



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EFEECTO DEL CONSUMO DE NITRÓGENO DE LA
MICROALGA *Desmodesmus communis* SOBRE LA
COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA, PRODUCTIVIDAD
DE LA BIOMASA, COMUNIDAD BACTERIANA Y
LONGITUD DE LOS TELÓMEROS**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Jessica Guadalupe Elias Castelo

La Paz, Baja California Sur, mayo 2018.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 26 del Mes de abril del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto del consumo de nitrógeno de la microalga *Desmodesmus communis* sobre la composición bioquímica, productividad de la biomasa, comunidad bacteriana y longitud de los telómeros"

Presentada por la alumna:

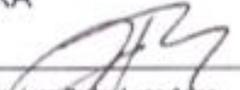
Jessica Guadalupe Elias Castelo

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

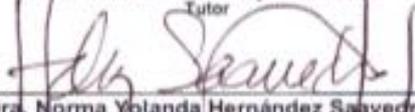
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Co-Director


Dr. Juan Pedro Luna Arias
Co-Director


Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Comité tutorial

Co-Director de tesis Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega - CIBNOR

Co-Director de tesis Dr. Juan Pedro Luna Arias - CINVESTAV

Tutor de tesis Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes - CIBNOR

Comité revisor

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dr. Juan Pedro Luna Arias

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Jurado de examen

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dr. Juan Pedro Luna Arias

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

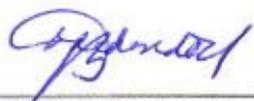
Suplente

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Resumen

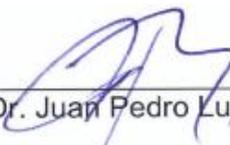
Las microalgas son organismos fotosintéticos que contienen clorofila y acumulan compuestos de interés biotecnológico. En condiciones de estrés como la disminución de la concentración de nitrógeno en el medio, incrementan la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO causan daño a biomoléculas como los lípidos, el ADN y sus telómeros, siendo estos responsables de la senescencia celular. La ausencia de daño estructural se debe a moléculas con capacidad antioxidante como los carotenoides. En el presente trabajo se evaluó el efecto del consumo de nitrógeno en el medio de cultivo y nitrógeno elemental interno así como sus razones isotópicas durante el crecimiento *Desmodesmus communis* sobre la tasa de crecimiento, productividad de la biomasa, la composición bioquímica, comunidad bacteriana y longitud de los telómeros. Las condiciones de cultivo batch fueron: medio F/2, fotoperiodo 12:12h luz: oscuridad, aireación continua, intensidad luminosa $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$, pH 7.8. La biomasa se cosechó por centrifugación a los días 0, 5, 10, 12 y 17. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con un ANOVA de una vía y un test Duncan con un α de 0.05. Los resultados fueron: el nitrógeno externo disminuyó con respecto al tiempo, obteniendo el agotamiento total en el día 10 con diferencias significativas entre el día 0 y los días 5,10,12 y 17. La tasa de crecimiento, concentración celular y productividad de la biomasa máxima se obtuvieron a los días 2, 3 y 5, respectivamente. Las proteínas (10.7%), carbohidratos (39.2%) y lípidos totales (33%) a los días 0, 12, 5 respectivamente. Las proteínas disminuyeron significativamente del día 0 al día 10 y se mantuvieron en concentración similar los días 12 y 17 mientras que los carbohidratos aumentaron significativamente del día 0 al 5, 10, 12 y 17. En cuanto a los ácidos grasos los más abundantes fueron 18:1 ω 9 y 16:0, siendo este último el más abundante en el día 17 presentando diferencias significativas con el día 0. La clorofila *a* disminuyó significativamente del día 0 al 10. Se identificaron distintas bacterias en donde la mayoría fueron α - proteobacterias, un bacteroide y una β - proteobacteria. En cuanto los telómeros se encontró que la longitud de éstos permaneció constante. Los mecanismos que desarrolla la microalga para vivir bajo los efectos del estrés como la modificación de ácidos grasos y la interacción de las bacterias presentes constituyen una herramienta biotecnológica en el ámbito de los biocombustibles y la biorremediación respectivamente.

Palabras clave: Telómeros, bacterias, nitrógeno, lípidos, carbohidratos, proteínas, y pigmentos.



Vo. Bo. Dra. Bertha Olivia
Arredondo Vega

Co-Director



Vo. Bo. Dr. Juan Pedro Luna Arias

Co-Director

Summary

The microalgae are photosynthetic organisms that contain chlorophyll and accumulate compounds of biotechnological interest. Under conditions of stress such as the decrease in the concentration of nitrogen in the medium, they increase the concentration of reactive oxygen species (ROS). ROS cause damage to biomolecules such as lipids, DNA and their telomeres, which are responsible for cellular senescence. The absence of structural damage is due to molecules with antioxidant capacity such as carotenoids. In the present work, the effect of nitrogen consumption on the culture medium and internal elemental nitrogen as well as its isotopic ratios during *Desmodesmus communis* growth on the growth rate, biomass productivity, biochemical composition, bacterial community and length was evaluated. Of the telomeres. The batch culture conditions were: medium F / 2, photoperiod 12: 12h light: dark, continuous aeration, luminous intensity 120 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$, pH 7.8. The biomass was harvested by centrifugation at days 0, 5, 10, 12 and 17. The results obtained were analyzed statistically with a one-way ANOVA and a Duncan test with an α of 0.05. The results were: external nitrogen decreased with respect to time, obtaining total depletion on day 10 with significant differences between day 0 and days 5, 10, 12 and 17. The growth rate, cellular concentration and productivity of the Maximum biomass were obtained at days 2, 3 and 5, respectively. Proteins (10.7%), carbohydrates (39.2%) and total lipids (33%) at days 0, 12, 5 respectively. The proteins decreased significantly from day 0 to day 10 and were maintained at similar concentration on days 12 and 17 while carbohydrates increased significantly from day 0 to 5, 10, 12 and 17. Regarding fatty acids, the most abundant were 18: 1 ω 9 and 16: 0, the latter being the most abundant on day 17, presenting significant differences with day 0. Chlorophyll a decreased significantly from day 0 to 10. They were identified different bacteria where the majority were α -proteobacteria, a bacteroid and a β -proteobacteria. Once the telomeres were found, the length of these remained constant. The mechanisms developed by the microalga to live under the effects of stress such as the modification of fatty acids and the interaction of the bacteria present constitute a biotechnological tool in the field of biofuels and bioremediation, respectively.

Keywords : Telomers, bacteria, nitrogen, lipids, carbohydrates, proteins, and pigments.



Vo. Bo. Dra. Bertha Olivia
Arredondo Vega

Co-Director



Vo. Bo. Dr. Juan Pedro Luna Arias

Co-Director

Dedicatoria

A mi hermosa hija Sofía por su espera, por alentarme con su gran amor a ser el mejor ejemplo para ella.

A mis padres Jorge Elías y Guadalupe Castelo por apoyarme en todos los aspectos de mi vida, para poder hacer posible alcanzar mis metas y por ser mí más grande ejemplo de perseverancia.

A mis amigos de maestría por el gusto de haberlos conocido.

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S.C. por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y proporcionar la infraestructura necesaria para llevar a cabo este trabajo de maestría.

A CONACYT por la beca otorgada número 589407.

Al CINVESTAV por permitirme realizar una estancia de investigación y proporcionar la infraestructura para llevarla a cabo.

A mi comité tutorial, Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, Dr. Juan Pedro Luna Arias y Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes, por su apoyo, paciencia y valiosos consejos.

A la técnico responsable del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, la Dra. Laura Carreón Palau por enseñarme y guiarme en la realización de las técnicas en el laboratorio y por ser una guía.

Al técnico responsable del Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular el M. en C. Ángel Edgardo Carrillo García por guiarme en la ejecución de las técnicas realizadas en el laboratorio.

Al Dr. Iban Murillo Murillo y la IBQ. Celina Beltrán Camacho personal del Laboratorio de Análisis Químico de Aguas por guiarme en la realización de las técnicas realizadas en el laboratorio.

Al Dr. Eberto Novelo Maldonado del Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias de la UNAM, por la identificación de la cepa de *Desmodesmus communis* mediante herramientas de microscopía electrónica, y a la Ing. en Biotecnología Daniela Bárcenas Pérez del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, por la comprobación taxonómica de la cepa mediante marcadores moleculares 18S y Rbcl.

A la ayudante de investigador la Bióloga María Luisa Labra Barrios por su asistencia técnica en la realización de los experimentos llevados a cabo en el Laboratorio de Biología Celular del CINVESTAV.

A Refugio Contreras Contreras por ser un apoyo emocional durante mi estancia en CINVESTAV, gracias por acompañarme.

Al Lic. Horacio Sandoval Gómez responsable del Laboratorio de Cómputo del CIBNOR por su asistencia técnica en el uso de equipo informático.

A mis maestros de las asignaturas de maestría.

A mis compañeros de maestría a los cuales siempre llevare en mi corazón, en especial a Caroli, Carmen y Jeb que me acompañaron cercanamente en esta hermosa etapa.

A todos muchas gracias ♥.

Contenido

Resumen	ii
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1 Usos de las microalgas	3
1.2 Comunidad de bacterias con las microalgas	3
1.2.1 Relación bacteria - microalga	4
1.3 Nutrición de las microalgas y mecanismos de obtención de energía	5
1.4 Nitrógeno	6
1.4.1 El metabolismo del nitrógeno y el del carbono están interconectados y se regulan recíprocamente	8
1.5 Efecto del oxígeno en la oxidación de las biomoléculas	9
1.5.1 Efecto de los radicales libres en el ADN y en la longitud de los telómeros	10
1.6 Antioxidantes	11
1.7 Microalga utilizada en este trabajo	13
1.7.1 Generalidades	13
1.7.2 Descripción	14
1.7.3 Clasificación	14
1.7.4 Ciclo celular	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Respuesta bioquímica a condiciones de consumo de nitrógeno	16
2.2 Lípidos y ácidos grasos en microalgas	17
2.2.1 Biosíntesis de ácidos grasos	19
2.3 Telómeros y microalgas	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS	25

6.1	Material biológico y condiciones de cultivo.....	25
6.2	Análisis experimental	26
6.2.1	Determinación de peso seco, orgánico e inorgánico.....	26
6.2.2	Determinación de nitratos.....	27
6.2.3	Determinación de la relación carbono: nitrógeno elemental y la relación entre $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$	28
6.2.4	Determinación de proteínas	29
6.2.5	Determinación de carbohidratos	30
6.2.6	Determinación de pigmentos, lípidos totales y ácidos grasos ...	31
6.2.7	Pigmentos	31
6.2.8	Lípidos totales	32
6.2.9	Ácidos grasos.....	33
6.2.10	Determinación de bacterias presentes	34
6.2.10.1	Extracción de ADN	34
6.2.10.2	Electroforesis.....	35
6.2.10.3	SSCP.....	35
6.2.11	Determinación de la longitud de los telómeros.....	39
6.3	Análisis estadístico.....	42
7.	RESULTADOS	43
8.	DISCUSIÓN	59
9.	CONCLUSIONES	64
10.	LITERATURA CITADA	65

Lista de figuras

Figura 1. Blancos de oxidación de especies reactivas y radicales libres.....	10
Figura 2. Representación del ciclo celular Cn (fisión múltiple)	16
Figura 3. <i>Desmodesmus communis</i> identificación de la cepa por Dr. Eberto Novelo M.	25
Figura 4. Curva de crecimiento <i>D. communis</i>	43
Figura 5. Rendimiento de la biomasa del cultivo de <i>D. communis</i> mg L ⁻¹ ,	44
Figura 6. Productividad de la biomasa del cultivo de <i>D. communis</i> mg L ⁻¹ d ⁻¹ ..	44
Figura 7. Porcentaje de peso orgánico y peso inorgánico de la biomasa del cultivo de <i>D. communis</i> ..	45
Figura 8. Porcentaje de proteínas con respecto al peso seco de <i>D. communis</i>	48
Figura 9. Porcentaje de carbohidratos de <i>D. communis</i> con respecto al peso seco	49
Figura 10. Perfil cuantitativo de pigmentos de <i>D. communis</i> µg mg ⁻¹	50
Figura 11. Porcentaje de lípidos de <i>D. communis</i> con respecto al peso seco.	51
Figura 12. Porcentaje de ácidos grasos con respecto al total de ácidos grasos .	54
Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida técnica SSCP.....	56
Figura 14. Técnica TRF.....	58

Lista de tablas

Tabla I. Aplicaciones de los pigmentos carotenoides.	13
Tabla II. Comportamiento de biomoléculas en respuesta al consumo de nitrógeno.	17
Tabla III. Contenido de lípidos totales en la familia Scenedesmaceae.	18
Tabla IV. Presencia de ácidos grasos en microalgas.	20
Tabla V. Antecedentes del estudio de telómeros en microalgas.....	21
Tabla VI. Programa de PCR (para técnica SSCP).....	36
Tabla VII. Mezcla de reacción gel de acrilamida.....	37
Tabla VIII. Mezcla de reacción para digestión.	38
Tabla IX. Mezcla de reacción para marcado de la sonda.	41
Tabla X. Tasa de crecimiento y tiempo de generación.	43
Tabla XI. Concentración de nitratos (μM) en medio de cultivo de <i>D. communis</i>	46
Tabla XII. Relación carbono: nitrógeno intracelular de la biomasa del cultivo de <i>D. communis</i>	47
Tabla XIII. Relación ^{15}N : ^{14}N de la biomasa del cultivo de <i>D. communis</i>	47
Tabla XIV. Relación ^{13}C : ^{12}C de la biomasa del cultivo de <i>D. communis</i>	48
Tabla XV. Porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados con respecto a los ácidos grasos totales.....	52
Tabla XVI. Bacterias cultivables presentes en el cultivo de <i>D. communis</i>	55
Tabla XVII. Bacterias identificadas mediante la técnica SSCP.....	57

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas del género *Desmodesmus* (antes *Scenedesmus*) se encuentran en cuerpos de agua dulce, en las aguas residuales de las plantas de tratamiento y en aguas contaminadas con metales pesados (Perales-Vela *et al.*, 2006). La capacidad de sobrevivir en dichos ambientes se ha explicado por su plasticidad fenotípica ya que puede crecer como células independientes o como cenobios (agrupación de células). Su capacidad de responder a ambientes estresantes hacen a las especies de este género buenas candidatas para su uso biotecnológico. Por ejemplo, *S. almeriensis* puede ser inducida por la irradiancia para producir luteína, un pigmento que evita la degeneración retinal (Sánchez *et al.*, 2008) y *S. incrassatulus* se utiliza en el tratamiento de aguas residuales para la remoción de metales pesados (Peña-Castro *et al.*, 2004). Esta capacidad de adaptarse a ambientes estresantes como la deficiencia de nitrógeno en donde se incrementa la concentración de especies reactivas de oxígeno (Fujita *et al.*, 2006), para contrarrestarlas, las células presentan mecanismos de protección (Bumbak *et al.*, 2011; Vilar-Rojas *et al.*, 1996) para contrarrestarlas, es decir, los antioxidantes (Sahnoun *et al.*, 1997). Cuando las especies reactivas de oxígeno no son contrarrestadas de manera eficaz pueden causar daños, al ADN, telómeros, lípidos membranales, así como proteínas y carbohidratos a nivel de los organelos. La senescencia celular es un proceso irreversible de declinación de la proliferación celular en relación con la edad. Es un proceso activo, genéticamente programado, que responde a una inducción dada por el acortamiento telomérico, generando una señal semejante a la producida por el daño en el ADN (Jeyapalan y Sedivy, 2008).

Debido a que las microalgas pueden almacenar el nitrógeno que consumen del medio (Lavín y Lourenço, 2005), es importante para poder entender las respuestas, medir el nitrógeno intracelular y de esta manera, determinar si las células se encuentran en condición de deficiencia interna. En este trabajo se determinó el nitrógeno elemental (Lourenço *et al.*, 2004) así como relación carbono:nitrógeno.

Considerando que las microalgas presentan plasticidad metabólica, el presente trabajo se enfocó en evaluar el efecto del estrés generado por la deficiencia de nitrógeno en diferentes biomoléculas: proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y pigmentos, y a nivel del ADN se midió la longitud de los telómeros de la microalga *Desmodesmus communis*. Así mismo, se identificaron las bacterias presentes en el cultivo de la microalga, haciendo énfasis en aquellas que tienen capacidad para fijar nitrógeno.

1.1 Generalidades

Las microalgas son organismos fotosintéticos, unicelulares que pueden formar cadenas, colonias o cenobios, y se les puede encontrar en agua marina, dulce, salobre, en el suelo o en ambientes hipersalinos y nevados (Metting, 1996; Vaultot *et al.*, 2008; Holzinger *et al.*, 2016). Se les consideran responsables de la síntesis de material orgánico en los ecosistemas acuáticos, así como del 40% de la fotosíntesis que se lleva a cabo en el planeta (Margalef, 1981).

Las microalgas son de gran importancia ambiental ya que fijan más del 40% del carbono de la tierra, además de ofrecer a la biósfera una considerable proporción de oxígeno. Su importancia ecológica radica en su abundancia, su extrema biodiversidad y la habilidad de sobrevivir en una variedad de ambientes, desde los muy extremos como los suelos desérticos, hasta ambientes moderados como lagos de agua dulce y océanos (Norton *et al.*, 1996). Son un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos con una estructura simple (unicelulares) que permite el rápido crecimiento celular y por lo tanto una mayor producción de biomasa (Li *et al.*, 2009). Las microalgas son organismos fotoautótrofos, siendo la luz su principal fuente de energía y el dióxido de carbono (CO₂) su principal fuente de carbono (Martin, 2010); pero también pueden utilizar una fuente de carbono orgánico (glucosa, acetato de sodio) por lo que se convierten en organismos mixotróficos (Arias Peñarada *et al.*, 2013).

1.1.1 Usos de las microalgas

En los últimos años se han logrado avances importantes en el uso de las microalgas para diversos fines como salud humana, cosmetología, purificación de aguas residuales, prevención de contaminación acuática, industria farmacéutica, acuicultura, producción de pigmentos y antibióticos, entre otros (Jasso *et al.*, 2012), por esto se han vuelto de gran interés para la producción de compuestos de alto valor agregado como la astaxantina, el β -caroteno, la luteína, la cantaxantina y clorofila (Qin *et al.*, 2008). También son una fuente de biodiesel y otros productos de gran interés comercial (Bitog *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta la enorme biodiversidad de las microalgas y los recientes desarrollos en ingeniería genética y metabólica, este grupo de organismos representa una fuente prometedora para generar nuevos productos y aplicaciones. Con el desarrollo de sistemas de cultivo y cosecha, la biotecnología de microalgas puede satisfacer las altas demandas de las industrias alimentaria, energética y farmacéutica (Harun *et al.*, 2010).

1.2 Comunidad de bacterias con las microalgas

Las microalgas y las bacterias habitan juntas en casi todos los ambientes acuáticos y desempeñan un papel crucial en el ciclo de nutrientes y el flujo de energía (Ramanan *et al.*, 2016). Las bacterias tienen una gran influencia en el crecimiento de microalgas en condiciones autotróficas, ya sea positiva o negativa (Ethier *et al.*, 2011; Ortiz-Marquez *et al.*, 2012). En general, las bacterias promueven el crecimiento de microalgas reduciendo la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, consumiendo los materiales orgánicos excretados por algas (Mouget *et al.*, 1995) y secretando biotina, cobalamina y tiamina (Croft *et al.*, 2005). A su vez, las microalgas le retribuyen a las bacterias oxígeno y compuestos extracelulares. Tal reciprocidad implica que el crecimiento de microalgas puede ser potenciado por bacterias específicas (de-Bashan *et al.*, 2002; Ethier *et al.*, 2011). Recientemente, se ha encontrado que las moléculas de señalización de "quorum" sensing producidas por bacterias pueden afectar no solo a las cianobacterias, sino también a las microalgas eucariotas, y que a

su vez, las algas eucariotas también pueden interferir con la señalización química de las bacterias (Borowitzka *et al.*, 2016).

