminación de proteínas. Para la absorbancia 260/230 se puede observar que únicamente la banda 3 se encuentra dentro del rango 2.0-2.5.

8.6 Secuenciación

Los resultados de las secuencias no fueron satisfactorios, ya que se esperaba la secuencia de al menos 400 pb para cada banda, y los resultados obtenidos únicamente llegaron a 100 pb.

Esto resultados nos indican que posiblemente el fragmento de ADN que se encontraba en las bandas estaba muy degradado, por lo que no fue posible secuenciar el fragmento del gel completo, por lo tanto, no se obtuvo la identificación genética de las especies de los monocultivos.

8.7 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento se realizó para cada uno de los cultivos monoalgales bajo condiciones de esterilidad, utilizando como única fuente de carbono CO₂ gaseoso a distintas concentraciones (de 8 a 12% vol.).

8.7.1 Cinética de crecimiento de *Pseudanabaena sp.*

El crecimiento de *Pseudanabaena sp.*, se realizó en botellas de boro-silicato adicionando CO₂ al 12%, durante 15 días, sin embargo, debido a su crecimiento en forma de agregados (**Figura 17**), no es posible tomar una muestra homogénea cada tercer día, por lo que se tomó una muestra inicial y otra al completar los 15 días de cultivo (muestra final). Los parámetros cuantificados pueden observarse en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Parámetros obtenidos en la cinética en botellas del cultivo de *Pseudanabaena sp.*

Parámetros	Inicial	Final
pH	7.55	9.43
SST	0.13	1.09
IC	18.734mg/L	4.045mg/L
NT	117.72mg/L	70.24 mg/L



Figura 17. Cinética de crecimiento en botellas del cultivo de *Pseudanabaena sp.*

Para la cinética en fotobiorreactor, la toma de muestras y la medición de parámetros se llevaron a cabo de la misma manera que en el caso de las botellas borosilicato (Tabla 12), ya que, debido a su crecimiento, tendió a pegarse en las paredes del fotobiorreactor (Figura 18), lo que impidió realizar la medición como se tenía planteado cada tercer día.

Tabla 12. Parámetros obtenidos en las cinéticas en fotobiorreactor tubular del cultivo de *Pseudanabaena sp.*

Parámetros	Inicial	Final
pH	7.6	8.5
SST	0.18	1.8
IC	15.304 mg/L	5.426 mg/L
NT	54.48 mg/L	41.4 mg/L

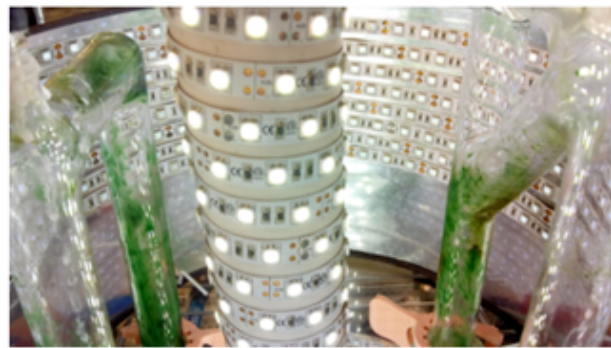


Figura 18. Cultivo de *Pseudanabaena sp.* en fotobiorreactor tubular

Los resultados obtenidos del comportamiento del cultivo, fueron similares a lo reportado por Leal et al., (2001) porque al mantener una agitación constante, la

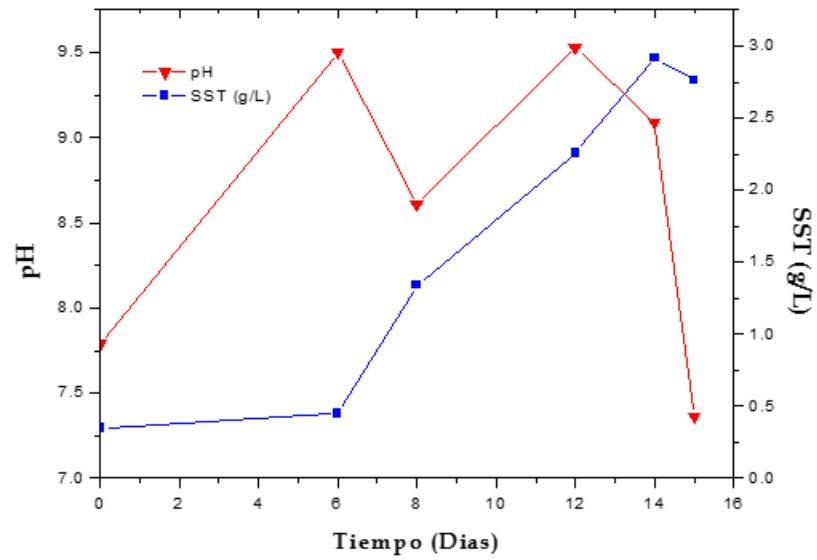
cianobacteria tendió a formar flóculos o agregados, de modo contrario, en cultivos que no contaban con agitación, el crecimiento tuvo preferencia a adherirse al fondo de los recipientes o a sus paredes, justo como lo sucedido en el fotobiorreactor tubular, lo que nos indica que el tipo de agitación por burbujeo en este experimento, no es la más favorable. Por otro lado, la velocidad de crecimiento no pudo ser calculada, debido al comportamiento que presentó solo se obtuvieron dos tomas de muestra por cada experimento.