1.2.1 Relación bacteria - microalga

Las microalgas crecen asociadas a bacterias de forma natural. El concepto de “anillo microbiano” introducido por Azam *et al.* (1998) cambió notablemente la percepción del papel que tienen los microorganismos en los ecosistemas acuáticos. Este concepto plantea la importancia de la interacción bacteria-microalga como componentes básicos del ecosistema, proponiendo que las bacterias no sólo son recicladoras de la materia orgánica, sino que además tienen la capacidad de absorber nutrientes desde el océano y hacer circular fuentes de carbono mediante diversas interacciones ecológicas con los otros componentes del plancton (Azam, 1998).

Dentro de los componentes del fitoplancton, uno de los organismos con los cuales las bacterias interactúan directamente son las microalgas. Diversas investigaciones a nivel de laboratorio y en campo han demostrado fenómenos de estímulo e inhibición de crecimiento en microalgas y/o bacterias (Borowitzka *et al.*, 2016; Sieburth, 1959, 1971). Las bacterias pueden incrementar el crecimiento microalgal (Dae-Hyun *et al.*, 2014) mediante la producción de algunas vitaminas como la cobalamina, cofactor de la enzima metionina sintasa (Croft *et al.*, 2005). También, se ha demostrado que las sustancias orgánicas derivadas del fitoplancton en ecosistemas naturales, son utilizadas por las bacterias como sustrato de crecimiento (Ohara *et al.*, 1993; Mouget *et al.*, 1995). Las interacciones microbianas son el núcleo del éxito o fracaso de las especies. Estas interacciones pueden ser de tipo mutualista, simbiótica, comensalista o parasitaria, y a menudo son consideradas especies específicas (Ashen y Goff, 2000; Sapp *et al.*, 2007).

La producción de vitaminas por bacterias, como resultado de la interacción entre bacterias y fitoplancton, ha sido frecuentemente investigada. Diversos estudios sugieren una fuerte correlación entre el agotamiento de la vitamina en el agua y la terminación de la floculación de diatomeas (Ohwada, 1973), siendo la vitamina B₁₂ la más estudiada (Carlucci *et al.*, 1969; Ryther y Guillard, 1962). Esta es

necesaria en organismos que carecen de la enzima metionina sintasa independiente de vitamina B₁₂.

El estudio más importante de las interacciones entre bacterias y microalgas debido a la producción de vitamina B₁₂ por las bacterias se llevó a cabo en 1974, cuando varias especies de diatomeas se cultivaron axénicamente en presencia o ausencia de vitamina B₁₂, y en presencia de bacterias marinas heterotróficas productoras de vitamina B₁₂. En casi todos los casos, las bacterias parecían mejorar el rendimiento de las células de diatomeas en relación con los cultivos limitados con vitamina B₁₂, pero no con el nivel de los cultivos suplementados con B₁₂ (Haines y Guillard, 1974).

Croft *et al.* (2005) realizaron una revisión bibliográfica sobre los requerimientos de vitamina B₁₂ en 326 especies de microalgas, y la confirmaron como requisito. También demostraron que una bacteria del género *Halomonas* aumentó la producción de vitamina B₁₂ cuando se les proporcionó un extracto comercial de microalga; éste fue interpretado como evidencia de que las bacterias tienen una correlación siendo suplementos vitamínicos (y particularmente vitaminas B₁₂) a escala global a la mayoría del fitoplancton B₁₂ auxotrófico, a cambio de carbono orgánico (Droop, 2007).

1.3 Nutrición de las microalgas y mecanismos de obtención de energía

En las microalgas su nutrición es por absorción iónica de C, H, O, N, P, S, K, Ca, Fe y Mg, así como de los elementos traza: Mn, B, Co, Cu, Zn y Mo. De los grupos que las conforman, las cianofitas, clorofitas, crisófitas, euglenofitas y diatomeas pennales son más comunes en agua dulce (Margalef, 1981).

La diversidad de especies en un ambiente acuático se encuentra determinada por la proporción que existe entre los nutrientes disponibles en el medio y los requerimientos nutricionales de cada especie. De esta forma, diferentes especies creciendo en una misma comunidad pueden estar limitadas por distintos recursos (Rouzić y Bertru, 1997).

La composición química de las microalgas se encuentra directamente determinada por la toma de material inorgánico (cationes y aniones) del medio acuático circundante. La asimilación de nutrientes inorgánicos por las microalgas es importante ya que estos organismos representan la principal fuente de nutrientes en ecosistemas acuáticos continentales y marinos. La entrada de materia inorgánica en las células microalgales constituye la principal ruta de entrada en la cadena alimenticia con la subsecuente transformación en biomasa de herbívoros y carnívoros (Krivtsov y Sigeo, 2005).

1.4 Nitrógeno

El nitrógeno es uno de los componentes esenciales de muchas biomoléculas clave, como aminoácidos y nucleótidos. La síntesis de proteínas normalmente depende de un adecuado suministro de nitrógeno (Sze, 1998). Un incremento en la disponibilidad de nitrógeno inorgánico generalmente deriva en un incremento de la abundancia de productores primarios. Sin embargo, altos niveles de nitrógeno inorgánico que no pueden ser asimilados por los sistemas ecológicos pueden causar efectos adversos en los organismos menos tolerantes (Camargo y Alonso, 2006).

El nitrógeno se presenta de diferentes formas en el agua, incluyendo nitrógeno molecular (N_2), amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), otros óxidos de nitrógeno y nitrógeno en compuestos orgánicos. El amonio normalmente se encuentra en baja concentración en aguas oxigenadas donde las bacterias lo oxidan a nitrato (Sze, 1998).

En los cultivos, el nitrógeno se aporta en la forma de sales de amonio o nitratos, ya que son éstas las principales formas de nitrógeno que usan las microalgas, aunque la mayoría puede utilizar también nitritos, urea y otras formas de nitrógeno orgánico. El nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas en forma de amonio, mientras que la asimilación de nitrato requiere de la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio mediante cuatro pasos de reducción que requieren energía, resultando más favorable para las microalgas usar el amonio cuando está disponible (Sze, 1998).

La asimilación del nitrato consta de tres etapas: 1) absorción, 2) reducción del nitrato a amonio, y 3) incorporación del amonio a esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos, proceso que recibe el nombre específico de asimilación del amonio (Maldonado, 2008).

En una primera reacción, el nitrato es reducido a nitrito por la enzima nitrato reductasa. Dicha reacción requiere dos electrones suministrados por una molécula de piridín nucleótido reducido. A continuación, el nitrito es reducido a amonio por la enzima nitrito reductasa, en una reacción que requiere seis electrones donados por la ferredoxina reducida. La reducción del nitrato a amonio consume, un total de ocho electrones. El poder reductor requerido se genera en la fase luminosa de la fotosíntesis (Foyer y Noctor, 2003). Las vacuolas constituyen el principal sitio de almacenamiento del nitrato (Maldonado, 2008).

La deficiencia de nitrógeno influye directamente en la formación de aminoácidos, lo cual a su vez limita la traducción del mRNA y por lo tanto se reduce la síntesis de proteínas. Por otra parte, la eficiencia del fotosistema II disminuye inicialmente como una consecuencia de la disipación térmica de la energía de excitación absorbida en el lecho pigmentario, derivando en una reducción de la tasa de fotosíntesis, lo cual a su vez lleva a una reducción en la tasa de respiración (Wehr, 2007).

La tasa de crecimiento microalgal es una función de las reservas intracelulares del nutriente limitante: cuando está disponible, la abundancia del nutriente determina su tasa de asimilación y su almacenamiento intracelular (Droop, 1973). Si hay producción continua, la cantidad de reservas intracelulares contenidas en cada organismo disminuye. La reducción del nutriente limitante lleva a un decremento en la tasa de crecimiento hasta que alcanza su valor mínimo, momento en el cual no puede haber más crecimiento (fase estacionaria) (Lampert y Sommer, 2007).

El nitrógeno presenta dos isótopos estables: ^{14}N y ^{15}N . El estado de valencia del nitrógeno varía de +5 (NO_3^-) a -3 (NH_4^+), dando como resultado una amplia variación natural de composiciones isotópicas. El contenido en ^{15}N de una sustancia se expresa como su desviación isotópica, $\delta^{15}\text{N}$, respecto al estándar

del aire atmosférico. El reservorio de nitrógeno atmosférico, corresponde al estándar de referencia, por tanto su valor será de 0%. Al fabricarse los fertilizantes agrícolas a partir del nitrógeno atmosférico, y presentar este proceso un fraccionamiento muy bajo, el valor isotópico del nitrógeno de estos se encuentra comprendido alrededor del valor del N del aire (entre +5% a - %). De manera similar, el nitrógeno procedente de efluentes ganaderos o de fosas sépticas o redes de alcantarillado, al proceder de amonio el cual ha sufrido procesos de volatilización importantes, tiene valores de $\delta^{15}\text{N}$ isotópicamente más pesados, con valores comprendidos entre 10 y 20% (Vitòria *et al.*, 2004). En el presente trabajo el $\delta^{15}\text{N}$ se utilizó como indicador de mixotrofía.

La asimilación del nitrógeno requiere poder reductor, ATP y esqueletos carbonados. Los esqueletos carbonados son proporcionados por la oxidación de carbohidratos. La fijación de nitrógeno y el metabolismo de carbohidratos está íntimamente ligado (Coruzzi y Zhou, 2001; O'Brien *et al.*, 2016) . Se ha observado que las mitocondrias son sumamente sensibles a la presión oxidativa en todos los organismos aerobios, lo que se refleja en cantidades elevadas de oxidación en lípidos y proteínas, y en mutaciones del ADN mitocondrial (Lenaz, 1998; Ríos, 2003). Debido al daño oxidativo acumulado se puede originar la pérdida de la capacidad funcional de la célula, lo que conduce al envejecimiento y a la muerte (Hayflick, 1985; Medvedev, 1990; Von Zglinicki, 2002).

1.4.1 El metabolismo del nitrógeno y el del carbono están interconectados y se regulan recíprocamente

La asimilación del nitrógeno es un proceso íntimamente conectado al metabolismo del carbono. La reducción del nitrato a amonio y su posterior asimilación en glutamato requieren diez electrones, de los cuales dos son usados en el citosol como NADH por la enzima nitrato reductasa, y los ocho restantes son utilizados en el cloroplasto en forma de ferredoxina reducida (seis por la enzima nitrito reductasa y dos por la ferredoxina-glutamato sintasa). El NADH necesario para la reducción del nitrato a nitrito proviene, en su mayor parte, del NADPH generado fotosintéticamente en los cloroplastos, y que es exportado al

citosol mediante las lanzaderas triosa fosfato-fosfoglicerato y malato-oxalacetato (Coruzzi y Zhou, 2001).

La asimilación del nitrógeno origina un flujo de carbono desde carbohidratos hasta aminoácidos. En ausencia de fotosíntesis, el almidón o la sacarosa pueden suministrar dicho carbono. En la luz, los azúcares que se sintetizan en el ciclo reductivo de las pentosas fosfato constituyen la fuente última de esqueletos carbonados para sustentar la síntesis de aminoácidos. Así pues, en los organismos fotosintéticos, el carbono asimilado se reparte entre la formación de carbohidratos y la síntesis de aminoácidos. El flujo de carbono orgánico hacia una u otra vía se modula a través de la regulación de enzimas claves de ambas rutas, como respuesta, principalmente, a la luz y a la disponibilidad de carbono y nitrógeno (Coruzzi y Zhou, 2001).

1.5 Efecto del oxígeno en la oxidación de las biomoléculas

El oxígeno es un compuesto esencial en el metabolismo de todos los organismos aerobios, ya que participa en diversas reacciones de oxidación, incluyendo la respiración. Durante estos procesos el oxígeno molecular se reduce, dando origen a las llamadas especies reactivas de oxígeno, las que en su mayoría son radicales libres. Los radicales libres se pueden formar en el interior de las células como producto de sus actividades fisiológicas normales (Bunker, 1992). La figura 1 muestra el efecto de los radicales libres en las biomoléculas; proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos.

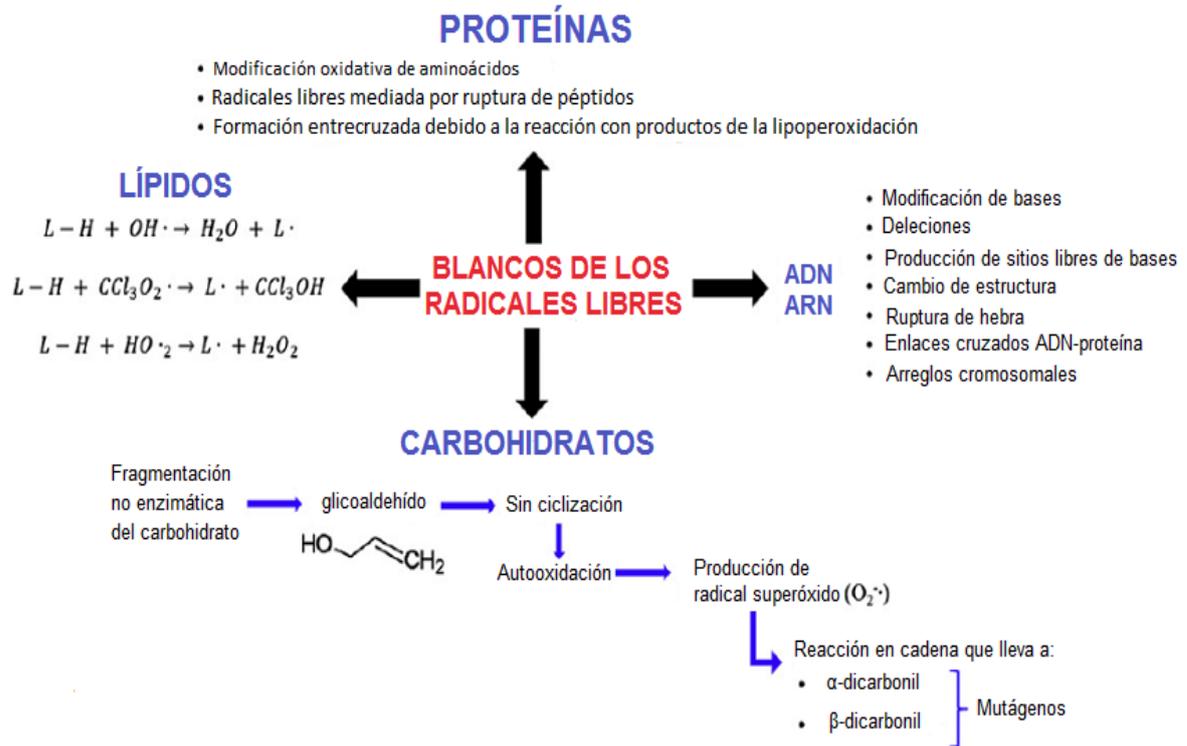


Figura 1. Blancos de oxidación de especies reactivas y radicales libres. Modificado de Dizdaroglu *et al.* (2002); Valko *et al.* (2004); Benov y Beema (2003), Halliwell y Chirico, (1993); y Lobo *et al.* (2010). Tomado de Carocho y Ferreira (2013).

El daño provocado a nivel del ADN por los radicales libres puede generar mutaciones somáticas que llevarían a la síntesis de proteínas defectuosas y posiblemente a la generación de transformaciones malignas, como es el caso de la desoxirribosa, la que al oxidarse puede inducir el rompimiento del enlace entre este azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo mediante el cual se forman rompimientos de cadena sencilla (Breen y Murphy, 1995; Dizdaroglu y Jaruga, 2012), convirtiendo a los telómeros en un blanco susceptible a daño. Los radicales hidroxilos tienen la capacidad de reaccionar también con las bases nitrogenadas del ADN. El tipo predominante de alteración que puede observarse a este nivel son las sustituciones, aunque también se pueden observar deleciones y con menor frecuencia inserciones. Se ha visto que las sustituciones frecuentemente involucran al par guanina-citocina, con el que los radicales hidroxilos y el oxígeno simple reaccionan directamente. Las mutaciones se concentran en regiones específicas del ADN, que se denominan

“puntos calientes”, lo que indica que están relacionadas con las secuencias de bases púricas y pirimídicas (Imlay y Linn, 1988).

Los telómeros son regiones de ADN no codificante ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están constituidos por secuencias de ADN altamente conservadas, repetidas en tándem (TTAGGG)_n, y proteínas asociadas. Presentan una estructura especial que impide su unión a los extremos de otros cromosomas, previniendo la fusión telomérica (Lu *et al.*, 2013; Zakian, 1995). Cumplen un papel esencial en la preservación de la integridad cromosómica, protegiendo al ADN codificante de delección por fenómeno de fin de replicación y la degradación, contribuyendo al mantenimiento de la estabilidad cromosómica. Moderan importantes interacciones entre los cromosomas y la matriz nuclear, pudiendo además ejercer efectos sobre la transcripción de genes situados en regiones subteloméricas e interactúan con los mecanismos regulatorios del ciclo celular (Blackburn, 1991).

Distintas evidencias indican que el acortamiento telomérico durante el envejecimiento de células somáticas normales *in vitro* juega un papel causal en la senescencia celular. Una longitud telomérica crítica estaría asociada con un bloqueo en la replicación característica de las células senescentes (Mondello y Scovassi, 2004).

La senescencia celular es un proceso irreversible de declinación de la proliferación celular en relación con la edad. Es un proceso activo, genéticamente programado que responde a una inducción dada por el acortamiento telomérico, generando una señal semejante a la producida por el daño en el ADN (Jeyapalan y Sedivy, 2008).

1.6 Antioxidantes

Las células presentan mecanismos de protección, de manera que los radicales libres pueden ser transformados a productos menos tóxicos o no tóxicos. La protección de las células contra los radicales libres derivados del oxígeno comprende no solo la captura de estos intermediarios agresivos, sino también la

prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones (Gavia García y González Martínez, 2015).

La célula cuenta con dos niveles de defensa para actuar en contra de los radicales libres, la primera es la prevención; esto implica la acción de procedimientos que bloquean su formación, como sería la presencia de proteínas que se unen a metales (en particular hierro y cobre) lo que controla eficientemente la lipoperoxidación y la fragmentación del ADN, ya que de esta manera se evita la participación de estos metales en las reacciones donde se producen las diferentes especies reactivas de oxígeno (Vilar-Rojas *et al.*, 1996).

En un segundo nivel de protección está la acción de los antioxidantes, que eliminan a los radicales para suprimir su actividad nociva en la célula. Estos agentes pueden dividirse en dos categorías: en enzimáticos y no enzimáticos (Pietta, 2000; Ratnam *et al.*, 2006.).

Los antioxidantes no enzimáticos se unen a los radicales libres, y los transfieren de sitios donde pueden provocar graves daños (membranas) a compartimentos celulares donde sus efectos sean menos drásticos (citoplasma), o bien, los transforman en radicales menos agresivos (Halliwell, 1991).

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos están a los pigmentos carotenoides cuya principal función es captar energía luminosa, para luego ser transferida a la clorofila y transformarse durante la fotosíntesis. Los carotenoides siempre acompañan a la clorofila en una relación de tres a cuatro partes de clorofila por una parte de carotenoide (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). Gran parte de la importancia nutricional de estos pigmentos radica en el hecho de que algunos de ellos poseen actividad pro vitamina A. Durante la última década se ha demostrado que juegan un papel importante en la prevención de diversas enfermedades degenerativas humanas (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

La actividad antioxidante de estos pigmentos depende de una serie de factores, como su estructura química (tamaño, número de sustituyentes, configuración *cis* o *trans*), su concentración, la presión parcial de oxígeno o su interacción con otros antioxidantes, sobre todo las vitaminas C y E. En un principio estos estudios se llevaron a cabo basándose principalmente en el β -caroteno. El mecanismo de

la actividad antioxidante de este compuesto está relacionado con su carácter hidrofóbico y con su capacidad para "retirar" el oxígeno singulete y desactivar radicales libres (Jialal *et al.*, 1991). En la tabla I se muestran las aplicaciones de distintos pigmentos carotenoides.

Tabla I. Aplicaciones de los pigmentos carotenoides Bhosale, (2004).

Carotenoide	Utilidad
Licopeno	Medicamentos contra enfermedades cardiovasculares, cáncer de próstata. Preparaciones cosméticas.
β -caroteno	Agente anticancerígeno, fuente de vitamina A. Colorante en alimentos. Fotoprotector. Preparaciones cosméticas.
Astaxantina	Complemento alimenticio principal en acuicultura. Colorante en alimentos.
Luteína	Prevención de la degeneración macular senil (AMD por sus siglas en inglés). Preparaciones cosméticas.
Zeaxantina	Prevención de la degeneración muscular senil (AMD por sus siglas en inglés).

1.7 Microalga utilizada en este trabajo

Desmodesmus communis

1.7.1 Generalidades

Desmodesmus es un microalga de la clase Chlorophyceae, orden Sphaeropleales, familia *Scenedesmaceae*, subfamilia *Desmodesmoideae*. Originalmente este género fue nombrado como *Scenedesmus* por Mayen 1823,

pero después Hegewald *et al.* (1997) reubicaron todas las especies del subgénero *Desmodesmus* de *Scenedesmus* al género *Desmodesmus* utilizando caracteres genéticos. Este es probablemente el género de *Chlorococcales* más comúnmente reportado y frecuentemente abundante en aguas ricas en nutrientes, especialmente con un alto contenido de nitrógeno (Wehr, 2007).

1.7.2 Descripción

Las células en la colonia se organizan en múltiplos de dos, aunque las especies más comunes presentan cuatro u ocho células (Lee, 2008). Estas se unen entre sí en toda su longitud. Las células externas del cenobio con espinas polares con simetría bilateral, no tangencial y márgenes rectos o ligeramente convexos. Las espinas son rectas o ligeramente sinuosas. En general son células cilíndricas, las células interiores con los polos redondeados y las exteriores con polos ligeramente alargados y curvos en la dirección de la espina. Las espinas se desarrollan apicalmente y sin engrosamientos basales. Entre las células puede observarse una membrana de unión que no sobrepasa la curva de los ápices de las células. En la superficie de las células se observan rosetas apicales o cercanas a los polos. Las células contienen un cloroplasto parietal laminar y lateral con un pirenoide excéntrico. En las células adultas se presentan gotas de aceite amarillento. Sus dimensiones son: células de 4.7 a 6.3 μm de diámetro, 12-18 μm de largo, espinas hasta 12.5 μm de largo (Guiry y Guiry, 2018).

1.7.3 Clasificación (Guiry y Guiry, 2018)

Clasificación:

Imperio Eukaryota

Reino Plantae

Subreino Viridiplantae

Infrareino Chlorophyta

Phylum Chlorophyta

Subphylum Chlorophytina

Clase Chlorophyceae
Orden Sphaeropleales
Familia Scenedesmaceae
Subfamilia Desmodesmoideae
Género *Desmodesmus*

1.7.4 Ciclo celular

Una característica que promueve el interés biotecnológico en esta microalga es su ciclo celular (Ševčíková *et al.*, 2013), el cual se caracteriza porque se dividen en más de dos células hijas en un ciclo celular (denotado como ciclo de fisión múltiple). Generalmente, cualquier división ocurrirá en $2n$ células hijas (ciclo tipo C_n), donde “n” es un número entero de 1 a 15. Los tipos de ciclo celular C_1 y C_n son intercambiables en algunas especies. Las células cultivadas bajo condiciones de crecimiento desfavorables, con una tasa de crecimiento baja, se dividirán en sólo 2 ($n = 1, C_1$); células hijas, mientras que las mismas células, cuando crecen en condiciones óptimas, se pueden dividir en 8 ($n = 3, C_n$) o 16 ($n = 4, C_n$) células hijas.

Estas microalgas son populares en los estudios del ciclo celular (Prison y Lorenzen, 1966; Tamiya, 1966) porque pueden sincronizarse fácilmente alternando los períodos de luz y oscuridad, un procedimiento que se considera natural y donde la sincronía inducida es muy alta. Debido a la presencia de múltiples replicaciones de ADN, división nuclear y celular, el ciclo es mucho más complejo que el esquema clásico y tiene una serie de modificaciones. Es importante destacar que hay una amplia superposición de la duplicación del genoma por la replicación del ADN, la separación del genoma por la división nuclear, y la división celular, y es aún más complejo ya que los procesos del ciclo celular se coordinan con procesos equivalentes tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos (Ševčíková *et al.*, 2013).

Aunque el ciclo celular de tipo C_n también se producen en otros organismos, en muchos grupos taxonómicos de microalgas es único. Los ciclos C_n son característicos para la mayoría de las células en los órdenes de microalgas

Chlorococcales y Volvocales como *Chlorella*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus* y *Chlamydomonas*. En la figura 2 se muestra una representación del ciclo Cn (fisión múltiple) y sus etapas G1, CP, pS, S, G2, G3 y C.

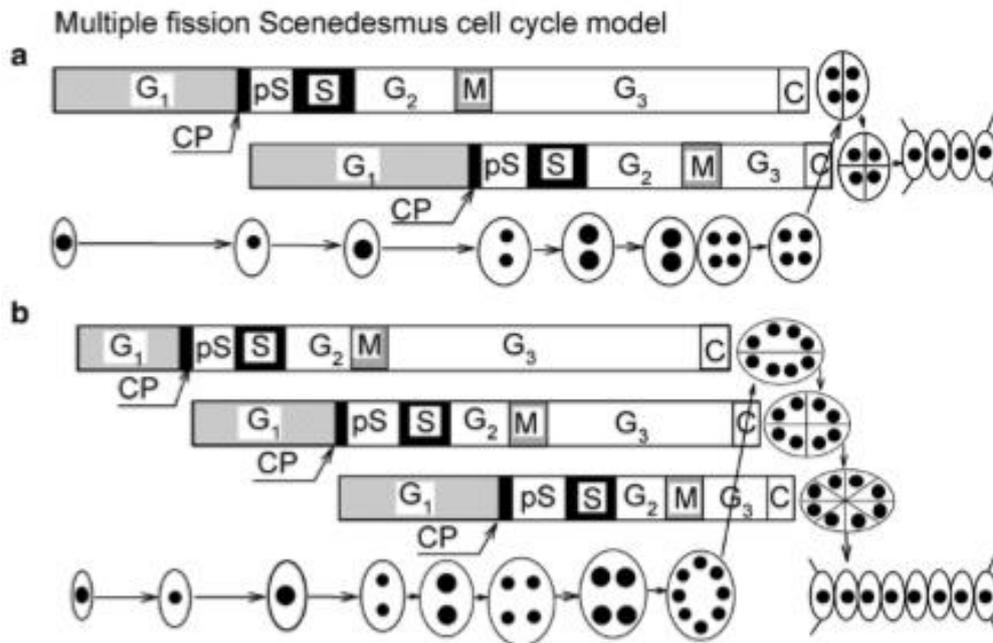


Figura 2. Representación del ciclo celular Cn (fisión múltiple) (Borowitzka *et al.*, 2016) donde se representa G1: fase del ciclo celular, en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN, CP: etapa en el ciclo celular en el que la célula se compromete a desencadenar una terminación de la secuencia de procesos que conduce a la duplicación de estructuras reproductivas, la cual consiste de pS: fase de pre-replicación entre el punto de restricción y el comienzo de la replicación del ADN. S: fase durante la cual la replicación de ADN toma lugar, G2: fase entre la terminación de la replicación del ADN y el inicio de la mitosis, M: fase durante la cual sucede la división nuclear, G3: fase entre la división nuclear y la división celular. Los procesos que conducen a la división celular se supone que tienen lugar durante esta fase, y C: fase durante la cual se produce la división celular y la formación de células hijas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Respuesta bioquímica a condiciones de consumo de nitrógeno

Se han realizado diversos trabajos en microalgas con relación a la disminución (consumo) de nitrógeno del medio de cultivo y el efecto en la concentración de diferentes biomoléculas (Tabla II).

Tabla II. Comportamiento de biomoléculas en respuesta al consumo de nitrógeno.

Biomolécula	Respuesta	Referencia
ARNm	Disminución	Doucette y Harrison, 1991
Proteínas	Disminución en su concentración	Doucette y Harrison, 1991; Li <i>et al.</i> , 2012; Simionato <i>et al.</i> , 2013
Lípidos	Aumento en su concentración	Pirastru <i>et al.</i> , 2012; Thompson, 1996
Carbohidratos	Aumento en su concentración	Coruzzi y Zhou, 2001; Pirastru <i>et al.</i> , 2012
Carotenoides	Aumentan	Ben-Amotz <i>et al.</i> , 1982; Qin <i>et al.</i> , 2008
Clorofila	Baja su concentración , disminuyendo la fotosíntesis	Lazar, 2003

2.2 Lípidos y ácidos grasos en microalgas

Las microalgas han atraído la atención de la comunidad científica, en particular los bioquímicos lipídicos y los biotecnólogos de microalgas, ya que se les considera una fuente de valiosos ingredientes nutricionales, tales como ácidos grasos altamente insaturados de cadena larga (LC-PUFA) de la familia ω 3 y carotenoides, así como los ácidos grasos saturados que son utilizados para la producción de biodiesel (Imahara *et al.*, 2007).

Las microalgas bajo condiciones normales de cultivo presentan un contenido de lípidos que por lo general varía entre el 20 y el 50 % de su peso seco, sin embargo, cuando son sometidas a situaciones de estrés, frecuentemente incrementan el contenido de lípidos totales, por lo que se han reportado valores en intervalos más amplios como se señala en la tabla III.

Tabla III. Contenido de lípidos totales en la familia *Scenedesmaceae*.

Microalga	% Lípidos (peso seco)	Referencia
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	31	Shen <i>et al.</i> , 2009
<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	8 -12	Arias-Peñaranda <i>et al.</i> , 2013
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10 – 43	Ho <i>et al.</i> , 2010
<i>Scenedesmus rubescens</i>	27 - 43	Lin y Lin, 2011; Tan y Lin, 2011
<i>Scenedesmus sp.</i>	7 – 53	Xin <i>et al.</i> , 2010

Los ácidos grasos son compuestos de carbono alifático que varían en longitud, grado de insaturación y estructura. Dada la enorme diversidad de microalgas y sus hábitats en la naturaleza (Guschina y Harwood, 2006), estos organismos presentan una mayor variedad de ácidos grasos, que los que se encuentran en plantas superiores. En plantas superiores hay lípidos, donde son más comunes los ácidos grasos saturados e insaturados de 16 carbonos (C16, C18) de cadena lineal, con hasta tres insaturaciones.

En ciertas clases de microalga son abundantes los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), con cadenas de C20 y C22 y un mayor número de insaturaciones (hasta seis). La composición de ácidos grasos de microalgas varía sustancialmente entre los representantes de los diferentes grupos filogenéticos (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Hu *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2011).

Los ácidos grasos suelen contener número par de carbonos, pero también se ha descrito que los ácidos grasos con cadenas impares existen en microalgas (Lang *et al.*, 2011).

2.2.1 Biosíntesis de ácidos grasos

En microalgas verdes, la ruta metabólica para la síntesis de ácidos grasos empieza por la unión del complejo luz-biomasa, el cual está mediado por la clorofila y carotenoides, los cuales capturan la energía lumínica en forma de fotones. La energía es empleada por el fotosistema II en la oxidación catalítica del agua, formando protones, electrones y O₂ molecular. Los electrones se transportan mediante la cadena de transporte fotosintética para promover la producción de NADPH mediante la reducción de ferredoxina. Dentro del lumen tilacoidal se genera un gradiente electroquímico debido a la liberación de protones después de la oxidación de agua, el cual se emplea para la formación de ATP mediante la vía ATP sintasa. Los productos de la fotosíntesis NADPH y ATP son sustratos del ciclo de Calvin (Beer *et al.*, 2009), en donde la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa (Rubisco) cataliza la conversión de CO₂ y ribulosa-5-fosfato en dos triosas, las cuales son convertidas subsecuentemente en piruvato y acetil-CoA (Fischer *et al.*, 2008). Las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas dentro del cloroplasto por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) para la síntesis de malonil-CoA (Hu *et al.*, 2008), molécula que es transferida a la proteína acarreadora de grupos acil (ACP) del complejo multienzimático sintasa de ácidos grasos (SAG). La subunidad cetoacil-ACP sintasa (CAS) cataliza la condensación de malonil-ACP mediante tres reacciones cíclicas: reducción, deshidratación y reducción; condensando el producto con otra molécula de malonil-CoA (Guschina y Harwood, 2006). El ciclo se repite hasta formar cadenas saturadas de ácido palmítico (C16:0) o esteárico (C18:0). La enzima ACP-sintasa abre la cadena acil y libera el ácido graso (Scott *et al.*, 2010).

En la tabla IV se muestran algunos ácidos grasos presentes en microalgas.

Tabla IV. Presencia de ácidos grasos en microalgas.

Ácido graso	Presencia	Referencia
C16 y C18 (saturados y monoinsaturados)	Variación en abundancias en distintos grupos de microalgas	Borowitzka y Borowitzka, 1988; Hu <i>et al.</i> , 2008
C16:0 y C18:1 ω 9	Abundantes en la división <i>Chlorophyta</i>	Lang <i>et al.</i> , 2011
ácido α -linolénico ácido γ -linolénico	Presentes en la clase <i>Chlorophyceae</i>	Lang <i>et al.</i> , 2011
ARA, EPA y DHA	Frecuencia del 5% aprox. En 900 cepas de la clase <i>Chlorophyceae</i>	Lang <i>et al.</i> , 2011

2.3 Telómeros y microalgas

En cuanto a telómeros se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno ocasionan una actividad telomerasa defectuosa (Caradonna y Mauro, 2016), siendo de interés ya que se ha visto que la actividad de la telomerasa está presente en la mayoría de los tumores (D'Souza *et al.*, 2013). Una disminución en su actividad causa acortamiento de los telómeros iniciando la senescencia prematura, siendo la interacción de los antioxidantes de interés ya que al reducir las ERO se reducen la pérdida de la actividad telomerasa (Zeihner *et al.*, 2004).

Los telómeros en microalgas han sido poco estudiados; sin embargo se reporta que extractos crudos de microalgas han presentado actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer (HeLa), lo que sugiere la existencia de metabolitos secundarios específicos que podrían interferir con la mitosis celular, probablemente como resultado de la inhibición o regulación sobre la actividad de la telomerasa (Moo-Puc *et al.*, 2009). En la tabla V se muestran los estudios realizados en microalgas en cuanto a la longitud de los telómeros.

Tabla V. Antecedentes del estudio de telómeros en microalgas.

Referencia	Organismo	Hallazgo
Ševčíková <i>et al.</i> , 2013	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	Alta actividad de telomerasa, con aumentos finalizando la fase oscura.
Fulnečková <i>et al.</i> , 2012	Orden <i>Chlamydomonadales</i>	Secuencia telomérica de tipo <i>Arabidopsis</i> es ancestral para las microalgas verdes.

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la microalga *Desmodesmus.communis* es importante para generar conocimiento básico, ya que su plasticidad metabólica le permite en condiciones de estrés como el consumo de nitrógeno evaluar el potencial para la producción de compuestos bioactivos y su posterior escalamiento biotecnológico.

4. HIPÓTESIS

Si el consumo de nitrógeno durante el crecimiento de la microalga *Desmodesmus communis* provoca una disminución del contenido de proteínas, clorofila, ácidos grasos y el nitrógeno intracelular, entonces la relación C:N aumentará y se espera que la longitud de los telómeros se acorten.

En el cultivo de *Desmodesmus communis* las bacterias asociadas a la microalga contribuirán aportando nitrógeno orgánico.

5. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo de nitrógeno en la respuesta de la microalga *Desmodesmus communis* en cuanto a nitrógeno intracelular, contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, pigmentos, bacterias presentes en el cultivo de la microalga y la longitud de los telómeros.

b. Objetivos específicos

1. Determinar si la microalga *Desmodesmus communis* se encuentra en condición de deficiencia de nitrógeno mediante la medición de la relación C: N y el contenido de nitrógeno elemental.
2. Evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la tasa de crecimiento, productividad y composición bioquímica de la biomasa de la microalga *Desmodesmus communis* en diferentes fases de crecimiento.
3. Evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre el perfil de ácidos grasos y pigmentos de la biomasa microalgal en diferentes fases de crecimiento de la microalga *Desmodesmus communis*.
4. Determinar la presencia de bacterias asociadas al crecimiento de la microalga *Desmodesmus communis* en diferentes fases de crecimiento.
5. Evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la longitud de los telómeros de la microalga *Desmodesmus communis* en diferentes fases de crecimiento.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico y condiciones de cultivo

Desmodesmus communis fue colectada y aislada de la presa Miguel Hidalgo de Ciudad Victoria, Tamaulipas en el año 2009 por la M. en C. Mónica Rodríguez Palacios del Laboratorio de Fitoplancton de la UAM-Iztapalapa. Fue donada al cepario del CIBNOR en donde se mantiene con la clave CIB53 desde el año 2009. La cepa fue identificada mediante microscopía electrónica de transmisión por el Dr. Eberto Novelo Maldonado del Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía. Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias de la UNAM. En la figura 3 se muestra *Desmodesmus communis* imagen obtenida con un microscopio Nikon Eclipse E600, con contraste diferencial de interferencias (DIC) y cámara digital Nikon DXM1200E.

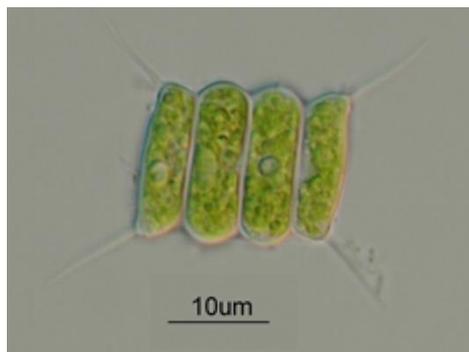


Figura 3. *Desmodesmus communis* identificada por el Dr. Eberto Novelo M.

La cepa de *D. communis* se cultivó en medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) adicionada de 10% de agua de mar, en matraces Erlenmeyer a de vidrio en un volumen final de 1.7 L. El cultivo se inició con un inóculo de 1×10^6 cél. mL⁻¹. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiancia incidente de $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo: 12 h luz: 12 h oscuridad, aireación continua, pH inicial de 7.8.

En las condiciones anteriores, se realizó la curva de crecimiento, tomando diariamente bajo condiciones de esterilidad, una alícuota de 5 mL de cultivo, la cual se contó en la cámara de Neubauer en un microscopio (Primo Star ZEISS),

como lo indica Arredondo-Vega y Voltolina (2017). Una vez conocida la curva de crecimiento, se seleccionaron los tiempos de muestreo (día 0, 5, 10, 12 y 17), en los cuales se tomaron 50 mL de cultivo, que se centrifugaron a 1428 x g, 10 °C durante 5 min en la centrifuga refrigerada (Allegra® X-15R). El sobrenadante de cada muestra, así como una parte de la biomasa fresca se mantuvieron en congelación a -20 °C y -80 °C respectivamente. Otra parte de la biomasa se liofilizó (liofilizadora LABCONCO Free Zone 1).

6.2 Análisis experimental

6.2.1 Determinación de peso seco, orgánico e inorgánico (Sorokin, 1973)

El peso seco total y cenizas se realizó de acuerdo a Sorokin (1973), la cual consiste en la separación de la biomasa del medio de cultivo mediante filtración al vacío en membranas de fibra de vidrio Whatman GF/F de tamaño de poro 0.7 µm previamente a peso constante. La biomasa filtrada se lavó con 10 mL de agua destilada. Primeramente, se ajustaron a peso constante los filtros a utilizar, esto se logró de la siguiente manera: se lavaron las membranas de fibra de vidrio con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente en un área en la que se encontraran protegidos de contaminantes. Una vez secos, se transfirieron a sobres de papel aluminio y se pre-quemaron a 490 °C por 6 h. Los filtros pre-quemados se colocaron en un desecador durante 1.5 h y se pesaron con una balanza analítica de cuatro dígitos (OHAUS PIONEER™), posteriormente se colocaron en un horno de secado (TERLAB TE-H35D) a 65 °C por 1 h y posteriormente en un desecador 1.5 h, esto último se repitió hasta verificar que el peso permaneciera constante.