8.7.2 Cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*

Para el caso de *Chlorella sp.* su crecimiento en botellas de boro-silicato duró de 14 días (**Figura 19 A**), generando un peso de biomasa final de 2.92g/L. En el día 15 se puede observar la disminución de concentración en la biomasa, indicando la finalización de la etapa de crecimiento. Estos valores de biomasa fueron similares a lo descrito por Ryu et al. (2012) obteniendo una concentración máxima de biomasa de 2.02 g/L después de 6 días y al haber inyectado CO_{2(g)} al 5% en el medio. Además, Sung et al. (1998) demostraron que al colocar concentraciones mayores al 15% de CO₂ en el medio de cultivo, el crecimiento es más lento ya que, a los 7 días se había alcanzado la concentración máxima de biomasa. Dichos resultados son contradictorios a los observados en el presente estudio, posiblemente se deban a que la concentración de CO₂ utilizada inhibieron el crecimiento de *Chlorella sp.*

La cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* que se realizó en el fotobiorreactor tubular, duró 7 días y tuvo una concentración de biomasa final de 4.1 g/L. En la **figura 19 B** se puede observar que las concentraciones de carbono inorgánico (CI) van disminuyendo conforme pasa el tiempo, esto nos indica que se está llevando a cabo el consumo de carbono por parte del microorganismo conforme realiza el proceso de fotosíntesis; sin embargo, el aumento de CI para el día 7, posiblemente se deba a que la inyección de CO₂ no haya sido la misma en comparación con el resto de los días.

A



B

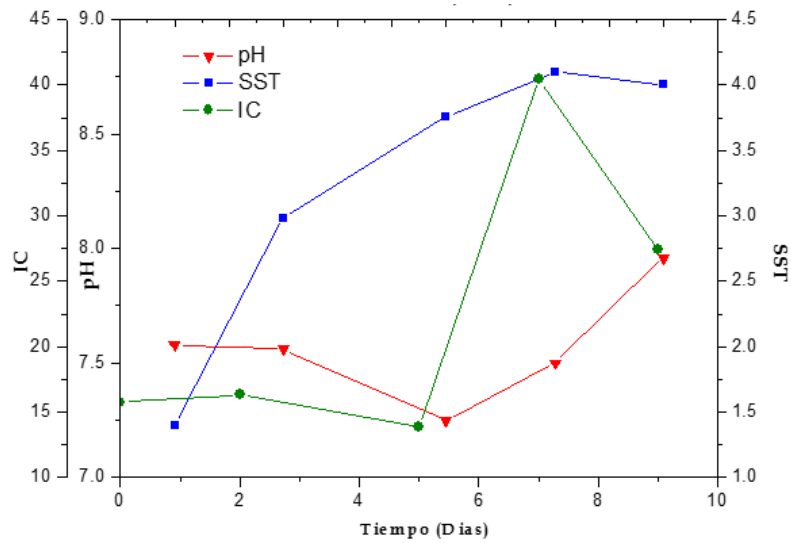


Figura 19. Cinéticas de crecimiento de *Chlorella sp.* A) Cultivo en botellas, B) Cultivo en fotobiorreactor tubular

La velocidad de crecimiento (μ) calculada en la cinética de crecimiento en las botellas de borosilicato fue de 0.156 d^{-1} . En la **figura 20** se puede observar la distribución de los datos, los cuales, mostraron una tendencia positiva y correlación estadística ($R^2 = 0.905$).

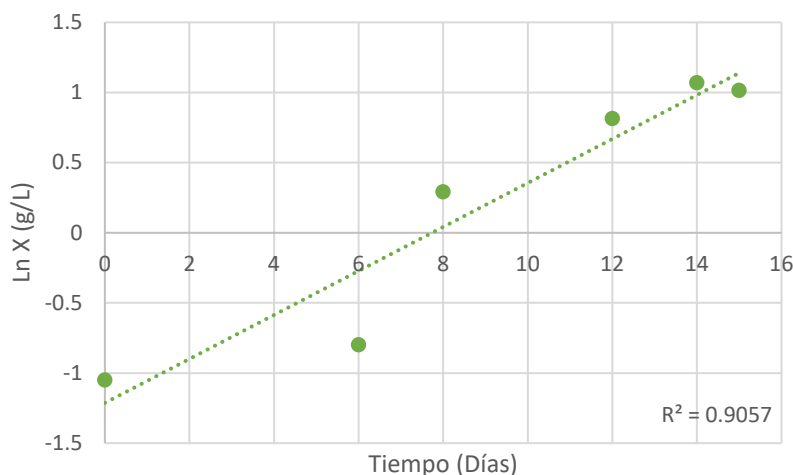


Figura 20. Velocidad de crecimiento de *Chlorella sp.* en botellas de borosilicato

En cuanto al experimento en el fotobiorreactor, se estimó una velocidad de crecimiento a lo observado en las botellas de borosilicato (0.1058 d^{-1}). En la **figura 21** se puede observar la tendencia positiva de los datos obtenidos durante la cinética de crecimiento, pero con una baja correlación estadística ($R^2 < 1$).

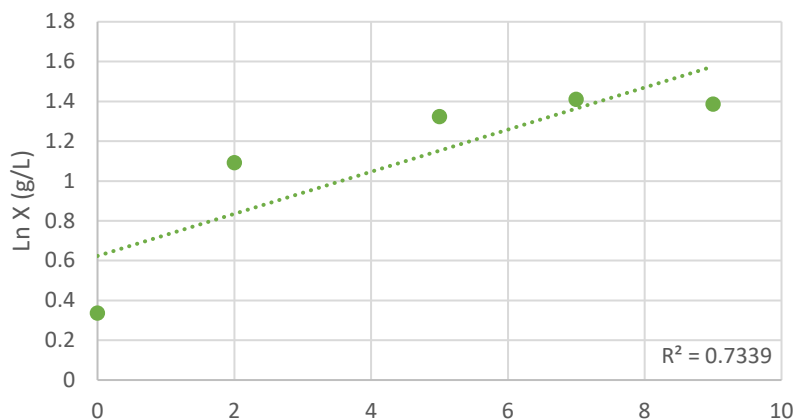


Figura 21. Velocidad de crecimiento de *Chlorella sp.* en fotobiorreactor tubular

8.7.3 Cinética de crecimiento de *Navicula sp.*

Para el caso de *Navicula* el crecimiento en las botellas de borosilicato duró 14 días, con un peso final de biomasa de 1.94 g/L en el día 11. En la **figura 22** se puede observar la disminución de concentración de CI en comparación con el cambio de pH, indicando su consumo durante el crecimiento por efecto del proceso de fotosíntesis.