Luego se tomó un volumen conocido del cultivo de la microalga y se filtró al vacío en las membranas de fibra de vidrio a peso constante. Las muestras de *Desmodesmus communis* se lavaron con 10 mL de agua destilada. Se guardaron los filtros en los sobres. Los sobres (entreabiertos) con el filtro se colocaron en el horno de secado (TERLAB TE-H35D) a 65 °C durante al menos 12 h. Después del secado, se colocaron los filtros en el desecador durante 1.5 h y se pesaron

rápidamente. Se introdujeron de nuevo los filtros al horno de secado a 65 °C por 1 h y enseguida 1.5 h en el desecador y se pesaron, esto se repitió hasta asegurarse que el peso permaneciera constante.

Por diferencia entre el peso del filtro vacío y el peso del filtro con la muestra y dividido entre el volumen de cultivo filtrado, se obtuvo el dato de peso seco total ($\mu\text{g mL}^{-1}$ o mg mL^{-1}). El filtro con la biomasa seca y pesada se incineró en una mufla (TERLAB MR) a 490 °C 6 h. Se introdujeron de nuevo los filtros al horno de secado 1 h a 65 °C, enseguida 1.5 h en el desecador y se pesaron, esto se repitió hasta asegurarse que el peso permaneciera constante. Por diferencia de peso entre el filtro vacío y el filtro con las cenizas, se obtuvo el peso inorgánico o peso de cenizas ($\mu\text{g mL}^{-1}$ o mg mL^{-1}). Por diferencia entre el peso del filtro con la muestra seca y el filtro con las cenizas, se obtuvo el peso orgánico.

6.2.2 Determinación de nitratos (Strickland y Parsons, 1972)

Del sobrenadante resultante de la cosecha del cultivo de cada tiempo muestreado, se destinaron 50 mL para determinar la concentración de nitrógeno presente en forma de nitratos. Para lo cual se realizó la metodología que se describe a continuación:

- a) Primeramente, se realizaron diluciones de las muestras con agua desionizada obteniendo un volumen total de 10 mL para para muestra, posteriormente se agregaron 200 μL de cloruro de amonio concentrado (125 g cloruro de amonio en 500 mL de agua desionizada).
- b) Después se procedió a la preparación de la columna de cadmio la cual fue empacada con 25 g de cadmio, el cual se lavó previamente tres veces con HCl al 10% hasta eliminar impurezas, y se enjuagó con agua corriente hasta que el pH de la solución fue superior a 6.
- c) Posteriormente se lavó con una solución diluida de cloruro de amonio (25 mL de la solución de amonio concentrado en 1 L de agua desionizada) por 5 veces y se escurrió.
- d) Enseguida se agregaron 50 mL de solución de sulfato de cobre al 2% y se agitó hasta que el color azul desapareció.

- e) Se enjuagó 3 veces con cloruro de amonio diluido.
- f) Posterior a la activación del cadmio se empacó la columna, se colocó en un equipo Quikchem FIA + y se procedió a colocar las muestras en el auto muestreador para su análisis. La curva de calibración de nitritos fue de 0.1 μM a 5 μM NO_3^{-1} .

6.2.3 Determinación de la relación carbono: nitrógeno elemental y la relación entre ^{13}C : ^{12}C y ^{15}N : ^{14}N (Peterson y Fry,1987)

La biomasa previamente liofilizada se pulverizó y homogenizó con un agitador de vórtice. Se pesaron en cada tiempo de cosecha y por duplicado 2 mg con una balanza RADWAG MYA 2.3Y, y se empaquetaron en cápsulas de estaño, para ser analizado posteriormente por un Analizador Elemental de Combustión, marca Costech, modelo ECS 4010, y con un Espectrómetro de Masas de Razones Isotópicas marca Thermo Scientific, modelo Delta V Plus. El análisis se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) Las cápsulas de estaño se introdujeron en el reactor de combustión.
- b) El gas portador de helio se conmuta a un volumen de oxígeno que es elegido por el operador dependiendo del tamaño y composición de la muestra.
- a) La muestra y la cápsula de estaño reaccionan con el oxígeno y se queman a 1020 °C, así es como la muestra se descompone en sus componentes elementales (N_2 : nitrógeno molecular y CO_2 : dióxido de carbono).
- b) Posteriormente estos elementos acarreados por el gas fluyen a través de la columna de separación por cromatografía de gases.
- c) Los gases se separan y son detectados secuencialmente por el detector de conductividad térmica (TCD). El TCD genera una señal que es proporcional a la cantidad de elemento en la muestra.
- d) El análisis de los datos se realizó con el software ISOdata 3.0 utilizando como estándar BBOT el cual tiene un porcentaje de nitrógeno elemental de 6.51% y de carbono elemental 72.53%. El software compara el pico elemental y calcula la relación isotópica con respecto al estándar conocido.

6.2.4 Determinación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951)

Se pesaron 5 mg de muestra liofilizada y pulverizada, se colocó en un tubo de vidrio limpio previamente lavado con Micro 90, enjuagado con agua destilada y secado y se siguieron los pasos que se describen a continuación:

- a) Se agregó 1 mL de NaOH 0.1 N y se colocaron los tubos en un baño ultrasónico (VWR ultrasonic cleaner) durante 5 min.
- b) Se agregaron 4 mL de NaOH 0.1 N y se colocó papel aluminio en la boca del tubo, se tapó con una tapa sin septo, se sometió a hidrólisis alcalina en un baño a 100°C durante 1 h, transcurrido el tiempo de hidrólisis se enfriaron los tubos a temperatura ambiente.
- c) El extracto alcalino se filtró pasando éste a través de una pipeta Pasteur limpia con un tapón de fibra de vidrio y recibiendo el extracto libre de partículas en otro tubo limpio y seco.

Posteriormente se procedió a realizar los cálculos de la alícuota para la cuantificación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951). La alícuota calculada se completó a 1 mL con NaOH 0.1 N, y se agitó en un *vortex* para su total homogenización y se procedió a realizar los pasos que se describen a continuación:

- a) Se agregó 5 mL de la solución C, la cual está compuesta de la solución A (Na_2CO_3 al 2 % (p/v) en NaOH 0.1 N) y la solución B (mezcla 1:1 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 5 % y tartrato de K al 1 %) en una proporción (50:1). Se mezcló en el *vortex* y dejó reposar 15 min.
- b) Transcurrido el tiempo de reposo se agregaron 500 μL de la solución 1:1 de Folin: H_2O destilada (solución D), se agitó en el *vortex* y dejó reposar en la oscuridad por 40 min.
- c) Después se leyó en un espectrofotómetro (HACH DR 5000) a 750 nm calibrando el equipo con un blanco preparado usando el mismo tratamiento que el de las muestras, pero utilizando 1 mL de NaOH 0.1 N en lugar de muestra. Previamente se realizó una curva de calibración con una solución concentrada de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albúmina sérica bovina

(BSA por sus siglas en inglés), a partir de la cual se preparó un gradiente de concentración de 0 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

6.2.5 Determinación de carbohidratos (DuBois *et al.*, 1956)

La determinación de carbohidratos se realizó utilizando el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956). Primeramente, se pesó 5 mg de muestra liofilizada, se colocó en un tubo de vidrio limpio previamente lavado con Micro 90, enjuagado con agua destilada y secado. Y se procedió a realizar los pasos que se describen a continuación:

- a) Se agregó 1 mL de H_2SO_4 1 M, se colocaron los tubos en un baño ultrasónico (VWR ultrasonic cleaner) durante 5 min y se agregaron 4 mL de H_2SO_4 1 M.
- b) Se colocó papel aluminio en la boca del tubo y se tapó con una tapa sin septo, luego se introdujeron los tubos a un termo baño (TERLAB) a 100 °C durante 1 h, transcurrido el tiempo de hidrólisis se enfriaron los tubos a temperatura ambiente.
- c) El extracto ácido se filtró pasando éste a través de una pipeta Pasteur limpia con un tapón de fibra de vidrio y recibiendo el extracto libre de partículas en otro tubo limpio y seco.
- d) Se agregó 1 mL de fenol al 5 % y se mezcló, se dejó reposar 40 min, enseguida se agregó lentamente 5 mL de H_2SO_4 concentrado todo esto en campana de extracción, se enfrió a temperatura ambiente y se leyó a 485 nm en un espectrofotómetro (Spectronic® 20 GENESYS™), calibrando el espectrofotómetro con un blanco que se prepara de la misma manera, sustituyendo el extracto ácido de la muestra con 1 mL de H_2SO_4 1M. Previamente se realizó una curva de calibración usando un gradiente de concentraciones de glucosa anhidra preparadas a partir de una solución de 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el gradiente de concentración fue de 0 a 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

6.2.6 Determinación de pigmentos, lípidos totales y ácidos grasos

Para la determinación de pigmentos se utilizó la técnica de Lamers *et al.* (2010). A partir de un volumen conocido del cultivo, se centrifugó a 1850 x g por 10 min a 5 °C y la pastilla celular obtenida se sometió a los siguientes pasos:

- a) Se agregó 4 mL de la mezcla cloroformo: metanol (2:2.5 v/v) y 5 µL antioxidante butil-hydroxi tolueno (BHT). Se homogenizó con vortex por 1 min y se introdujeron los tubos en baño un baño ultrasónico (VWR ultrasonic cleaner) con hielo por 20 min.
- b) Posteriormente se agregaron 2.5 mL de la mezcla TRIS ácido: TRIS base: NaCl 1M (3:0.4:5 v/v) con pH de 7.5, para facilitar la separación de la fase acuosa y orgánica (Mulders *et al.*, 2014). Se homogenizó con vortex 1 min, se colocaron los tubos en un baño ultrasónico (VWR ultrasonic cleaner) con hielo 20 min y se centrifugó a 1850 x g por 15 min a 10°C.
- c) Se recuperó la fase inferior con pipeta Pasteur nueva mediante burbujeo y se colocó en un tubo de vidrio con tapón de rosca limpio.
- d) Para recuperar los lípidos y pigmentos remanentes, se agregó 1 mL de cloroformo al tubo anterior, y se repitieron los pasos de homogenizar, sonicar y centrifugar.
- e) Finalmente se recupera el segundo extracto (lípidos y pigmentos) con una pipeta Pasteur nueva mediante burbujeo y se colocaron en el tubo en donde está el primer extracto.

6.2.7 Pigmentos (Lamers *et al.*, 2010)

Para recuperar solamente los pigmentos, del extracto anterior se tomó una alícuota calculada primeramente con los valores anteriormente reportados para esta microalga en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas en CIBNOR por la estudiante de licenciatura Diana Kareli Valenzuela y se realizó la metodología que se describe a continuación:

- a) Se utilizó una alícuota de 0.5 mL, se colocó en un tubo limpio y se secó con nitrógeno gaseoso.
- b) Después del secado se agregaron 3 mL de acetona al 100 % grado HPLC y se procedió a realizar el cálculo del volumen de inyección, el cual se realizó utilizando los valores determinados mediante espectrofotometría de clorofila *a* clorofila *b* y carotenoides totales obtenidos midiendo la absorbancia a 470 nm, 645 nm y 662 nm, esto con la finalidad de que cada pigmento se encuentre dentro del intervalo lineal de la curva de calibración (2 a 10 ng) que se realizó con siete estándares de pigmentos (fucoxantina, violaxantina, diadinoxantina, astaxantina *trans*, zeaxantina, luteína, cantaxantina, clorofila *b*, xantofila, β -caroteno *cis*, criptoxantina, clorofila *a* y β -caroteno *trans*).
- c) Las alícuotas (entre 1 y 8 μ L) se inyectaron en un HPLC 1200 Infinity series Agilent Technologies.

6.2.8 Lípidos totales (Marsh y Weinstein, 1966)

Se calculó la alícuota correspondiente del extracto clorofórmico a utilizar para que se encuentre en el intervalo lineal de la curva de calibración que va de 30 a 180 μ g de lípidos. Se utilizaron los datos de concentración de lípidos previamente obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas en CIBNOR por la estudiante Diana Kareli Valenzuela y se procedió a realizar la metodología que se describe a continuación:

- a) El volumen calculado se encontró entre 50 y 70 μ L de extracto.
- b) Se colocó en un tubo limpio con tapón de rosca, se secó con nitrógeno, se agregó 2 mL de H₂SO₄ concentrado y se tapó la boca del tubo con papel aluminio y se cerró el tubo hasta el primer tope, sin apretar demasiado.
- c) Posteriormente se colocó el tubo en un horno TERLAB TE-H35D a 200°C por 15 min, después de transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente.

- d) Se agregaron lentamente con el tubo inclinado 3 mL de agua destilada, se homogenizó con *vortex* hasta que se mezcló el agua y el ácido y dejar reposar en baño de hielo por 5 min.
- e) Enseguida se leyó la absorbancia a 375 nm en un espectrofotómetro Spectronic® 20 GENESYS™, calibrando previamente el equipo con un blanco de H₂SO₄ que se trató de igual manera que las muestras.

6.2.9 Ácidos grasos (Sato y Murata, 1988)

Se colocó el resto del extracto total de cloroformo en un tubo de tapón de rosca limpio, se secó con nitrógeno gaseoso y se procedió a realizar la metodología que se describe a continuación:

- a) Se agregaron 2.5 mL de la mezcla de HCl:CH₃OH (5:95 v/v). El tubo se tapó y se cerró apretando fuerte para evitar la evaporación de la muestra se selló con cinta teflón por dentro y fuera de la tapa, la cual debe tener una cubierta de teflón para evitar que los solventes disuelvan los plásticos de la parte interior de la tapa. Una vez selladas las tapas, los tubos se colocaron en un termo baño (TERLAB) a 85 °C durante 2.5 h.
- b) Los metilésteres obtenidos de la reacción de derivatización se extraen con 1.5 mL de hexano grado HPLC. Se repite la extracción dos veces. El extracto total de ácidos grasos en hexano grado HPLC se recupera en un nuevo tubo limpio. Para inyectar se calculó el volumen de extracto en hexano para tener una concentración de ácidos grasos totales de 1200 µg mL⁻¹ y se inyectaron entre 1 y 3 µL en el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas HP-GCD1800B con detector de ionización electrónica. La curva de calibración se realizó una mezcla de estándares de 31 ácidos grasos metil-esterificados marca Sigma.

6.2.10 Determinación de bacterias presentes

Para cultivar las bacterias presentes, cultivables por medios convencionales se tomaron 300 mL del sobrenadante del medio de cultivo resultante de la cosecha de biomasa a los diferentes tiempos (0, 5, 10, 12 y 17 días). Para detectar bacterias que no se desarrollen en medios de cultivo, se aisló ADN, se amplificó con oligonucleótidos dominio bacteria y se enviaron a secuenciación parcial.

De los 300 mL separados del sobrenadante, se centrifugaron 250 mL a 13 000 x *g* durante 5 min en una centrifuga eppendorf 5804 R, y la pastilla celular resultante fue suspendida en 1 mL de sobrenadante, de este se tomaron 100 µL y se inocularon por siembra masiva en placas Petri con el mismo medio en el que se cultivaron las algas y en Agar nutritivo para cada tiempo de cosecha. Se incubó a 35 °C hasta observar crecimiento. Posteriormente, de las colonias obtenidas se sembraron por estría cruzada para determinar pureza y se determinó su morfología colonial.

Con los 50 mL restantes de medio se centrifugaron a 13 000 x *g* durante 5 min (eppendorf 5804 R) para formar una pastilla celular suspendida en 1 mL de sobrenadante, el cual fue utilizado para realizar la extracción de ADN de la comunidad bacteriana.

6.2.10.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN, tanto de las colonias obtenidas como de los pellets obtenidos a los diferentes tiempos de cosecha, se llevó a cabo utilizando FastDNA®SPIN kit for soil, como se describe a continuación:

- a) Se agregaron al pellet 978 µL de Buffer de fosfato de sodio y 122 µL de buffer MT, se realizó la ruptura celular con el uso de FastPrep® a 6.0 m/s durante 40 s.
- b) Se centrifugó a 13 000 x *g* durante 10 min en una microcentrifuga (VWR 2416), se transfirió el sobrenadante a tubos de 2.0 mL y se agregaron 250 µL de PPS y se mezcló 10 veces.
- c) Posteriormente, se centrifugó a 13 000 x *g* durante 5 min y se transfirió el sobrenadante a tubos de 15 mL, se agregó 1 mL de Binding matrix, se

invertió por 2 min y se dejó precipitar durante 10 min a temperatura ambiente.

- d) Se descartó el sobrenadante hasta quedar aprox. 1.2 mL, se resuspendió la Binding matrix y se transfirieron 600 μ L a un SPIN filtre y se centrifugo 13 000 x g por 1.5 min, posteriormente se repitió la transferencia de 600 μ L al SPIN filtre y se centrifugo nuevamente.
- e) Enseguida se procedió a hacer un lavado para el que se agregaron 500 μ L de SEWS- M y se centrifugo a 13 000 g por 1.5 min, para eliminar todo el alcohol presente se centrifugó nuevamente a 13 000 x g durante 2.5 min y se pasó el SPIN filtre a un tubo nuevo, se dejó secar 5 min a temperatura ambiente y luego se procedió a eluir el ADN de la matriz con 50 μ L de DES, se resuspendió, se incubó por 5 min a 55°C y se centrifugó a 13 000 x g por 1 min el ADN extraído se resguardo a -20°C.

6.2.10.2 Electroforesis

Después de la extracción de ADN se realizó una electroforesis en agarosa al 1%, con bromuro de etidio, a 100V durante 30 min. El patrón electroforético se documentó en un equipo Molecular Imagen® Gel DOC TM XR+.

Una vez obtenido el ADN de las bacterias y corroborado una buena concentración en gel se procedió a amplificar con primers de dominio bacteria y enviar a secuenciar.

En cuanto al ADN de la fracción del sobrenadante después de comprobar una buena concentración por medio de electroforesis y nanodrop, se inició el procedimiento para obtener el perfil de la comunidad bacteriana por medio de SSCP de sus siglas en inglés (Single Stranded Conformational Polymorphism).

6.2.10.3 SSCP (Schwieger y Tebbe, 1998)

La técnica comprende los siguientes pasos

1. Extracción de ADN
2. Amplificación por PCR
3. Digestión de una cadena de ADN

4. Electroforesis en gel de poliacrilamida
5. Tinción del gel

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para el ADN correspondiente a los tiempos de cosecha se procedió a realizar reacción de PCR en un termociclador TECHNE TC - 312. La reacción de PCR se preparó de la siguiente manera:

Reactivos	1Rx
Buffer 5x Gotaq (7.5 mM HgCl ₂)	5 µL
dNTP's (c/u 10 mM. 40mM Total)	0.5 µL
F (10 mM)	0.25 µL
R (10 mM)	0.25 µL
Go Taq (5 u/ µL)	0.125 µL
Templado	0.5 µL
H ₂ O	18.375 µL

Tabla VI. Programa de PCR (para técnica SSCP).

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Inicio	94°C	3 min	
Desnaturalización	94°C	1 min	
Alineamiento	50°C	1 min	30 ciclos
Extensión	72°C	1 min	
Elongación final	72°C	5 min	
Conservación	26°C	∞	

Se comprobaron los productos de PCR mediante electroforesis como se describe en el apartado 6.2.10.2.