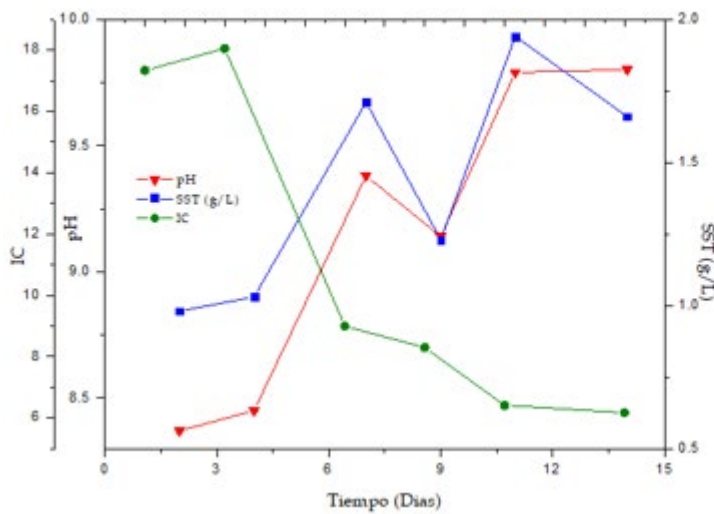


Figura 22. Cinética de crecimiento de *Navicula sp.* en botellas de borosilicato

La velocidad de crecimiento (μ) calculada para *Navicula sp.* fue de 0.050 d^{-1} . En la **figura 23** se puede observar la distribución de los datos, los cuales tienen una tendencia positiva, sin embargo, el valor de R^2 nos indica un ajuste débil entre los datos muestreados. Estudios realizados por Nevaez et al., (2016) con la diatomea *Chaetoceros muelleri* adicionando CO_2 al 3%, estimaron una velocidad de crecimiento lenta, pero una concentración de biomasa de 2.1 g/L , lo que nos indica que probablemente porcentajes mayores al 3% de CO_2 aumenten la velocidad de crecimiento, pero disminuyan la cantidad de biomasa.

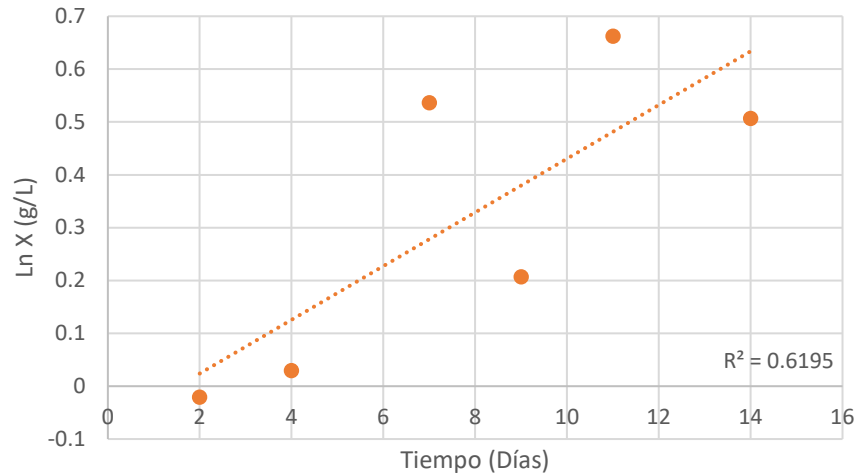


Figura 23. Velocidad de crecimiento de *Navicula sp.* en botellas

Para el experimento en el fotobiorreactor con una concentración de CO₂ al 12%, *Navicula sp.* no tuvo el mismo comportamiento que en las botellas de borosilicato, pues se adhirió a las paredes del fotobiorreactor (**Figura 24**). Por lo que la cuantificación de su crecimiento fue la similar a *Pseudanabaena sp.* (**Tabla 13**)

Tabla 13. Parámetros obtenidos de la cinética en fotobiorreactor del cultivo de *Navicula sp.*

Parámetros	Inicial	Final
pH	7.6	9.5
SST	0.19	1.6
IC	16.873 mg/L	4.565 mg/L
NT	55.72 mg/L	13.056 mg/L



Figura 24. Cultivo de *Navicula sp.* en fotobiorreactor

Los resultados obtenidos nos indican que si hubo crecimiento, pues se registró un aumento del pH además de una disminución en CI y NT, lo que también nos indica que el cultivo no tuvo una deficiencia de nutrientes, sin embargo, la dinámica que describió sea una consecuencia de la agitación que es empleada en el

fotobiorreactor, ya que la cinética que se llevó a cabo en las botellas no se pegó en las paredes, pues el tipo de agitación era de tipo orbital.

En cuanto a la velocidad de crecimiento no pudo ser calculada, ya que solo se obtuvieron dos muestreos en esta cinética.

8.7.4 Productividad

Los resultados obtenidos de productividad para cada uno de los cultivos mostraron que las dinámicas de crecimiento en el fotobiorreactor tuvieron una mayor productividad en comparación con las botellas de borosilicato (**Figura 25**).