Después, procedimos a purificar los productos de PCR con el kit QIAquickspin column como de describe a continuación:

- a) En un tubo colector de 2.0 mL, se centrifugó por 1min a 9 000 x *g*, se descartó lo obtenido en el tubo colector y se colocó la columna de nuevo en el tubo
- b) Para el lavado se adiciono 0.75 mL de buffer PE y se centrifugó a 9 000 x *g* durante 1 min, se descartó lo obtenido en el tubo colector y se centrifugó adicionalmente 9 000 x *g* durante 1 min para eliminar totalmente el etanol residual proveniente del buffer PE.
- c) Posteriormente se colocó la columna en un tubo de microcentrifuga limpio con capacidad de 1.5 mL. Para eluir el ADN se utilizaron 30µL de buffer EB (10mM Tris – Cl, pH 8.5), se dejó reposar por 1 min y luego se centrifugo a 13 000 x *g* por 1 min.

Electroforesis acrilamida

Se prepararon las placas, se limpiaron con etanol y se adiciono a la placa grande Repel Silano y a la chica Bind Silano.

El gel se preparó a una concentración de 0.625% en las proporciones a continuación:

Tabla VII. Mezcla de reacción gel de acrilamida.

Componente	Volumen
Volumen final:	20 mL
Solución MDE 2x	6.25 mL
TBE 10x	2 mL
Agua bidestilada	11.752 mL
TEMED	8 µL
APS 40%	20 µL

Digestión de productos de PCR

La digestión de los productos de PCR se realizó como se muestra la mezcla de reacción:

Tabla VIII. Mezcla de reacción para digestión.

Componente	Volumen
λ - exonucleasa	1 μ L
λ - exonucleasa Buffer	3 μ L
H ₂ O desionizada	6 μ L
Productos de PCR	20 μ L

Una vez preparada la reacción se mezcló e incubó a 37 °C por 45 min. Una vez concluido el tiempo de incubación se procedió a purificar inmediatamente con el kit MiniElute, Qiagen.

Posteriormente se adicionó a la muestra 9 μ L de Buffer de carga para SSCP, se incubó a 95 °C durante 2 min, enseguida se incubó en hielo 3 min y se cargó el gel con el estándar y las muestras. Las condiciones de la electroforesis fueron: 350 V, 85 mA, 20 °C durante 18 h.

Tinción del gel con nitrato plata

Una vez terminada la electroforesis se colocó el gel en una charola de acero inoxidable y se siguieron los pasos que se describen a continuación:

- Se adicionó la solución fijadora y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.
- Posteriormente se enjuagó con agua desionizada, se eliminó el agua y se adicionó la solución de nitrito de plata y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.
- Se eliminó la solución de nitrito de plata, se enjuagó con agua desionizada y se transfirió el gel a otra charola en donde se adicionó la solución

reveladora agitando suavemente hasta que las manchas tuvieron la intensidad deseada.

d) Se desechó la solución reveladora y se paró el revelado con solución fijadora.

e) Para finalizar enjuagando el gel con agua desionizada.

6.2.11 Determinación de la longitud de los telómeros

Primeramente, se realizó la digestión enzimática de las muestras de DNA genómico (1-5 µg) con las endonucleasas *Rsa* I y *Taq* I. Posteriormente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.

Southern blot

Primeramente, se realizó lavado del gel con agua destilada y se colocó sobre un recipiente que contenía 300 mL (10 veces el volumen del gel) de HCl 0.25M. Se agitó por 30 min a temperatura ambiente muy suavemente para evitar romperlo. Esto se hace para la despurinación parcial de los fragmentos de DNA. Se descartó el HCl y el gel se enjuagó rápidamente con 300 mL de agua destilada. Se adicionaron 300 mL solución de desnaturalización (NaCl 1.5 M/NaOH 0.5 M) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Se reemplazó esta solución por otros 300 mL de la misma solución fresca a temperatura ambiente y se incubó por otros 20 min. En este paso el DNA queda de cadena sencilla para el subsecuente análisis de hibridación. Se descartó la solución de desnaturalización y el gel se enjuagó con agua destilada. Se adicionaron 300 mL de solución neutralizante NaCl 1.5 M/Tris-HCl 0.5 M pH 7.0 fresca y se agitó a temperatura ambiente por otros 20 min. Se reemplazó por otros 300 mL de solución de neutralización fresca y se agitó por otros 20 min. Es necesario mantener un pH menor a 9.0 para la hibridación.

Para realizar la transferencia, en un recipiente de plástico rectangular de aproximadamente 500 mL se adicionaron 300 mL de solución SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio dihidratado 0.3 M pH 7.0) y dentro de este recipiente se colocó una superficie de acrílico sobre la cual depositó una tira de papel filtro 3 veces más largo que el tamaño del gel y se humedeció con solución SSC 20X. En seguida, se colocaron 3 piezas de papel filtro del mismo tamaño del gel y se

humedecieron con solución SSC 20X. Se colocó el gel sobre el papel filtro descartando todas las burbujas (usando una pipeta como rodillo) y posteriormente una pieza de membrana de nylon con carga positiva, previamente hidratada en agua destilada durante 5 min. Se evitó la formación de burbujas. Sobre la membrana se colocaron 3 piezas del mismo tamaño de la membrana de papel filtro humedecidas en la misma solución. Sobre el papel filtro se colocó una base de 10 centímetros de papel sanitas del mismo tamaño de la membrana. Finalmente, se colocó una placa de acrílico o cristal para dar estabilidad a la torre, se colocó un peso de 0.5 kg y se dejó a temperatura ambiente durante 2 días.

Desensamble de la transferencia.

Se retiraron el papel sanita y filtro que recubrían la membrana y se marcó con un lápiz la orientación. Se enjuagó la membrana con SSC 2X y se colocó sobre papel Whatmann 3MM y se dejó secar a temperatura ambiente. Se realizó la tinción del gel transferido con bromuro de etidio para valorar la eficiencia de la transferencia.

Inmovilización o fijado.

La inmovilización se realizó con luz UV en un UV Cross-linker 1800 de Stratagene con la membrana de nylon completamente seca antes de la irradiación. Se aplicó una potencia de 1200 Joules/cm².

Marcado de la sonda.

Para esto se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Tabla IX. Mezcla de reacción para marcado de la sonda.

Reactivos	Concentración de stock	Volumen por c/u
Agua	Desionizada	14 μ L
Buffer de reacción para T4 polinucleótido cinasa (NEB)	10X	2 μ L
Sonda TELPR-3A	100 ng	1 μ L
T4 polinucleótido cinasa	10 Unidades/ μ L	1 μ L
[γ - ³² P] ATP 9.25MBq (250 μ Ci/25 μ L)	10 μ Ci	2 μ L

Se dio una centrifugación rápida para bajar toda la mezcla de reacción, se incubó a 37 °C por 60 min y se agregaron 180 μ L de buffer TE para inactivar la actividad de la enzima. Posteriormente, se tomó 1 μ L de la mezcla (101 419 cpm/ μ L.) y adicionaron a 0.5 mL de líquido de centelleo para cuantificar el marcaje total, el resto (199 μ L) se pasaron a través una columna de Sephadex G25 (1 mL) para eliminar el nucleótido radioactivo no incorporado y se centrifugó a 400 x g por 5 min para eliminar la marca no incorporada. La sonda quedó a una concentración de (35940 cpm/ μ L). El porcentaje de eficiencia de incorporación fue de 35.5%.

Hibridación

Para realizar la hibridación se agregó la sonda marcada desnaturalizada (2028380 cpm/mL) al buffer de hibridación (fosfato de sodio 0.5 M, pH 7.5; SDS al 7%) y se incubó a 55 °C durante la noche en un horno de hibridación rotatorio marca mrc. Transcurrido el periodo de hibridación, la membrana se lavó a 55 °C en SSC 2X conteniendo SDS al 0.1%.

Visualización

La membrana húmeda se cubrió con plástico de envoltura de alimentos (Plastipack) y se expuso a una película Imaging Screen K de Bio Rad por 24 h y se leyó en un sistema Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad) (E. Sykorova 2003). La imagen se exportó como jpg.

6.3 Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía, para conocer si existen diferencias estadísticas significativas a través del programa IBM SPSS Statistics, con prueba de Duncan con α de 0.05. Para la elaboración de las figuras se empleó el programa Excel de Microsoft Office. En las gráficas y tablas que se muestra el promedio y el error estándar de cada replica.

7. RESULTADOS

En la figura 4 se muestra la curva de crecimiento realizada, donde se muestra la fase de crecimiento exponencial del día 0 al 5, y la fase estacionaria del día 5 al 17 ($F_{17,129} p= 0.001$).

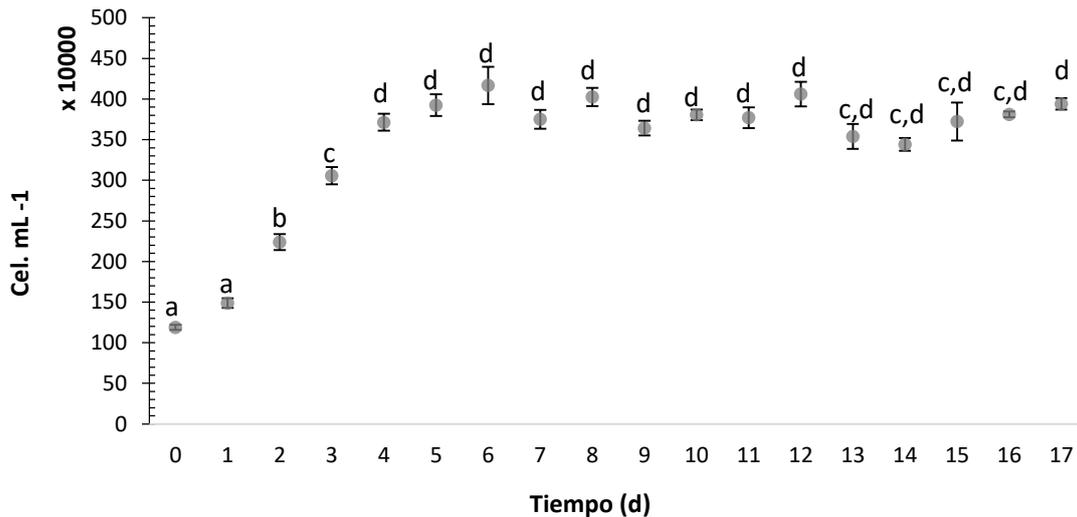


Figura 4. Curva de crecimiento *D. communis*. (cél mL⁻¹ en función del tiempo de cultivo en días). Las letras indican diferencias significativas entre los días de cultivo según el test de Duncan ($\alpha 0.05$).

En la tabla X se muestran los cálculos de la tasa de crecimiento correspondiente a la fase exponencial, así como el tiempo de generación.

Tabla X. Tasa de crecimiento y tiempo de generación.

Tasa de crecimiento		Tiempo de generación
Tiempo (d)	μ d ⁻¹	14.6 h
0-5	0.23	

En la figura 5 se muestra el rendimiento de la biomasa del cultivo de *D. communis* (mg L⁻¹) con respecto al tiempo (d). Se observó que hubo un aumento gradual y

significativo ($F_{4,10} p= 0.001$) en los distintos días de cultivo; iniciando en el día 0 con 148.4 mg L^{-1} y para el día 17 se obtuvo 552.73 mg L^{-1} .

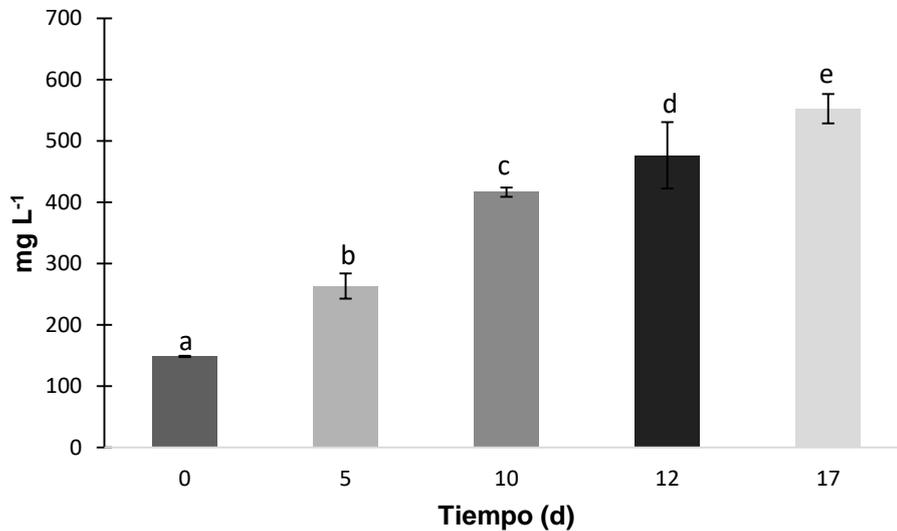


Figura 5. Rendimiento de la biomasa del cultivo de *D. communis* mg L^{-1} , en función del tiempo de cultivo (d). Las letras indican diferencias significativas entre los días de cultivo según el test de Duncan ($\alpha 0.05$).

La figura 6 muestra la productividad de la biomasa ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), observando que el valor mayor se obtuvo en el día 5 ($53 \pm 2.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), disminuyendo significativamente ($F_{4,10} p= 0.001$) hasta $32.53 \pm 0.79 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en el día 17.

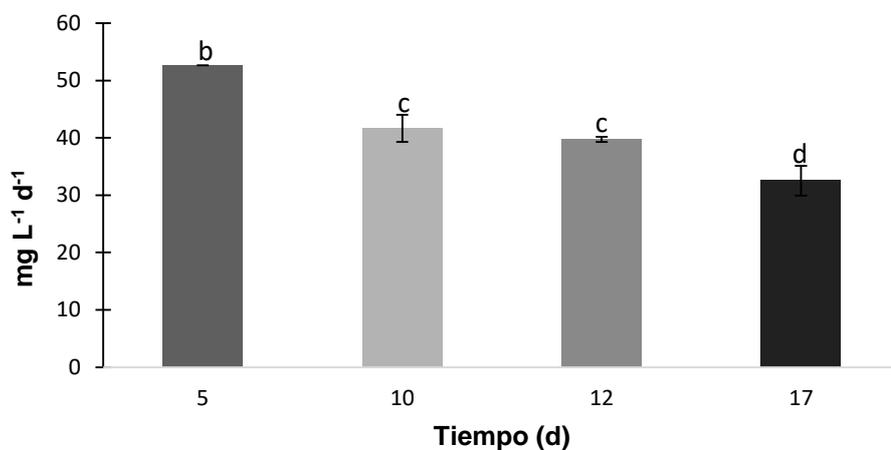


Figura 6. Productividad de la biomasa del cultivo de *D. communis* ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) en función del tiempo de cultivo (d). Las letras indican diferencias significativas entre los días de cosecha según el test de Duncan ($\alpha 0.05$).

Determinación de peso seco, orgánico e inorgánico

En la figura 7 se muestra que de un porcentaje del 100% que representa al peso seco, en el tiempo 0 está conformado de un 80.43% \pm 0.001 de peso orgánico y un 19.57% \pm .001 de peso inorgánico. Tanto el peso orgánico como el peso inorgánico variaron significativamente ($F_{4,10} p= 0.001$) en el día 5, disminuyendo a 75.86% \pm 1.46 y aumentado a 24.14% \pm 1.46, respectivamente. En siguientes días hubo un aumento significativo en el peso orgánico, con 87.44% \pm 1.11 en el día 10, 89.47% \pm 0.77 en el día 12 y 90.15% \pm 1.04 en el día 17, y una disminución significativa en el peso inorgánico con 12.56% \pm 1.11 en el día 10, 10.53% \pm 0.77 en el día 12 y 9.85% \pm 1.04 en el día 17, en comparación con los días 0 y 5, tanto el peso orgánico, como el inorgánico se mantuvieron sin modificaciones significativas entre los días 10, 12 y 17.

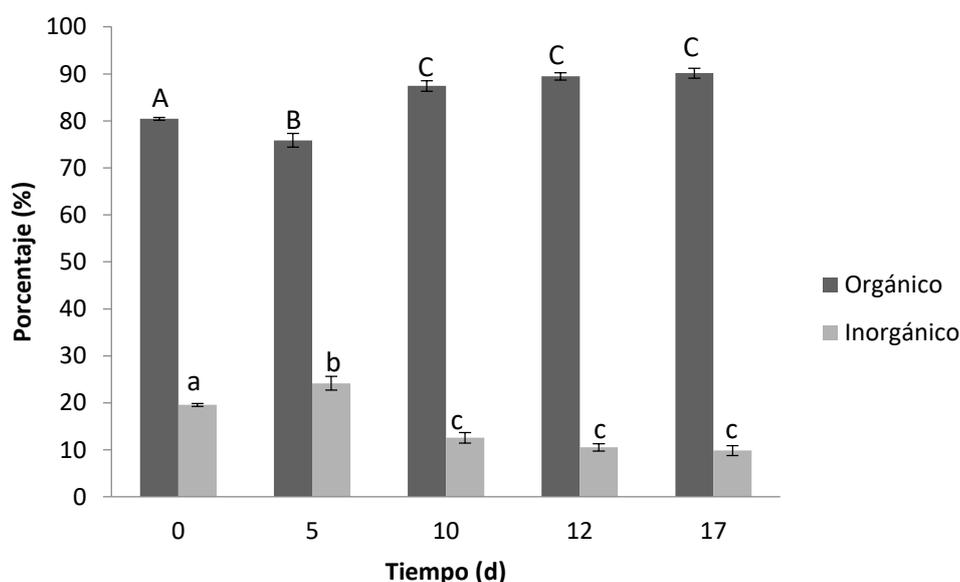


Figura 7. Porcentaje de peso orgánico y peso inorgánico de la biomasa del cultivo de *D. communis* con respecto al tiempo (d). Las letras indican diferencias significativas entre los días de cosecha según el test de Duncan (α 0.05).

Determinación de nitratos

En la tabla XI se muestran los resultados de la cuantificación de nitratos del sobrenadante del cultivo de *D. communis* obtenido al inicio del experimento (día

0) y en los días de muestreo (5, 10, 12 y 17). La concentración inicial de nitratos en el día 0 fue de $445 \pm 9.9 \mu\text{M}$. Se observó que para el día 5 hubo una disminución drástica y significativa ($F_{4,10} \rho = 0.001$) donde se obtuvo $3.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$, mientras que para los días 10 y 12, no se obtuvieron diferencias significativas. Para el día 17 no fue posible detectar nitratos debido a que su concentración en el medio fue muy baja o nula.

Tabla XI. Concentración de nitratos (μM) en medio de cultivo de *D. communis*, en los diferentes tiempos de muestreo (d). Las letras indican diferencias significativas entre los días de cosecha según el test de Duncan ($\alpha 0.05$).

Tiempo (d)	μM
0	445 ± 9.9^a
5	3.2 ± 0.8^b
10	4.3 ± 1.2^c
12	1.5 ± 0.3^b
17	ND

Determinación de la relación carbono nitrógeno intracelular

A continuación se muestra (Tabla XII) la relación carbono: nitrógeno intracelular realizado con la biomasa obtenida en los días de cultivo 0, 5, 10, 12 y 17, en donde podemos observar que la relación carbono: nitrógeno presentó aumento significativo ($F_{4,5} \rho = 0.001$) entre los días 0, 5 y 10 habiendo en el día 0, 8.25 ± 0.05 átomos de carbono por cada átomo de nitrógeno, y en el día 5, 12.4 ± 0.80 átomos de carbono por cada átomo de nitrógeno y en el día 10, 24.15 ± 0.05 átomos de carbono por cada átomo de nitrógeno. Entre los días 12 y 17 no se presentó una disminución significativa en la relación C: N, habiendo 28.25 ± 0.45 , y 29.70 ± 0.45 átomos de carbono por cada átomo de nitrógeno, respectivamente.

Tabla XII. Relación carbono: nitrógeno intracelular de la biomasa del cultivo de *D. communis*. Las letras indican diferencias significativas entre los días de cosecha según el test de Duncan (α 0.05).