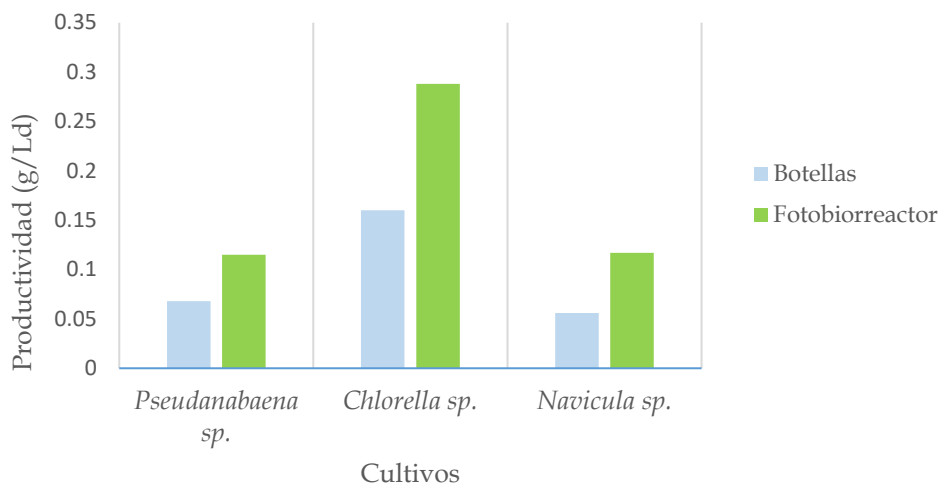


Fig. 25. Productividad medida en los tres cultivos obtenidos crecidos en botellas de borosilicato y en fotobiorreactor tubular.

El monocultivo de *Chlorella sp.* en el fotobiorreactor fue el que obtuvo la mayor productividad (0.288 g/L d), sin embargo, en comparación con los estudios realizados por Eloka-Eboka y Inambao (2017) con *Chlorella vulgaris*, obtuvieron un total de 0.842 g/L d, contradicen los resultados obtenidos en el presente estudio, lo cual, puede ser un efecto del tipo de fotobiorreactor utilizado (cilíndrico cerrado). En cuanto al resto de los cultivos, se puede observar que la mayor productividad se llevó a cabo en el fotobiorreactor, a pesar de presentar un comportamiento diferente.

9 CONCLUSIONES

Se obtuvieron tres monocultivos con diferentes colores y cinéticas de crecimiento. La técnica de siembra en placa de agar resultó ser útil para poder aislar diferentes tipos de especies de fitoplancton, debido a las condiciones nutricionales de esterilidad, que hicieron posible crecer y escalar los aislados como monocultivos.

Mediante la caracterización morfológica a nivel de microscopio fue posible verificar que se trataban de diferentes tipos de microorganismos. El uso del microscopio electrónico de barrido fue de mucha ayuda para el caso de *Navicula sp.*, además de que es necesario contar con claves taxonómicas, sin embargo, México no cuenta con claves dicotómicas del registro de sus especies, por lo que a veces resulta imposible identificar los taxones únicamente utilizando características morfológicas.

Las cinéticas de crecimiento demostraron que, los tres monocultivos, el cultivo de *Chlorella sp.* fue el más rápido de crecimiento en fotobiorreactores tubulares, ya que aumenta casi el doble la concentración máxima obtenida de biomasa. Por otro lado, los monocultivos de *Pseudanabaena sp.* y *Navicula sp.* no tuvieron un buen rendimiento en su crecimiento en el fotobiorreactor tubular, por influencia del modelo del equipo y por las condiciones de agitación.

10 PERSPECTIVAS

Para que la caracterización molecular nos de mejores resultados, es necesario amplificar y secuenciar otros genes que codifiquen para el RNA 18S y 28S o SSU, LSU o ITS para el caso de organismos eucariotas utilizando diferentes oligonucleótidos. Para el caso de organismos procariotas, como el caso de las cianobacterias, la secuenciación de otras regiones del gen 16S nos puedan ayudar para una identificación mejor de las especies.

Otra herramienta necesaria para reforzar la identificación de las especies, se deberán realizar pruebas bioquímicas, así como hacer revisiones estructurales.

Para su uso biotecnológico, sería importante identificar, cuantificar y extraer productos de valor agregado para seleccionar aquellos que pueden ser útiles para el ser humano, además de probar el uso de otro de tipo de fotobiorreactores para favorecer el crecimiento de las especies y poder aprovecharlas mejor para el tratamiento de emisiones gaseosas.

11 REFERENCIAS

1. Abbayes, H., Chadefau M., Feldmann J., Ferré Y., Gausсен H., Grassé P. y Prévot A. R. 1989. Botánica, vegetales inferiores. Editorial Reverté. Barcelona
2. Abinandan, S. and Shanthakumar S. 2015. **Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews 52, 123–132
3. Acinas, G. S., Haverkamp H. A. T., Huisman J. and Stal J. L. 2009. **Phenotypic and genetic diversification of Pseudanabaena spp. (cyanobacteria).** *The ISME Journal* volumen 3, 31–46.
4. Ainas, M., Hasnaoui S., Bouarab R., Abdi N., Drouiche N. and Mameri N. 2017. **Hydrogen production with the cyanobacterium *Spirulina platensis*.** International Journal of Hydrogen Energy 42, 4902 – 4907.
5. Anbalagan, A., Toledo-Cervantes, A., Posadas, E., Rojo, E. M., Lebrero, R., Gonzalez-Sanchez, A., Nehrenheim, E., Muñoz, R. 2017. **Continuous photosynthetic abatement of CO₂ and volatile organic compounds from exhaust gas coupled to wastewater treatment: Evaluation of tubular algal-bacterial photobioreactor.** *Journal of CO₂ Utilization*, 21, 353–359.
6. Andersen, R. A. 2005. **Algal culturing techniques.** Elsevier Academ Press.
7. Angelidaki, I., Treua L., Tsapekosa P., Luoc G., Campanarob S., Wenzeld H., Kougiasa P.G. 2018. **Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives.** Biotechnology Advances Vol. 36. Pages 452–466
8. Aoki, J., Kawamata T., Kodaka A., Minakawa M., Imamura N., Tsuzuki M. and Asayama M. **Biofuel production utilizing a dual-phase cultivation system with filamentous cyanobacteria.** Journal of Biotechnology. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.011>

9. Arrieta-Bolaños, E. R. 2008. **Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas.** Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, Volumen 14, N.º 1
10. Balech, E. y Ferrando H. 1964. **Fitoplancton marino.** Editorial Universitaria de Buenos Aires.
11. Becker, E. W. 1994. **Microalgae: Biotechnology and microbiology.** Cambridge University Press.
12. Beer, S., Björk M. and Beardall J. 2014. Photosynthesis in the marine environment. 2ª edición. Wiley Blackwell. USA.
13. Berenguel, M., Rodríguez F., Acien F. G. and García J. L. 2003. **Model predictive control of pH in tubular photobiorreactors.** Journal of Process Control 14, 377-387.
14. Borowitzka, M. 2018. **Microalgae in Health and Disease Prevention.** IN: Chapter 3 Biology of Microalgae. Eds. Levine, I. y Fleurence, J. Academic Press, 23-72.
15. Bukaveckas, P. A., Franklin R., Tassone S., Trache B. y Egerton T. 2018. **Cyanobacteria and cyanotoxins at the river-estuarine transition.** Harmful Algae 76, 11-21
16. Butler, J. 2011. **Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology.** Elsevier Academic Press.
17. Carmona, J., Hernández M. A. y Ramírez M. 2004. **Algas... Glosario Ilustrado.** 1ra Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
18. Coca, M., Barrocal V. M., Lucas S., González-Benito G. and García-Cubero M. T. 2015. **Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media.** Food and Bioproducts Processing 94, 306-312

19. Collins, L., Alvarez D. and Chauhan A. 2014. **Phycoremediation Coupled with Generation of Value-Added Products**. Microbial Biodegradation and Bioremediation. Chapter 15, 341-387
20. Cooper, G. M. y Hausman R. E. 2008. **La célula**. 4ª Edición. Marbán Libros. Barcelona.
21. Curtis, H., Barnes N. S., Schneck A. y Massarini A. 2008. **Biología**. 7ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
22. D' Alessandro, E. B. and Antoniosi-Filho N. R. 2016. **Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews 58, 832–841
23. De los Cobos-Vasconcelos, D., Garcia-Cruz E. L., Franco-Morgado M. and González-Sánchez, A. 2016. **Short-term evaluation of the photosynthetic activity of an alkaliphilic microalgae consortium in a novel tubular closed photobioreactor**. J Appl Phycol 28, 795–802.
24. De Tommasi, E., Gielis J. and Rogato A. 2017. **Diatom frustule morphogenesis and function: a multidisciplinary survey**. Marine Genomics 35, 1–18
25. Eliáš, M., Amaral R., Fawley K. P., Fawley M. W., Němcová Y., Neustupa J., Přibyl P., Santos L. M. A. and Ševčíková T. 2017. **Eustigmatophyceae**. In Archibald J. M. Simpson A., Slamovits C. H. **Handbook of the Protists**. 2ª Ed. Springer International Publishing. Cham, Suiza.
26. Eloka-Eboka, A. C. and Inambao F. L. 2017. **Effects of CO2 sequestration on lipid and biomass productivity in microalgal biomass production**. Applied Energy 195, 1100–1111
27. Esqueda-Lara, K. 2003. **Fitoplancton de red del litoral de Jalisco y Colima en el ciclo anual 2001-2002**. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Jalisco.
28. Falkowski, P. G. and Knoll A. H. 2007. **Evolution primary producers in the sea**. Elsevier Academic Press. London.

29. Franco-Morgado, M., Alcántara, C., Noyola, A., Muñoz, R., & González-Sánchez, A. 2017. **A study of photosynthetic biogas upgrading based on a high rate algal pond under alkaline conditions: Influence of the illumination regime.** *Science of the Total Environment*, 592, 419-425.
30. Franco-Morgado, M. 2018. **Tratamiento integral de biogás y nutrientes residuales de la digestión anaerobia en un fotobiorreactor alcalino.** Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
31. Gárate-Lizárraga, I., C.J. Band-Schmidt, F. Aguirre Bahena and T. Grayeb-del Alamo. 2009. **A multi-species microalgae bloom in Bahia de La Paz, Gulf of California, Mexico.** *Oceánides* 24: 15-29.
32. Giovannoni, S. J., Turner S., Olsen G. J., Barns S., Lane D. J. y Pace N. R. 1988. **Evolutionary Relationships among Cyanobacteria and Green Chloroplasts.** *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. American Society for Microbiology. Vol. 170, No. 8. p. 3584-3592
33. Gómez-Aguirre, S., Licea S. y Gómez S. 2004. **Proliferaciones de Pseudo-nitzschia spp. (Bacillariophyceae) y otras especies del microplancton en la Bahía de Mazatlán, México.** *Rev. Biol. Trop.* 52: 69-76
34. Granada-Moreno, C. I., Aburto-Medina A., De los Cobos Vasconcelos D. and González-Sánchez A. 2017. **Microalgae community shifts during the biogas upgrading in an alkaline open photobioreactor.** *Journal of Applied Microbiology* 123, 903 – 915.
35. Grant, W. 2006. **Alkaline environments and biodiversity.** In: Gerdan C. and Glansdoff N. (Eds). *Extremophiles. Encyclopedia of Life Support System.* Eolss Publishers. Oxford, Inglaterra.
36. Guiry, M. D. en Guiry, M. D. and Guiry G. M. 2018. *AlgaeBase*. Publicación electrónica mundial, Universidad Nacional de Irlanda, Galway. <http://www.algaebase.org>; Buscado el 03 de noviembre de 2018.