Tiempo (d)	C:N
0	8.25± 0.05 ^a
5	12.4± 0.80 ^b
10	24.15± 0.05 ^c
12	28.25± 0.45 ^d
17	29.70± 0.30 ^d

En la tabla XIII se muestra la relación intracelular del isotopo estable N¹⁵ y N¹⁴ realizada con biomasa obtenida en los días de cultivo 0, 5, 10, 12 y 17. En donde se observa aumento significativo ($F_{4,5}$ $p=$ 0.001) entre el día 0 con 4.185 ± 0.025 , y el resto de los días de cultivo.

Tabla XIII. Relación ¹⁵N: ¹⁴N de la biomasa del cultivo de *D. communis*. Las letras indican diferencias significativas entre los días de cosecha según el test de Duncan (α 0.05).

Tiempo (d)	¹⁵ N: ¹⁴ N
0	4.185 ± 0.025 ^a
5	5.975 ± 0.85 ^b
10	5.625 ± 0.215 ^{b c}
12	5.525 ± 0.075 ^c
17	5.585 ± 0.045 ^{b c}

En la tabla XIV se muestra la relación intracelular del isotopo estable C¹³ y C¹² realizada con biomasa obtenida en los días de cultivo 0, 5, 10, 12 y 17. En donde se observa disminución significativa ($F_{4,5}$ $p=$ 0.004) entre el día 0 con -10.73 ± 0.026 , y el resto de los días de cultivo, día 5 con $9,76 \pm 0.04$, día 10 con $-8,94 \pm 0.03$, día 12 con $-9,1 \pm 0.25$ y día 17 con $-9,72 \pm 0.07$.

Tabla XIV. Relación $^{13}\text{C} : ^{12}\text{C}$ de la biomasa del cultivo de *D. communis*. Las letras indican diferencias significativas entre los días de cosecha según el test de Duncan (α 0.05).

Tiempo (d)	$^{13}\text{C} : ^{12}\text{C}$
0	-10.73 ± 0.26^a
5	-9.76 ± 0.04^b
10	-8.94 ± 0.03^c
12	-9.1 ± 0.25^c
17	-9.72 ± 0.07^b

Determinación de proteínas

En la figura 8 se presenta el porcentaje de proteínas con respecto al peso seco de la biomasa de *D. communis*. Al inicio del cultivo (día 0) fue de $10.71 \% \pm 1.13$. Para el día 5 fue de $8.95 \% \pm 0.35$. Se observó una disminución significativa ($F_{4,5}$ $\rho = 0.002$) en los días 10, 12 y 17 con respecto a los días 0 y 5, pero se mantuvo sin cambios significativos entre esos días.

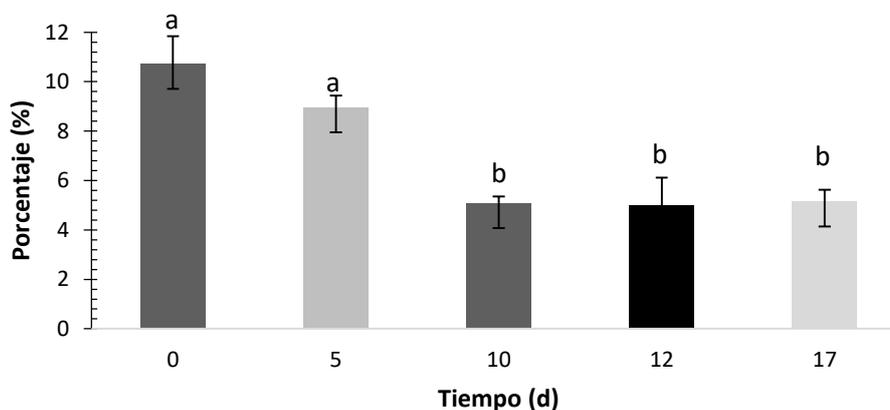


Figura 8. Porcentaje de proteínas con respecto al peso seco de *D. communis* con respecto al tiempo de muestreo (0, 5, 10, 12 y 17 días). Las letras indican diferencias significativas entre los días de muestreo según el test de Duncan (α 0.05).

Determinación de carbohidratos

En cuanto al porcentaje de carbohidratos se observó un aumento significativo ($F_{4,5} \rho = 0.001$). Al inicio del cultivo (día 0) fue de $9.83\% \pm 0.62$. En el día 5 se obtuvo $23.52\% \pm 3.35$, mientras que el valor máximo fue de $34.86\% \pm 0.97$ en el día 10, manteniéndose sin cambios significativos entre los días 10, 12 y 17 (Fig. 9).

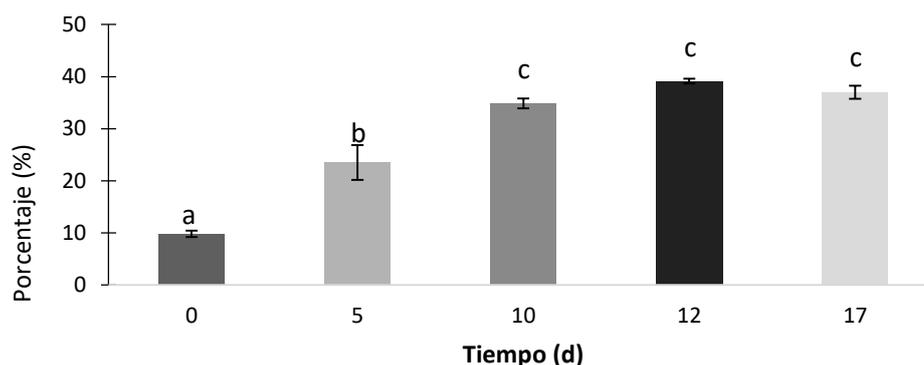


Figura 9. Porcentaje de carbohidratos de *D. communis* con respecto al peso seco en los diferentes tiempos de muestreo (0, 5, 10, 12 y 17 días). Las letras indican diferencias significativas entre los días de muestreo según el test de Duncan ($\alpha 0.05$).

Determinación de pigmentos, lípidos totales y ácidos grasos

En la figura 10 se muestra el perfil cuantitativo de pigmentos de *D. communis*. Al inicio del cultivo (día 0) se encontraron clorofila *a*, clorofila *b*, luteína, feofitina *b*, violaxantina, cis-neoxantina y feoforbides (feoforbide 1 y feoforbide 2). Siendo la clorofila *b* el pigmento más abundante seguido de la luteína y la clorofila *a*. En el día 5 se presentó una drástica disminución en la clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *b*, la cual se agotó en una totalidad. En cuanto a la luteína y la violaxantina, éstas disminuyeron significativamente ($F_{4,5} \rho = 0.002$). La cis-neoxantina no presentó diferencias significativas, sin embargo los feoforbides 1 y 2 aumentaron significativamente. En el día 10, se observa una disminución significativa en la concentración de los pigmentos feoforbides 1 y 2. En cuanto al pigmento cis-neoxantina éste disminuyó significativamente con respecto al día 0. Para los días 12 y 17, estos no presentaron diferencias significativas con respecto a los pigmentos del día 10.

Pigmentos

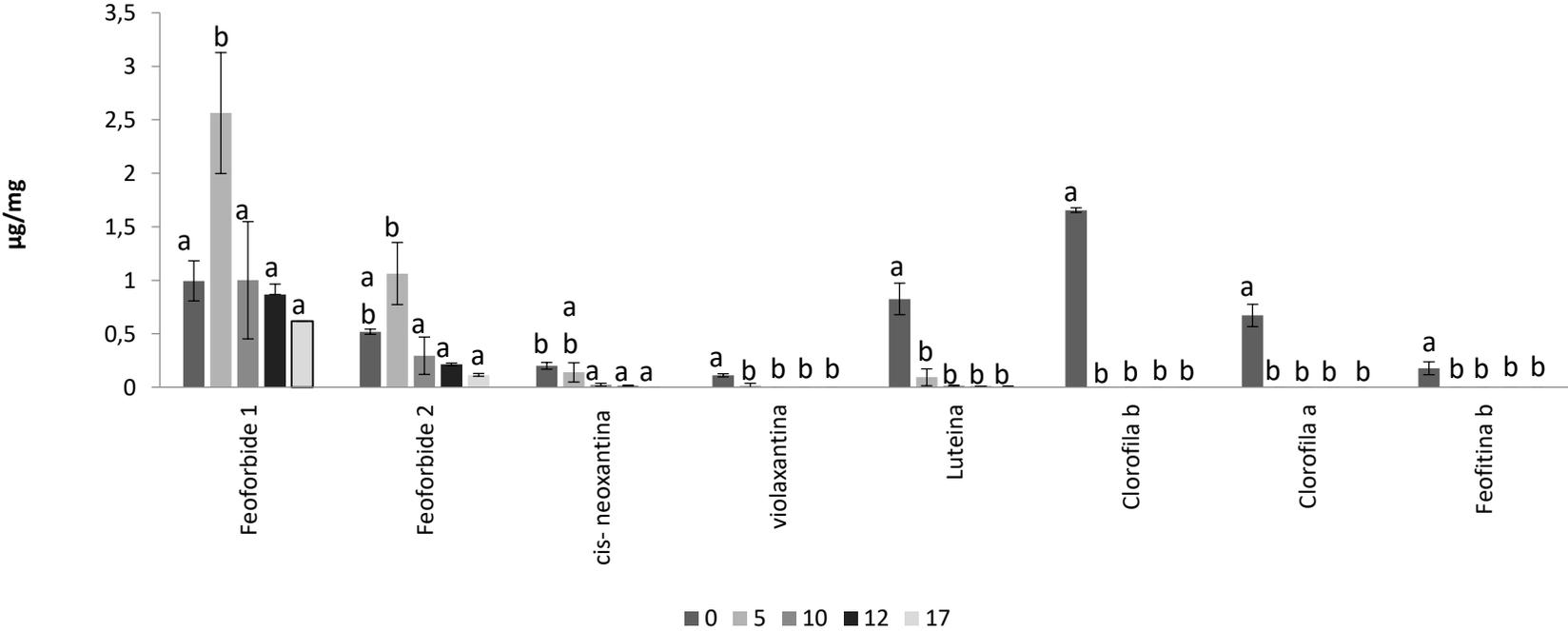


Figura 10 . Perfil cuantitativo de pigmentos de *D. communis* ($\mu\text{g mg}^{-1}$) en los diferentes tiempos de muestreo del cultivo (0, 5, 10, 12 y 17 días). Las letras indican diferencias significativas según el test de Duncan (α 0.05).

Lípidos totales

En la figura 11 se muestra el porcentaje de lípidos de *D. communis* con respecto al peso seco en los diferentes tiempos de muestreo (0, 5, 10, 12 y 17 días). El porcentaje aumentó significativamente ($F_{4,5} p= 0.05$). Al inicio (día 0) con $19.55\% \pm 0.35$. En el día 5 se obtuvo $33\% \pm 5.3$, sin embargo disminuyó para el día 10 con $18.1\% \pm 2.9$, pero manteniéndose sin diferencia significativa con respecto al día 0. En los días 12 y 17 no se presentaron diferencias significativas con respecto al día 10.

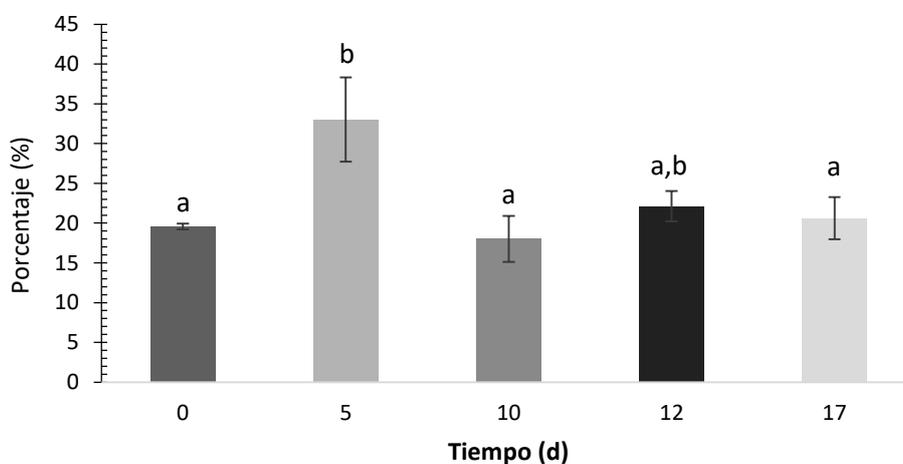


Figura 11. Porcentaje de lípidos de *D. communis* con respecto al peso seco en los diferentes tiempos de muestreo (0, 5, 10, 12 y 17 días). Las letras indican diferencias significativas entre los días de cosecha según el test Duncan ($\alpha 0.05$).

Ácidos grasos

En la tabla XV se muestra una comparativa de los porcentajes de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados con respecto al total de ácidos grasos en función del tiempo de cultivo (días) con cambios significativos ($F_{4,5} p= 0.001$). Al inicio (día 0) podemos observar a los ácidos grasos saturados con un $34.2\% \pm 0.04$ y este fue aumentando encontrado su máximo el día 17 con $49.2\% \pm 0.10$. En cuanto a los monoinsaturados estos aumentaron del inicio (día 0) con 26.1 ± 1.00 a $32\% \pm 0.01$ en el día 17. En cuanto a los poliinsaturados

estos disminuyeron del inicio (día 0) con $41.5\% \pm 0.21$ al $18\% \pm 0.45$ en el día 17.

Tabla XV. Porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados con respecto a los ácidos grasos totales en función del tiempo de cultivo (días). Los valores son el promedio \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre los días de cosecha según el test Duncan (α 0.05).

T (d)	Saturados	Monoinsaturados	Poliinsaturados
0	34.2 ± 0.04^a	26.1 ± 1.00^a	41.5 ± 0.21^a
5	29.6 ± 0.40^b	32.0 ± 0.30^b	39.7 ± 1.44^b
10	27.6 ± 0.10^c	36.1 ± 1.56^c	38.0 ± 0.47^c
12	30.9 ± 0.38^d	35.1 ± 1.53^d	35.9 ± 2.13^d
17	49.2 ± 0.10^e	32.9 ± 0.01^e	18.0 ± 0.45^e

Los resultados de la cuantificación de ácidos grasos presentes en la microalga *Desmodesmus communis* en los días de cosecha 0, 5, 10, 12 y 17 se muestran en la figura 12, en donde podemos observar que el 14:0 (ácido mirístico) disminuyó de manera significativa del día 0 a los días 5, 10, 12 y 17 permaneciendo sin cambios significativos en estos últimos días. En cuanto a los ácidos grasos 15:0, 17:0 y 17:1, la suma de estos no presentó variaciones significativas entre ninguno de los días de cosecha. El 16:0 (ácido palmítico), no presentó cambios significativos entre los días 0, 5, 10 y 12, sin embargo en el día 17 se presentó un aumento significativo. En cuanto al 16:4 ω 3, este fue disminuyendo poco a poco habiendo diferencias significativas entre el día 0 y el día 17. En cuanto al 18:0 (ácido esteárico), este se modificó aumentando ligeramente pero de manera significativa en los días 10 y 12, disminuyendo para el día 17 a una proporción similar a la que se presentó en el día 0. En cuanto al 18:1 ω 9 (ácido oleico), este fue aumentando de manera significativa de los días 0 al 5, 5 al 10, entre en 10 y 12 no se observaron diferencias significativas, y en el día 17 disminuyó de manera significativa con respecto a los días 10 y 12, alcanzando un proporción similar a la que se presentó el día 5. En cuanto al 18:2 ω 6 c (ácido linoleico), aumentó significativamente del día 0 al 10, y disminuyó significativamente del día 10 al 17 encontrándose en este último día en su menor

proporción. En cuanto al 18:3 ω 3 (ácido linolenico), este disminuyó gradualmente entre los días, con diferencias significativas entre los días 0 y 5, y entre los días 5 y 17, siendo este último día el de más baja proporción.

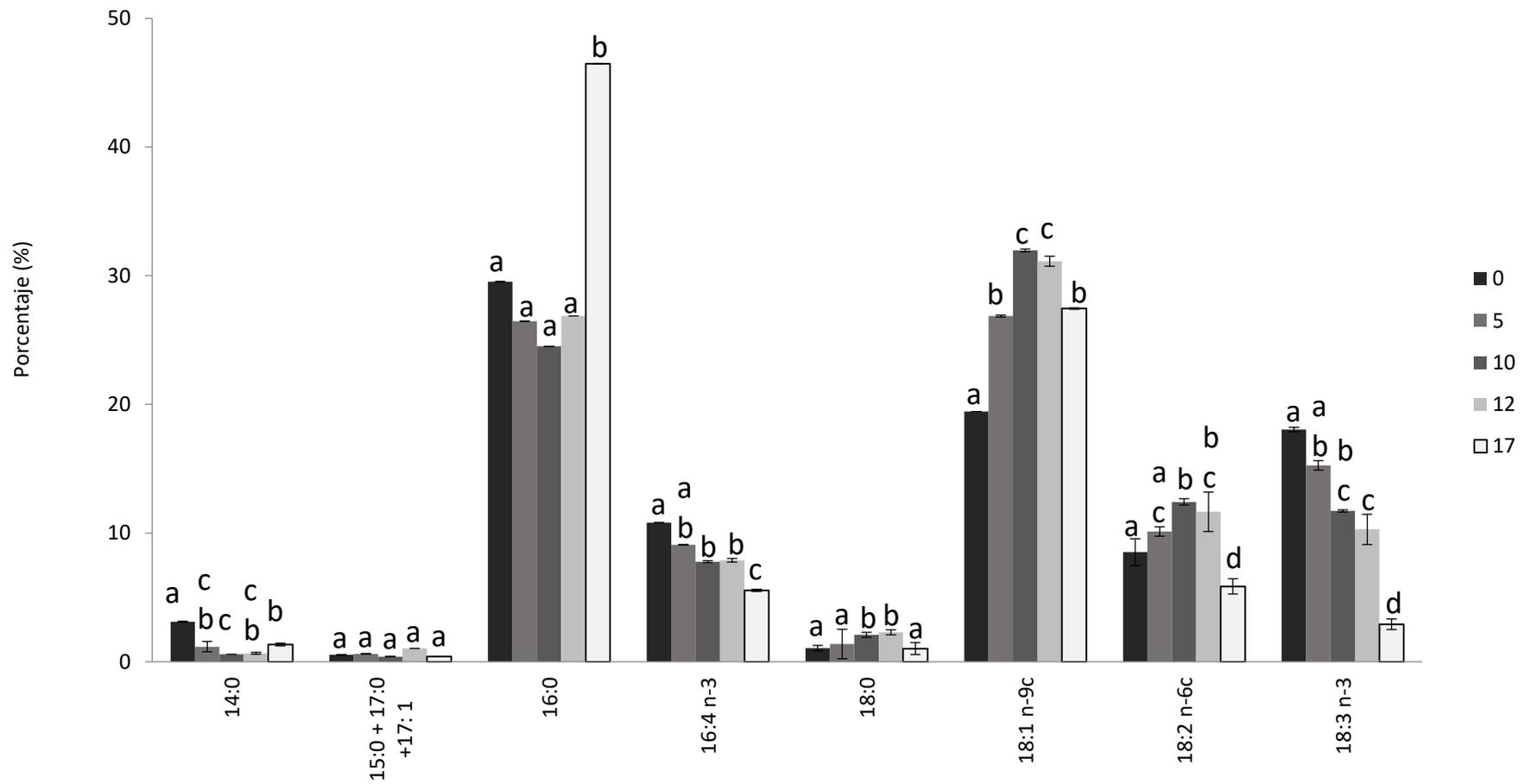


Figura 12. Porcentaje de ácidos grasos con respecto al total de ácidos grasos en función del tiempo de cultivo (0, 5, 10, 12 y 17 días). Las letras indican diferencias significativas según el test Duncan (α 0.05).