37. Harrison, R. M. 2003. **El medio ambiente, Introducción a la química medioambiental y a la contaminación.** Edit. Acribia. S.A. Zaragoza.
38. Hasle, G. r y Syvertsen E. E. 1997. **Marine Diatoms.** En Tomas C. R. *Identifying Marine Phytoplankton.* Elsevier. Academic Press. USA.
39. Heimann, K. and Huerlimann R. 2015. **Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species.** In: Kim S. **Handbook of marine microalgae, Biotechnology advances.** Academic Press Elsevier. Pukyong National University, Busan, South Korea.
40. Henrard, A. A., De Morais M. G. and Costa J. A. V. 2011. **Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium sp.*** *Bioresource Technology* 102, 4897–4900
41. Hernández-Almeida, O. U., López-Fuerte F. O., Herrera-Silveira J. A. y Aldana-Aranda D. 2014. **Primer registro de la diatomea *Navicula lusoria* para México y el Mar Caribe.** *Hidrobiológica*, 24 (3): 281-286
42. Hernández-Becerril, D. U. Alonso-Rodríguez R., Álvarez-Góngora C., Barón-Campis S., Ceballos-Corona G., Herrera-Silveira J., Meave Del Catillo M. E., Juarez-Ruiz N., Merino-Virgilio F., Morales-Blake A., Ochoa J. L., Orellana-Cepeda E., Ramírez-Camarena C. and Rodríguez-Salvadors R. 2007. **Toxic and harmful marine phytoplankton and microalgae (HABs) in Mexican Coasts.** *Journal of Environmental Science and Health.* Part A. **42**, 1349–1363
43. Hernández-Becerril, D.U. y J. Salazar Paredes. 2012. **Biodiversidad del microfitoplancton marino en la zona económica exclusiva limítrofe del Pacífico central mexicano.** Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. HJ005. México.
44. Hernández-Becerril, D. U. 2014. **Biodiversidad de algas planctónicas marinas (Cyanobacteria, Prasinophyceae, Euglenophyta, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatophyceae,**

- Parmophyceae, Raphidophyceae, Bacillariophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinoflagellata) en México.** Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: S44-S53.
45. Jiménez, L. F. y Merchant H. 2003. **Biología celular y molecular.** Primera edición. Pearson Educación. México.
46. Karp, G. 2009. **Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos.** 5ª Edición. Mc Graw Hill. México.
47. Lang-Yona, N., Kunert A. T., Voger L., Kampf C. J., Bellinghausen I., Saloga J., Schink A., Ziegler K., Lucas K., Schuppan D., Pöschl U., Weber B y Fröhlich-Nowoisky J. 2018. **Fresh water, marine and terrestrial cyanobacteria display distinct allergen characteristics.** Science of the Total Environment 612, 767-774
48. Lee, R. E. 2008. **Phycology.** Cambridge University Press. New York.
49. Lee, E., Jalalizadeh M. and Zhang Q. 2015. **Growth kinetic models for microalgae cultivatio: A review.** Algal Research 12, 497-512
50. Leal, M., Ortiz N., Mora R., Ruiz G., Perona E y Morales E. 2001. **Caracterización de la cianobacteria Pseudanabaena galeata a diferentes condiciones de cultivo.** Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. 35(3) 223 - 241
51. Liu, J. and Chen F. 2014. **Biology and Industrial Applications of Chlorella: Advances and Prospects.** Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 153: 1-35
52. Liu, X., Ying K., Chen G., Zhou C., Zhang W., Zhang X., Cai Z., Holmes T and Tao Y. 2017. **Growth of Chlorella vulgaris and nutrient removal in the wastewater in response to intermittent carbón dioxide.** Chemosphere 186, 977-985
53. López-Magaña, J.L., Manzano-Sarabia M. M., Hurtado-Oliva M. A., Piña-Valdez P., Hernández-Almeida O. U., Guzón-Zatarain O. y Hernández

- Sandoval F. E. 2016. **Fitoplancton: pequeños centinelas del océano.** Revista *Ciencia*.
54. Lundholm, N., Krock B., John U., Skov J., Cheng J., Pančić M., Wohlrab S., Rigby K., Nielsen T. G., Selande E., Harðardóttir S. 2018. Induction of domoic acid production in diatoms- Types of grazers and diatoms are important. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.06.005>
55. Madigan, M., Martinko J. M. y Parker J. 2004. Brock, **Biología de los microorganismos.** 10ª Edición. Pearson.
56. Maile, O. I., Tesfagiorgis H. and Muzenda E. 2017. **The potency of monoethanolamine in biogás purification and upgrading.** South African Journal of Chemical Engineering. Vol. 24. Pages 122-127
57. Manahan, S. E. 2006. Introducción a la química ambiental. Reverté ediciones. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
58. Masters, G. M. Y Ela W. P. 2008. **Introducción a la ingeniería medioambiental.** 3ª Edición. Pearson Educación. Madrid.
59. Márquez, J., Collazo M., Martínez M., Orozco A., Vázquez S. 2013. **Biología de las angiospermas.** Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
60. Meave-del Castillo, M. E., Zamudio-Resendiz M. E. y Castillo-Rivera, M. 2012. **Riqueza fitoplanctónica de la Bahía de Acapulco y zona costera aledaña, Guerrero.** México. *Acta botánica mexicana*, (100), 405-487.
61. Mosquera, K., Oliveira L. and Vieira J. A. 2018. **Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile.** Bioresource Technology 249, 168-174.
62. Moenne, A., González A. and Sáez C. A. 2016. **Mechanisms of metal tolerance in marine macroalgae, with emphasis on copper tolerance in Chlorophyta and Rhodophyta.** Aquatic Toxicology 176, 30-37
63. Muyzer, G., De Wall E. C. y Uitterlinden A. G. 1993. **Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis**

- Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA.** Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, No. P. 695-700
64. Nachwachsende, F. 2010. **Guía sobre el biogás. Desde su producción hasta el uso.** FNR, Abt. Öffentlichkeitsarbeit
65. Nelson, D., y Cox M. 2009. **Lehninger. Principios de bioquímica.** 5ª edición. Omega. Barcelona.
66. Not, et al. 2012. **Diversity and Ecology of Eukaryotic Marine Phytoplankton.** Advances in Botanical Research.
67. Ochoa C. D. C. y Montoya R. A. 2010. Consorcio microbianos: Una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. Rev. Fac. Cienc. Econ. Vol. XVIII (2), 55-74
68. Oliva-Martínez, M. G., Godínez-Ortega J. L. y Zúñiga-Ramos C. A. 2014. **Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México.** Revista Mexicana de Biodiversidad. Supl. 85: S54-S61
69. Olivas, E. E. y Alarcón L. R. 2004. **Manual de prácticas de microbiología básica y microbiología en alimentos.** Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México.
70. Oren, A. 2013. **Cyanobacteria: biology, ecology and evolution.** En Sharma N. K., Rai A. K. y Stal L.J. **Cyanobacteria: An economic perspective.** 1ª Edición. JohnWiley & Sons.
71. Ozkan, A. and Rorrer G. L. 2017. **Effects of CO2 delivery on fatty acid and chitin nanofiber production during photobioreactor cultivation of the marine diatom *Cyclotella sp.*** Algal Research 26, 422-430
72. Pandey, L. K, Bergey E. A., Lyu J., Park J., Choi S., Lee H., Depuydt S., Oh Y., Lee S. y Han T. 2017. **The use of diatoms in ecotoxicology and bioassessment: Insights, advances and challenges.** Water Research 118, 39-58.

73. Pandey, L. K., Sharma Y. C., Park J., Choi S., Lee H., Lyu J. y Han T. 2018. **Evaluating features of periphytic diatom communities as biomonitoring tools in fresh, brackish and marine waters.** *Aquatic Toxicology* 194, 67-77
74. Pereira-da-Silva, M. A. and Ferri F. A. 2017. **Scanning electron microscopy.** Chapter 1. In: Da Róz A. L., Ferreira M., Leite F. L. and Oliveira O. N. *Nanocharacterization Techniques.* Applied Science Publishers, Elsevier.
75. Pereira, F. M., Loures C. C. A., Amaral M. S., Gomes F. M., Pedro G.A., Machado M. A. G., Reis C. E. R and Silva M. B. 2018. **Evaluation of fatty acids production by *Chlorella minutissima* in batch bubble-column photobioreactor.** *Fuel* 230, 155-162.
76. Prin, J.L., González N., Villarroel H., Ramírez M. y De Gáscue B. 2012. **El secado de punto crítico (SPC) como técnica aplicada en la preparación de geles de poliacrilamida por microscopía electrónica de barrido.** *Rev. LatinAm. Metal. Mat.;* S5: 20-23
77. Raymont, J. E. G. **Plankton and productivity in the oceans.** 2nd. Ed. Pergamon Press. Oxford, England.
78. Rezvani, F., Ardestani F. and Najafpour G. 2017. **Growth kinetic models of five species of lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture.** *Brazilian Journal of microbiology* 48, 251-258
79. Rosenberg, E. 2017. **DNA Sequencing and PCR.** Chapter 8. In: **It's in your DNA.** Academic Press.
80. Ruiz-Martínez, A., García N. M., Romero I., Seco A. and Ferrer J. 2012. **Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent.** *Bioresource Technology* 126, 247-253
81. Ryu, H. J., Oh K. K. y Kim Y. S. 2009. **Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate.** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 15, 471-475

82. Sabater, S. 2009. **Diatoms. Algae (Incl. Cynobacteria) /Diatoms.** University of Girona. Elsevier.
83. Salinas Callejas, E. y Gasca-Quezada V. 2009. **Los biocombustibles. El cotidiano.** Universidad Nacional Autónoma Metropolitana. 75-82
84. Santoyo, H. 1974. **Fitoplancton otoñal en la región de San Blas, Nayarit (1971).** Revista Latinoamericana de Microbiología 16: 155-161.
85. Sathasivam, R., Radhakrishnan R., Hashem A. and Abd_Allah E. F. 2017. **Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine.** Saudi Journal of Biological Sciences.
86. Scarlat, N., Dallemand J. F. and Fahl F. 2018. **Biogas: Developments and perspectives in Europe.** Renewable Energy 129. 457-472
87. Serrato, A. D., Flores Ll. R. Aportela J. C. y Sierra E. P. 2014. **PCR: reacción en cadena de la polimerasa.** En: Cornejo Q. R., Serrato A. D., Rendón B. A. y Rocha M. G. M. **Herramientas moleculares aplicadas en la ecología. aspectos teóricos y prácticos.** SEMARNAT, INECC y UAM.
88. Shubert, E. and Gärtner G. 2016. **Nonmotile Coccoid and Colonial Green Algae. Chapter 7.** In: Wehr J. D., Sheath R. G. and Kociolek J. P. **Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification.** Academic Press, Elsevier. USA.
89. Shumbulo-Shuba, E. and Kifle D. 2018. **Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews 81, 743-755
90. Simon, N., Cras N.L., Foluon E. y Lemée R. 2008. **Diversity and evolution of marine phytoplankton.** C. R. Biologies 332 159-170
91. Sliwinska-Wilczewska, S., Maculewicz J., Tuszer J., Dobosz K., Kulasa D. and Latała A. 2017. **First record of allelopathic activity of the picocyanobacterium *Synechococcus* sp. on a natural plankton community.** Ecohydrology & Hydrobiology 17, 227-234
92. Solarte, M. A., Moreno L. y Melgarejo L. M. 2010. **Fotosíntesis y pigmentos**