Determinación de bacterias presentes

A continuación (Tabla XVI) se muestran las bacterias presentes en el cultivo microalgal en todos los días de cosecha, capaces de crecer en agar nutritivo, las cuales fueron enviadas a MacroGen para una secuenciación parcial del gen ribosomal 16S cuya secuencia fue comparada mediante Blast con las secuencias reportadas, arrojando una similitud de entre el 98 -100% con las bacterias mostradas. De las cuales se destaca *Rhizobium rosettiformans* puesto que tiene la capacidad de fijar nitrógeno, y *Ancylobacter aquaticus* por su capacidad para degradar el 1,2-dicloroetano y producir haloalcano deshalogenasa.

Tabla XVI. Bacterias cultivables presentes en el cultivo de *D. communis*.

N.Cepa	Bacteria	%Similitud	Descripción
Cepa 1	<i>Blastomonas natatoria</i>	100	α -proteobacteria fotoheterotrofica y aerobia
Cepa 2	<i>Rhizobium rosettiformans</i>	100	α -proteobacteria fotótrofo Se reporta como fijadora de N
Cepa 3	<i>Ancylobacter aquaticus</i>	100	α -proteobacteria, degradar el 1,2-dicloroetano y produce haloalcano deshalogenasa
Cepa 4	<i>Bosea vaviloviae</i>	100	α -proteobacteria fotótrofo
Cepa 5	<i>Larkinella bovis</i>	98	Flavobacteria Aislada en fermento bovino en 2011

SSCP

En la figura 13 se muestra el gel de acrilamida obtenido posterior a la electroforesis y tinción con plata realizada, mostrando la comunidad microbiana presente. Podemos observar que el patrón de la comunidad bacteriana permaneció muy similar en todos los días de cosecha.

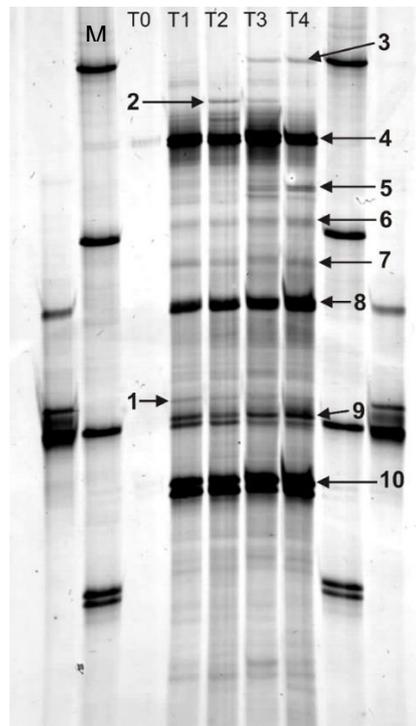


Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida técnica SSCP. T0: día 0, T1: día 5, T2: día 10, T3: día 12 y T4: día 17. M: marcador bacteriano. En las numeraciones del 1-10 se señalan las bandas que se cortaron y se enviaron a secuenciar.

En la tabla XVII se muestran los resultados de las secuencias parciales a partir de las bandas seleccionadas obtenidas del gel de acrilamida con la técnica SSCP. Tres de las bacterias, *Rhizobium rosettiformans*, *Mesorhizobium waimense* y *Microvirga lotononidis* son bacterias con la capacidad de fijar nitrógeno.

Tabla XVII. Bacterias identificadas mediante la técnica SSCP.

N. Banda	Bacteria	% Similitud	Descripción
Banda 1	<i>Rhizobium rosettiformans</i>	100	α -proteobacteria fotótrofo Se reporta como fijadora de N
Banda 2	<i>Paracoccus fistulariae</i>	93	α -proteobacteria fotótrofo
Banda 3	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100	Producción de fitohormonas
Banda 4	<i>Rhodobaca barguzinensis</i>	99	α -proteobacteria fotosintética
Banda 5	<i>Herbaspirillum chlorophenolicum</i>	99	β -proteobacteria degradadora de 4-clorofenol
Banda 6	<i>Roseomonas tokyonensis strain</i>	99	α -proteobacteria fotótrofo
Banda 7	<i>Mesorhizobium waimense</i>	98	Propuesta en 2015 nueva especie α -proteobacteria Se reporta como fijadora de N
Banda 8	<i>Blastomonas natatoria</i>	100	α -proteobacteria fotoheterotrófica y aerobia
Banda 9	<i>Microvirga lotononidis</i>	83	α -proteobacteria Se reporta como fijadora de N
Banda 10	<i>Solitalea canadensis</i>	90	Bacteroidete Heterotrófico Reduce nitratos

Determinación de la longitud de los telómeros

De la determinación de los telómeros se observó que la longitud de estos se mantuvo constante en todos los días de cosecha, es decir no hubo acortamiento en los telómeros comparando entre el día 0 y el resto de los días de cosecha (Fig. 14b). En la figura 14a se puede observar el producto de la digestión del ADN total con las endonucleasas y en la figura 14c se puede observar que la transferencia de ADN a la membrana de nylon se realizó de la manera adecuada, porque no quedó ADN en el gel de agarosa.

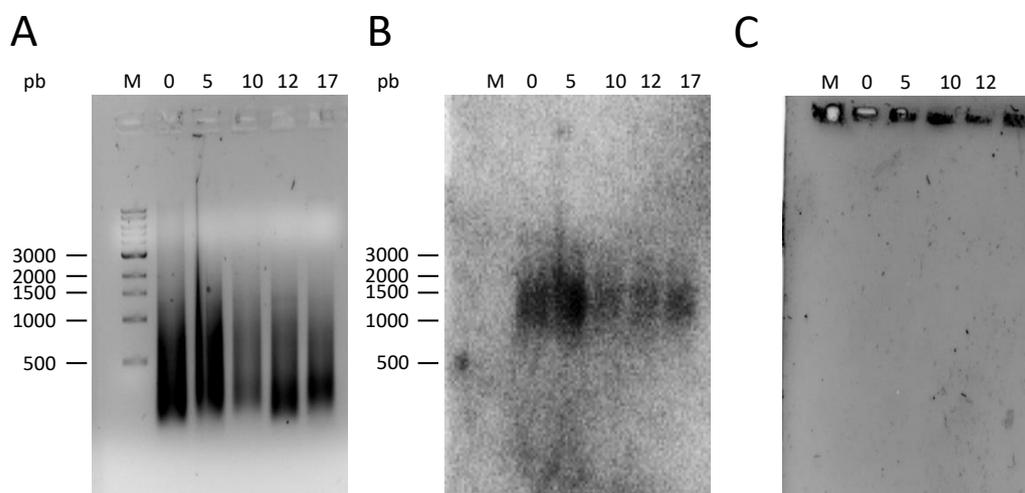


Figura 14. Técnica TRF. En la figura 14a: electroforesis en agarosa de las digestiones enzimáticas, donde se muestra en el carril M el marcador de peso molecular, de los carriles 0-17 representando respectivamente los días de cosecha 0, 5, 10, 12 y 17. 14b: autor radiografía de la membrana de nylon hibridada con la sonda telomérica donde se muestra en el carril M el marcador de peso molecular, de los carriles 0-17 representando, respectivamente, los días de cosecha 0, 5, 10, 12 y 17. 14c gel de agarosa después de la transferencia del ADN a la membrana de nylon.

8. DISCUSIÓN

En la curva de crecimiento se presentó la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria. Coincidiendo el día de término de la fase exponencial con una disminución casi en la totalidad de la concentración de nitrógeno en el medio, sin embargo se comprobó que aún cuando el nitrógeno del medio de cultivo se consumió, las células de la microalga almacenaron conservando una relación C:N de 12.40 ± 0.8 que se presenta cuando no hay limitación de nitrógeno en el fitoplancton (Bittar *et al.*, 2013). Sin embargo, conforme transcurrieron los días el nitrógeno almacenado se redujo significativamente hasta encontrarse deficiente también a nivel intracelular, llegando a una relación de C:N de 29.70 ± 0.30 , dicha deficiencia se ha demostrado también en diatomeas con una relación C:N de 17 ± 1 cuando la concentración de nitrógeno es $4 \mu\text{M}$ (Bittar *et al.*, 2013; Grobbelaar, 2010).

La condición de estrés ocasionada por el agotamiento del nitrógeno en el medio de cultivo provocó una disminución en el porcentaje de proteínas con respecto a la biomasa seca al final de la fase exponencial, ya que el nitrógeno limitó la formación de aminoácidos que son las unidades básicas de las proteínas, las que están involucradas en muchos aspectos del crecimiento, incluyendo procesos estructurales y metabólicos (Doucette y Harrison, 1991; Li *et al.*, 2012; Simionato *et al.*, 2013).

En cuanto a los carbohidratos, aumentaron en respuesta a la reducción de nitrógeno en el medio; dichos resultados coinciden con los hallazgos de Coruzzi y Zhou (2001) quienes demostraron que la asimilación del nitrógeno es un proceso íntimamente conectado al metabolismo del carbono y dado que en los organismos fotosintéticos, el carbono asimilado se reparte entre la formación de carbohidratos y la síntesis de aminoácidos, al disminuir la síntesis de proteínas y aminoácidos, la vía del metabolismo del carbono se redirigió a la síntesis de carbohidratos (Coruzzi y Zhou, 2001).

La capacidad de las microalgas para sobrevivir en diversas condiciones extremas se refleja en la enorme diversidad y a veces en su patrón inusual de los lípidos obtenidos (Sato *et al.*, 2000). Asimismo, las microalgas incrementan

su contenido de lípidos al ser sometidas a condiciones de estrés, en particular bajo restricciones de nutrientes como el nitrógeno (Gonzales y Magallanes, 2012).

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que mientras la cantidad de lípidos totales se incrementó significativamente como respuesta a la limitación de nitrógeno en el día 5, la tasa de crecimiento o producción de biomasa disminuyó, lo cual no es rentable cuando se quiere tener una alta productividad de aceites usando microalgas oleaginosas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Huntley y Redalje (2007).

En cuanto a la proporción de ácidos grasos se observó que la disminución de la concentración de nitrógeno provocó una disminución en la proporción de ácidos grasos polinsaturados y un aumento en los ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Este comportamiento es de gran interés ya que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados pueden ser utilizados en la industria de los biocombustibles, dado que los triglicéridos ricos en ácidos grasos poliinsaturados son menos deseables para la producción de biodiesel, pues disminuyen el número de cetano y la estabilidad a la oxidación del combustible, mientras que triglicéridos ricos en ácidos grasos saturados (C16 y C20) y monoinsaturados (C18:1, ácido oleico), resultan ideales para la producción de biodiesel (Imahara *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009, Ramos *et al.*, 2009)

En cuanto a la acumulación de carotenoides secundarios, en las microalgas cuando son cultivadas en medios con limitación del nitrógeno, se genera también una disminución del contenido de clorofila de las células (Richmond y Hu, 2013). En este trabajo, los pigmentos presentes al inicio del cultivo (luteína, clorofila *a* y *b*, neoxantina entre otras) disminuyeron con respecto al tiempo hasta agotarse, observando en esa etapa, la presencia de feoforbides, que son las formas degradadas de la clorofila. Al degradarse la clorofila (a partir del día 5), no hubo fotosíntesis, por lo que la microalga desvió su metabolismo. De manera fotoautotrófica, las microalgas utilizan la luz como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono para obtener energía química a través de la fotosíntesis (Li *et al.*, 2009); mientras que heterotróficamente, las microalgas en ausencia de luz utilizan solo compuestos orgánicos como fuente de carbono y

energía, (Chojnacka y Marquez-Rocha, 2004) mixotróficamente, utilizan carbono orgánico e inorgánico como fuente de carbono y captan la energía de la luz y del carbono orgánico (Chen *et al.*, 2017). La principal diferencia entre cultivos mixotróficos y fotoheterotróficos es que estos últimos requieren de luz para la incorporación del carbono orgánico. Por lo tanto, este tipo de cultivo necesita de luz y azúcares al mismo tiempo, la utilización de este tipo de cultivo para la producción de lípidos en microalgas es poco común. El cultivo mixotrófico también ha mostrado ser una buena estrategia para aumentar la productividad de lípidos (Cheirsilp y Torpee, 2012; Liang *et al.*, 2009; Yeh y Chang, 2012)

Probablemente *Desmodesmus communis* bajo las condiciones experimentales de este trabajo, modifico su nutrición hacia la mixotrofía, después de terminada la fase exponencial. Por otro lado, la interacción con las bacterias presentes en el cultivo, sugieren un apoyo para permanecer en fase estacionaria durante el resto del experimento, ya que las bacterias podrían estar proporcionando nutrientes (Watanabe *et al.*, 2005). Se presentó un patrón muy similar de comunidad bacteriana durante el metabolismo fotosintético y mixotrófico, lo que puede indicar que los nutrientes proporcionados son necesarios en ambos metabolismos. En cuanto a *Rhizobium rosettiformans*, *Mesorhizobium waimense* y *Microvirga lotononidis* que se reporta son capaces de fijar nitrógeno, pudieran ayudar a mitigar el estrés por consumo de nitrógeno. A pesar de que la actividad de la nitrogenasa se vea inactivada en ambientes aerobios, los microorganismos que fijan nitrógeno en ambientes aeróbicos han desarrollado diferentes adaptaciones metabólicas y estructurales para poder llevar a cabo la fijación de nitrógeno en un ambiente oxidante (Atlas y Bartha, 1992; Brock *et al.*, 1994). El crecimiento de la microalga también puede verse estimulado por la bacteria *Bacillus aryabhatai* ya que en trabajos anteriores se comprobó la producción de fitohormonas como ácido abscísico y ácido indólico, por lo que se considera un recurso valioso para la incorporación en biofertilizantes (Park *et al.*, 2017) . Las bacterias presentes en el cultivo también pueden jugar un papel distinto al de proporcionar elementos nutricionales y jugar un rol protector, lo que podría ser el caso de *Ancylobacter aquaticus*. Esta bacteria es productora de haloalcano deshidrogenasa una enzima con potencial uso biotecnológico, que en conjunto con las microalgas, puede potencializar su eficacia en biorremediación, ya que

varios compuestos halogenados son subproductos industriales ambientalmente tóxicos, y se ha sugerido que las deshalogenasas de haloalcano pueden ser catalizadores útiles para su biodegradación, con posibles aplicaciones en la biorremediación (Hesseler *et al.*, 2011), como ocurre con *Herbaspirillum chlorophenolicum*, una bacteria capaz de degradar 4-clorofenol, comúnmente usado en herbicidas y pesticidas (Im *et al.*, 2004). Del total de 13 bacterias identificadas, 9 pertenecen al grupo de α -proteobacterias, un bacteroide y una β -proteobacteria, siendo las primeras dos una clase de bacterias que se ha reportado en estudios previos que es abundante en la relación entre bacterias y diatomeas, y la última presente en menor medida. Las proteobacterias y los bacteroides son los principales filos bacterianos heterotróficos asociados en microalgas (Amin *et al.*, 2012).

La propuesta de la fijación de nitrógeno por las bacterias se respalda en que la proporción cuantificada intracelularmente de la relación isotópica $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ en el tiempo 0 fue 4.185 ± 0.025 aproximado a los valores reportados con anterioridad para fitoplancton marino de 5.1 ± 0.6 (Carreón-Palau *et al.*, 2013), y en el tiempo 5 fue de 5.975 ± 0.85 , mostrando un aumento significativo

Se ha demostrado que la composición isotópica de un organismo está determinada por el valor isotópico del alimento que consume (Deniro y Epstein, 1981), indicando con esto que la fuente de nitrógeno utilizada por la microalga cambió, y dado que los organismos consumidores se enriquecen de los isótopos como el ^{15}N (Martínez del Río *et al.*, 2009), al enriquecerse sugiere que utiliza una fuente de nitrógeno proveniente de otro organismo. La relación isotópica de ^{13}C también se vio modificada, siendo menos negativa el día 0 con -10.73 ± 0.026 , y valor menos negativo el día 10 con -8.94 ± 0.03 , indicando que la fuente de carbono cambió (Martínez del Río *et al.*, 2009).

Al agotarse los pigmentos con acción antioxidante y al aumentar el estrés por el consumo de nitrógeno esperábamos que las especies reactivas de oxígeno causarían daños, observando una disminución en la longitud de los telómeros, ya que la enzima encargada de elongarlos y conservar su longitud puede verse afectada por la disminución de nitrógeno al ser una ribonucleoproteína. Sin embargo esto no sucedió, y la longitud de los telómeros permaneció igual

durante todas las etapas de cosecha, esto pudo deberse a mecanismos antioxidantes no relacionados con los pigmentos, el sistema de defensa antioxidante enzimático, dentro del que se encuentran las siguientes enzimas: superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima posee como función catalizar la dismutación del RL $O_2 \bullet^-$ a H_2O_2 , el cual es menos reactivo y puede llegar a ser degradado por otras enzimas como la catalasa o la glutatión peroxidasa (Bandyopadhyay *et al.*, 1998; Constanza *et al.*, 2012) La catalasa es una hemoproteína que se concentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias, se encarga de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Yu, 1994). Glutatión peroxidasa (GPx), es una selenoproteína que en presencia de GSH como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente (Xu *et al.*, 2010). Las enzimas anteriores no fueron medidas en este trabajo, sin embargo las mencionamos ya que estas representan una herramienta celular importante para mitigar el estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006).

9. CONCLUSIONES

1. Se evaluó el consumo de nitrógeno en el medio de cultivo encontrado que este se agotó al finalizar la fase exponencial, provocando en los siguientes días de cultivo deficiencia de nitrógeno a nivel intracelular en la microalga *Desmodesmus communis*.
2. Se evaluó el efecto por consumo de nitrógeno en el cultivo batch de la microalga *D. communis* encontrando que al disminuir el nitrógeno del medio de cultivo con respecto al tiempo, la tasa de crecimiento disminuyó, entrando en la fase estacionaria. Este efecto se reflejó en la composición bioquímica: las proteínas disminuyeron significativamente, mientras que los carbohidratos aumentaron y lípidos totales aumentaron.
3. Se encontró que al disminuir el nitrógeno el perfil de ácidos grasos se modificó, incrementando los ácidos grasos saturados y disminuyendo los poliinsaturados. Los más abundantes fueron 18:1 ω 9cis y 16:0, los cuales tienen potencial biotecnológico en el área de los biocombustibles. En cuanto a los pigmentos se agotó de manera súbita la clorofila *a* y *b*, encontrándose un aumento en los feoforbides.
4. Se determinó la presencia de bacterias asociadas al crecimiento de la microalga *D. communis* en diferentes fases de crecimiento encontrándose que las mismas permanecieron presentes de manera constante en todas las fases, siendo las α -proteobacterias las más abundantes.
5. Se evaluó el efecto por consumo de nitrógeno en el medio de cultivo de la microalga *D. communis* sobre la longitud de sus telómeros, encontrando que a pesar de la disminución de nitrógeno y con esto el aumento del estrés, la longitud no se vio modificada, sugiriendo que intervinieron otros mecanismos antioxidantes para mantener la integridad de los telómeros.

A partir de los estudios realizados en esta tesis las perspectivas para este trabajo a futuro se pueden orientar en 2 direcciones: complementar el análisis de bacterias para conocer de qué manera interactúan con la microalga *D. communis*, y medir las especies reactivas de oxígeno así como la actividad antioxidante enzimática para complementar el estudio.