- fotosintéticos. En. Experimentos de fisiología vegetal. 1ª. Edición. Universidad Nacional de Colombia.
93. Sosa-Avalos, R., Gaxiola-Castro G., Olivs-Ortiz A y Silva-Iñiguez L. **Nutrientes inorgánicos y producción del fitoplancton en una laguna costera subtropical de México.** Revista de Biología Marina y Oceanografía Vol. 48, N°1: 143-154
 94. Spijkerman E., De Castro F. and Gaedke U. 2011. Independent Colimitation for Carbon Dioxide and Inorganic Phosphorus. PLoS One 6 (12)
 95. Stabili, L., Acquiaviva M. I., Biandolino F., Cavallo R. A., De Pascali S. A., Fanizzi F. P., Narracci M., Cecere E. and Petrocelli A. 2014. **Biotechnological potential of the seaweed *Cladophora rupestris* (Chlorophyta, Cladophorales) lipidic extract.** New Biotechnology Volume 31, Number 5
 96. Stanier, R. Y., Ingraham J. L., Wheelis M. L. y Painter P. R. 1992. **Microbiología.** 2ª Edición. Editorial Reverté. Barcelona.
 97. Stephenson, F. H. 2010. **The polymerase chain reaction (PCR).** Chapter 8. In: **Calculations for Molecular Biology and Biotechnology.** 2nd Edition. Academic Press.
 98. Sung, K. D., Lee J. S., Shin C. S., Park S. C. and Choi M. J. 1998. **CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics.** Biorexmrce Technology 68, 269-273
 99. Taylor, M. T. 2009. Algae. Chapter 4. In: Taylor L. and Krings M. Paleobotany. 2da Ed. Academic Press.
 100. Thermo Scientific. 2012. Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. T123 Technical bulletin. 302-479-7707
 101. Matlock B. 2015. Assessment of nucleic acid purity. Thermo Fisher Scientific. Technical Note 52646. USA.
 102. Tortora, F., Funke B. y Case C. 2007. **Introducción a la microbiología.** 9ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

103. Troschl, C., Meixner K., Fritz I., Leitner K., Palacios-Romero A., Kovalcik A., Sedlacek P. and Drosig B. 2018. **Pilot-scale production of poly- β -hydroxybutyrate with the cyanobacterium *Synechocystis sp.* CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor.** Algal Research 34, 116-125.
104. Van Den Hoek, C., Mann D. G. y Jahns H. M. 1995. **Algae: an introduction to phycology.** Cambridge University Press.
105. Vincent, W. F. 2009. **Cyanobacteria. Protists, Bacteria and Fungi: Planktonic and Attached.** Elsevier.
106. Xue, Y., Zhao P., Quan C., Zhao Z. Gao W., Li J., Zu X., Fu D., Feng S., Bai X., Zuo Y. y Li P. 2018. **Cyanobacteria-derived peptide antibiotics discovered since 2000.** Peptides 107, 17-24.
107. Zamora-Barrios, C. A., Nandini S. and Sarma S. S. S. 2017. **Effect of crude extracts from cyanobacterial blooms in Lake Texcoco (Mexico) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera).** Toxicon 139, 45-53.

ANEXOS

11.1 Protocolo de extracción de ADN

ZR Plant/Seed DNA MicroPrep™

Antes de empezar

- 1) Agregar 150 mg de muestra al tubo **“ZR Bashing Bead Lysis”** y agregar 750 μL de solución de lisis.
- 2) Centrifugar el tubo **“ZR Bashing Bead Lysis”** a 10,000 rpm durante 1 minuto.
- 3) Transferir 400 μL de sobrenadante al tubo **“Zymo-Spin IV Spin Filtres”** a un tubo de colecta y centrifugar a 7,000 rpm durante 1 minuto.
- 4) Agregar 1,200 μL del buffer **“Plant/Seed DNA Binding”** al filtrado que se encuentra en el tubo de colecta obtenido del paso 4, y mezclar.
- 5) Transferir 800 μL de la mezcla obtenida al tubo **“Zymo-Spin IC column”** en un nuevo tubo de colecta y centrifugar a 10,000 rpm durante 1 min.
- 6) Descartar el líquido del tubo de colecta y repetir el paso 5.
- 7) Agregar 200 μL del buffer **“DNA Pre-Wash”** al tubo **“Zymo-Spin IC column”** en un nuevo tubo de colecta y centrifugar a 10,000 rpm durante 1 minuto
- 8) Agregar 500 μL del buffer **“Plant/Seed DNA Wash”** al **“Zymo-Spin IC column”** y centrifugar a 10,000 rpm durante 1 min.
- 9) Transferir el tubo de **“Zymo-Spin IC column”** a un microtubo de 1.5 mL y agregar 25 μL de H_2O grado molecular directamente a la matriz de la columna.
- 10) Centrifugar a 10,000 rpm durante 30 seg.
- 11) Transferir el DNA diluido del paso 10 al tubo **“Zymo-Spin IV- μHRC ”** (previamente preparado) en un microtubo nuevo y centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min.

11.2 Protocolo de purificación de fragmentos de ADN

DNA Clean & Concentrator™-5

Antes de empezar: Agregar 24 mL de etanol al 100% al bufer “DNA Wash” concentrado. Agregar 96 mL de etanol al 100% nuevamente al bufer “DNA Wash” de con ahora un volumen de 24 mL.

- 1) En un tubo de 1.5 mL, llenar de 2 a 7 partes de bufer “DNA Binding” hasta cubrir la muestra de DNA (ver cuadro) y agitar.

Aplicación	Bufer DNA Biding : Muestra	Ejemplo
Plásmidos, ADN genómico (>2kb)	2:1	200µL : 100µL
Productos de PCR, fragmento de ADN	5:1	500µL : 100µL
ssDNA	7:1	700µL : 100µL

- 2) Transferir la mezcla al tubo “Zymo-Spin™” en un tubo de colecta.
- 3) Centrifugar por 30 segundos y descartar el sobrenadante.
- 4) Agregar 200 µL del bufer “DNA Wash” en la columna. Centrifugar por 30 segundos y repetir este paso.
- 5) Agregar ≥ 6 µl de bufer “DNA Elution” o agua directamente en la matriz de la columna y dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml y centrifugar por 30 segundos para la elución del ADN.

El ADN ultra puro está listo para usarse.