10. LITERATURA CITADA

- Amin, S.A., M.S. Parker, E.V. Armbrust. 2012. Interactions between diatoms and bacteria. *MMBR*. 76(3):667-84.
- Arias-Peñaranda, M.T., E. Cristiani-Urbina, C. Montes-Horcasitas, F. Esparza-García, G. Torzillo, R.O. Cañizares-Villanueva. 2013. *Scenedesmus incrassatulus* CLHE-Si01: A potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production. *BIOREOURCE TECHNOL*. 140:158-164.
- Arias Peñaranda, M.T., R.O. Cañizares Villanueva, A. de J. Martínez Roldán. 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *ACTA BIO COLOMB*. 18(1):43-68
- Arredondo-Vega, B.O, D. Voltolina. 2017. Concentración, Recuento Celular y Tasa de Crecimiento En: Arredondo-Vega B.O. Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal pp44-50.
- Ashen, J.B. L.J. Goff. 2000. Molecular and ecological evidence for species specificity and coevolution in a group of marine algal-bacterial symbioses. *APPL ENVIRON MICROB*. 66(7):3024-30.
- Atlas, R.M, R. Bartha. 1992. Hydrocarbon Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. En: Marshall K.C. (eds) *Advances in Microbial Ecology*. *ADV MICROB ECOL*. 12:287-338.
- Azam, F. 1998. OCEANOGRAPHY: Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens. *SCIENCE*. 280(5364):694-696.
- Bandyopadhyay, U., D. Das, R. K Banerjee. 1998. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *CURR SCI INDIA*. 77:658-666
- Beer, L.L., E.S. Boyd, J.W. Peters, M.C. Posewitz. 2009. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *CURR OPIN BIOTECH*. 20(3):264-271.
- Ben-Amotz, A., A. Katz, M. Avron. 1982. Accumulation of β carotene in halotolerant algae: purification and characterization of carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (CHLOROPHYCEAE). *J PHICOL*.

18(4):529-537.

Benov, L., A.F. Beema. 2003. Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis. *FREE RADIC BIOL MED.* 34(4):429-33

Bhosale, P. 2004. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL.* 63(4):351-361.

Bitog, J.P., I.-B. Lee, C.-G. Lee, K.-S. Kim, H.-S. Hwang, S.-W. Hong, I.-H. Seo, K.-S. Kwon, E. Mostafa. 2011. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. *COMPUT ELECTRON AGR.* 76(2):131-147.

Bittar, T.B., Y. Lin, L.R. Sassano, B.J. Wheeler, S.L. Brown, W.P. Cochlan, Z.I. Johnson. 2013. Carbon allocation under light and nitrogen resource gradients in two model marine phytoplankton. *J PHICOL.* 49(3):523-535.

Blackburn, E.H. 1991. Structure and function of telomeres. *NATURE.* 350(6319):569-573.

Borowitzka, M.A. 2016. Algal Physiology and Large-Scale Outdoor Cultures of Microalgae. En: Borowitzka M., Beardall J., Raven J. (eds) *The Physiology of Microalgae.* Springer International Publishing Cham. *J APPL PHYCOL.* 6:601-652.

Borowitzka, M.A., L.J. Borowitzka. 1988. *Micro-algal biotechnology.* Cambridge University Press, Cambridge, 1988. pp. 477

Breen, A.P., J.A. Murphy. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *FREE RADIC BIOL MED.* 18(6):1033-77.

Bumbak, F., S. Cook, V. Zachleder, S. Hauser, K. Kovar. 2011. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL.* 91(1):31-46.

Bunker, V.W. 1992. Free radicals, antioxidants and ageing. *MLS.* 49(4):299-312.

- Camargo, J.A., Á. Alonso. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. ENVIRON INT. 32(6):831-849.
- Caradonna, F., M. Mauro. 2016. Role of the antioxidant defence system and telomerase in arsenic-induced genomic instability. MUTAGENESIS. 31(6):661-667.
- Carlucci, A.F., S.B. Silbernagel, P.M. McNally. 1969. Influence of temperature and solar radiation on persistence of vitamin B₁₂, thiamine, and biotin in seawater. J PHICOL. 5(4):302-305.
- Carocho, M., I.C.F.R. Ferreira. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. FOOD CHEM TOXICOL. 51:15-25
- Carreón-Palau, L., C.C. Parrish, J.A. del Angel-Rodríguez, H. Pérez-España, S. Aguiñiga-García. 2013. Revealing organic carbon sources fueling a coral reef food web in the Gulf of Mexico using stable isotopes and fatty acids. LIMNOL. OCEANOGR.. 58(2):593-612.
- Cheirsilp, B., S. Torpee. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. BIORESOURCE TECHNOL. 110:510-516.
- Chen, J., H. Cui, Y. Hou, Y. Cui, Y. Wang, Y. Xu, Q. Wang, S. Qin. 2017. Molecular cloning, expression and characterisation of glucokinase gene from the mixotrophic green alga *Chlorella kessleri*. PHYCOLOGIA. 56(5):477-486.
- Chojnacka, K., F.-J. Marquez-Rocha. 2004. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. BIOTECHNOL J. 3(1):21-34.
- Constanza, L., C. Msc, M. María, M. Ariza. 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. NOVA 10:(18)135-

250.

- Coruzzi, G.M., L. Zhou. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *CURR OPIN PLANT BIOL.* 4(3):247-253.
- Croft, M.T., A.D. Lawrence, E. Raux-Deery, M.J. Warren, A.G. Smith. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *NATURE.* 438(7064):90-93.
- D'Souza, Y., T.W. Chu, C. Autexier. 2013. A translocation-defective telomerase with low levels of activity and processivity stabilizes short telomeres and confers immortalization. *MOL. BIOL. CELL.* 24(9):1469-1479.
- Dae-Hyun, C., R. Rishiram, H. Jina, L. Jimin, K. Byung-Hyuk, O. Hee-Mock, y K. Hee-Sik 2014. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal-bacterial community. *BIORESOUR TECHNOL.* 175 (2015):578-585.
- de-Bashan, L.E., Y. Bashan, M. Moreno, V.K. Lebsky, J.J. Bustillos. 2002. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *CAN J MICROBIOL.* 48(6):514-521.
- Deniro, M.J., S. Epstein. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *GEOCHIM COSMOCHM AC.* 45(3):341-351.
- Dizdaroglu, M., P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *FREE RADIC BIOL MED.* 32(11):1102-15
- Dizdaroglu, M., P. Jaruga. 2012. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *FREE RADIC RES.* 46(4):382-419.
- Doucette, G.J., P.J. Harrison. 1991. Aspects of iron and nitrogen NUTRITION in the red tide dinoflagellate *Gymnodinium sanguineum*. *MAR BIOL.* 110(2):165-173.
- Droop, M.R. 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J PHICOL.*

9(3):264-272.

Droop, M.R. 2007. Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging?. *J PLANKTON RES.* 29(2):107-113.

DuBois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *ANAL CHEM.* 28(3):350-356.

Ethier, S., K. Woisard, D. Vaughan, Z. Wen. 2011. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *BIORESOURCE TECHNOL.* 102(1):88-93.

Fischer, C.R., D. Klein-Marcuschamer, G. Stephanopoulos. 2008. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *METAB ENG.* 10(6):295-304.

Foyer, C.H., G. Noctor. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *PHYSIOL PLANTARUM.* 119(3):355-364.

Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *CURR OPIN PLANT BIOL.* 9(4):436-442.

Fulnečková, J., T. Hasíková, J. Fajkus, A. Lukešová, M. Eliáš, E. Sýkorová. 2012. Dynamic Evolution of Telomeric Sequences in the Green Algal Order Chlamydomonadales. *GENOME BIOL EVOL.* 4(3):248-264.

Gavia García, G., z H. González Martínez. 2015. Oxidative damage and antioxidant defense in thymus of malnourished lactating rats. *NUTRITION.* 31(11-12):1408-1415.

Grobbelaar, J.U. 2010. Microalgal biomass production: challenges and realities. *PHOTOSYNTH RES.* 106(1-2):135-144.

Guiry, M.D., G.M. Guiry. 2018. About AlgaeBase :: Algaebase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway,

<http://www.algaebase.org/about/p>.

- Guschina, I.A., J.L. Harwood. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *PROG LIPID RES.* 45(2):160-186.
- Haines, K.C., R.R.L. Guillard. 1974. Growth of vitamin B 12- requiring marine diatoms in mixed laboratory culture with vitamin B 12- producing marine bacteria. *J PHICOL.* 10(3):245-252.
- Halliwell, B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *AM J MED.* 91(3C):14S-22S.
- Halliwell, B., S. Chirico. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *AM J CLIN NUTR.* 57(5 Suppl):715S-724S; discussion 724S-725S
- Harun, R., M. Singh, G.M. Forde, M.K. Danquah. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *RENEW SUST ENERGREV.* 14(3):1037-1047.
- Hayflick, L. 1985. Theories of biological aging. *EXP GERONTOL.* 20(3-4):145-159.
- Hesseler, M., X. Bogdanović, A. Hidalgo, J. Berenguer, G.J. Palm, W. Hinrichs, U.T. Bornscheuer. 2011. Cloning, functional expression, biochemical characterization, and structural analysis of a haloalkane dehalogenase from *Plesiocystis pacifica* SIR-1. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL.* 91(4):1049-1060.
- Ho, S.-H., W.-M. Chen, J.-S. Chang. 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. *BIOREOURCE TECHNOL.* 101(22):8725-8730.
- Holzinger, A., M.C. Allen, D.D. Deheyn. 2016. Hyperspectral imaging of snow algae and green algae from aeroterrestrial habitats. *J PHOTOCHEM PHOTOBIOLOG.* 162:412-420.
- Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel

- production: perspectives and advances. *PLANT J.* 54(4):621-639.
- Im, W.-T., H.-S. Bae, A. Yokota, S.T. Lee. 2004. *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. *J SYST EVOL MICROBIOL.* 54(3):851-855.
- Imahara, H., E. Minami, S. Hari, S. Saka. 2007. Thermal stability of biodiesel in supercritical methanol. *FUEL* .87(1):1-6
- Imlay, J.A., S. Linn. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *SCIENCE.* 240(4857):1302-9.
- Jasso, A., P. Piña, M. Valdez, J.F. Soto, Arzola, M. González, Guerrero, Ibarra. 2012. La importancia de las microalgas. *CONABIO. Biodiversitas.* 103:1-5.
- Jeyapalan, J.C., J.M. Sedivy. 2008. Cellular senescence and organismal aging. *MECH AGEING DEV.* 129(7-8):467-474.
- Jialal, I., E.P. Norkus, L. Cristol, S.M. Grundy. 1991. β -Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *BBA - LIPID LIPID METAB.* 1086(1):134-138.
- Krivtsov, V., D.C. Sigee. 2005. Importance of Biological and Abiotic Factors for Geochemical Cycling in a Freshwater Eutrophic Lake. *BIOGEOCHEMISTR.* 74: 205-230.
- Lamers, P.P., C.C.W. van de Laak, P.S. Kaasenbrood, J. Lorier, M. Janssen, R.C.H. De Vos, R.J. Bino, R.H. Wijffels. 2010. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *BIOTECHNOL BIOENG.* 106(4):638-648.
- Lampert, W., U. Sommer. 2007. *Limnoecology.* Oxford University Press Inc, New York, United States. 336p.
- Lang, I., L. Hodac, T. Friedl, I. Feussner. 2011. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology.* 11(1):124.
- Lavín, P.L., S.O. Lourenço. 2005. An evaluation of the accumulation of

- intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in batch cultures. BRAZ J OCEANOGR. 53(1-2):55-68.
- Lazar, T. 2003. Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. Annals of Botany. 91(6):750-751.
- Lee, R.E. 2008. Phycology. Cambridge University Press. 4th edition. Colorado State University. 560p
- Lenaz, G. 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. BIOCHIM BIOPHYS ACTA. 1366:53-67.
- Li, Y., X. Fei, X. Deng. 2012. Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. BIOMASS BIOENERGY. 42:199-211.
- Li, Y., J. Huang, G. Sandmann, F. Chen. 2009. High-Light and Sodium Chloride Stress Differentially Regulate the Bioynthesis of Astaxanthin in *Chlorella zofigiensis* (*Chlorophyceae*). J PHICOL. 45(3):635-641.
- Liang, Y., N. Sarkany, Y. Cui. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. BIOTECHNOL LETT. 31(7):1043-1049.
- Lin, Q., J. Lin. 2011. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. BIORESOURCE TECHNOL. 102(2):1615-1621.
- Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, N. Chandra. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. PHARMACOGN REV. 4(8):118
- Lourenço, S.O., E. Barbarino, P.L. Lavín, U.M. Lanfer Marquez, E. Aidar. 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen to protein conversion factors. European J PHICOL. 39(1):17-32.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J BIOL CHEM. 193(1):265-75.

- Lu, W., Y. Zhang, D. Liu, Z. Songyang, M. Wan. 2013. Telomeres—structure, function, and regulation. *EXP CELL RES.* 319(2):133-141.
- Maldonado. J.M. 2008. Asimilación del nitrógeno y del azufre. En: Azcón-Biento J. M. Talón (eds). *Fundamento de fisiología vegetal* editorial McGraw- Hill. Interamericana de España. Madrid. 287-304
- Marsh, J.B., D.B. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J LIPID RES.* 7(4):574-6.
- Martínez del Rio, C., N. Wolf, S.A. Carleton, L.Z. Gannes. 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *BIOL REV.* 84(1):91-111.
- Medvedev, Z.A. 1990. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *BIOL REV.* 65(3):375-398.
- Meléndez-Martínez, A.J., I.M. Vicario, F.J. Heredia. 2007. Pigmentos carotenoides: Consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *ALAN.* 57(2):109-117.
- Metting, F.B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J IND MICROBIOL BIOTECHNOL.* 17(5-6):477-489.
- Mondello, C., A.I. Scovassi. 2004. Telomeres, telomerase, and apoptosis. *BIOCHEM CELL BIOL.* 82(4):498-507.
- Moo-Puc, R., D. Robledo, Y. Freile-Pelegri. 2009. In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, México. *Ciencias marinas.* 35(4):345-358.
- Mouget, J., A. Dakhama, M.C. Lavoie, J. de la Noüe. 1995. Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved?. *FEMS MICROBIOL ECOL.* 18(1):35-43.
- Norton, T.A., M. Melkonian, R.A. Andersen. 1996. Algal biodiversity. *PHYCOLOGIA.* 35(4):308-326.
- O'Brien, J.A., A. Vega, E. Bouguyon, G. Krouk, A. Gojon, G. Coruzzi, R.A.

- Gutiérrez. 2016. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *MOL PLANT*. 9(6):837-856.
- Ohara, S., K. Fukami, Y. Ishida. 1993. Algal Effects on the Bacterial Assemblage in Lake Biwa. *Jpn. J LIMNOL*. 54(4):261-268.
- Ohwada, K. 1973. Seasonal Cycles of Vitamin B12, Thiamine and Biotin in Lake Sagami. Patterns of Their Distribution and Ecological Significance. *INT REV GESAMTEN HYDROBIOL*. 58(6):851-871.
- Ortiz-Marquez, J.C.F., M. Do Nascimento, M. de L.A. Dublan, L. Curatti. 2012. Association with an ammonium-excreting bacterium allows diazotrophic culture of oil-rich eukaryotic microalgae. *APPL ENVIRON MICROB*. 78(7):2345-52.
- Park, Y.-G., B.-G. Mun, S.-M. Kang, A. Hussain, R. Shahzad, C.-W. Seo, A.-Y. Kim, S.-U. Lee, K.Y. Oh, D.Y. Lee, I.-J. Lee, B.-W. Yun. 2017. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS one*. 12(3):e0173203.
- Peña-Castro, J.M., F. Martínez-Jerónimo, F. Esparza-García, R.O. Cañizares-Villanueva. 2004. Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. *BIORESOURCE TECHNOL*. 94(2):219-222.
- Perales-Vela, H.V., J.M. Peña-Castro, R.O. Cañizares-Villanueva. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *CHEMOSPHERE*. 64(1):1-10.
- Peterson, B. J., B. Fry. 1987. Stable isotopes in Ecosystem Studies. *ANNU REV ECOL SYST*. 18: 293-320
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J NAT PROD*. 63(7):1035-42.
- Pirastru, L., M. Darwish, F.L. Chu, F. Perreault, L. Sirois, L. Sleno, R. Popovic. 2012. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. *J APPL PHYCOL*. 24(1):117-124.

- Prison, A., H. Lorenzen. 1966. Synchronized Dividing Algae. ANNU REV PLANT PHYSIOL. 17(1):439-458.
- Qin, S., G.-X. Liu, Z.-Y. Hu. 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). PROCESS BIOCHEM. 795–802.
- Ramanan, R., B.-H. Kim, D.-H. Cho, H.-M. Oh, H.-S. Kim. 2016. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. BIOTECHNOL ADV. 34(1):14-29.
- Ratnam, D.V., D.D. Ankola, V. Bhardwaj, D.K. Sahana, M.N.V.R. Kumar. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. J CONTROL RELEASE. 113(3):189-207.
- Ríos, M.D.C. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. Quimica viva. 2(1):1
- Rouzic, B. Le, G. Bertru. 1997. Phytoplankton community growth in enrichment bioassays: Possible role of the nutrient intracellular pools. ACTA OECOL. 18(2):121-133.
- Ryther, J.H., R.R.L. Guillard. 1962. Studies of marine planktonic diatoms:II. use of *Cyclotella nana* Hustedt for assays of vitamin B₁₂ in sea water. CAN J MICROBIOL. 8(4):437-445.
- Sahnoun, Z., K. Jamoussi, K.M. Zeghal. 1997. Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects. THERAPIE. 52(4):251-70.
- Sánchez, J.F., J.M. Fernández-Sevilla, F.G. Acién, M.C. Cerón, J. Pérez-Parra, E. Molina-Grima. 2008. Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. APPL MICROBIOL BIOTECHNOL. 79(5):719-729.
- Sapp, M., A.S. Schwaderer, K.H. Wiltshire, H.-G. Hoppe, G. Gerdt, A. Wichels. 2007. Species-Specific Bacterial Communities in the Phycosphere of Microalgae?. MICROB ECOL. 53(4):683-699.
- Sato, N., N. Murata. 1988. Membrane lipids. METHODS ENZYMOL. 167:251-

259.

- Schumpert, C., J. Nelson, E. Kim, J.L. Dudycha, R.C. Patel. 2015. Telomerase Activity and Telomere Length in *Daphnia*. PLOS ONE. 10(5):e0127196.
- Schwieger, F., C.C. Tebbe. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. APPL ENVIRON MICROB. 64(12):4870-6.
- Scott, S.A., M.P. Davey, J.S. Dennis, I. Horst, C.J. Howe, D.J. Lea-Smith, A.G. Smith. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. CURR OPIN BIOTECH. 21(3):277-286.
- Ševčíková, T., K. Bišová, M. Fojtová, A. Lukešová, K. Hřčková, E. Sýkorová. 2013. Completion of cell division is associated with maximum telomerase activity in naturally synchronized cultures of the green alga *Desmodesmus quadricauda*. FEBS Letters. 587(6):743-748.
- Shen, Y., Z. Pei, W. Yuan, E. Mao. 2009. Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. IJABE. 2(1):51-57.
- Sieburth, J.M. 1971. An instance of bacterial inhibition in oceanic surface water. MAR BIOL. 11(1):98-100.
- Sieburth, J.Mc. 1959. Antibacterial Activity of Antarctic Marine Phytoplankton1. LIMNOL. OCEANOGR.. 4(4):419-424.
- Simionato, D., M.A. Block, N. La Rocca, J. Jouhet, E. Maréchal, G. Finazzi, T. Morosinotto. 2013. The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. EUKARYOTIC CELL. 12(5):665-76.
- Sorokin, Y.I. 1973. On the Feeding of Some Scleractinian Corals with Bacteria and Dissolved Organic Matter. LIMNOL. OCEANOGR., 18, 380-385p.
- Strickland, J., T. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. J FISH RES BOARD CAN. 157:310.

- Tamiya, H. 1966. Synchronous Cultures Of Algae. PLANT PHYSIOL. 17:1-27.
- Tan, Y., J. Lin. 2011. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. BIORESOURCE TECHNOL. 102(21):10131-10135.
- Thompson, G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. BIOCHIM BIOPHYS ACTA. 1302(1):17-45.
- Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis, M. Scoullou. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. ECOTOXICOL ENVIRON SAF. 64(2):178-189.
- Valko, M., M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. MOL CELL BIOCHEM. 266(1-2):37-56
- Vaulot, D., W. Eikrem, M. Viprey, H. Moreau. 2008. The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems. FEMS MICROBIOL REV. 32(5):795-820.
- Vilar-Rojas, C., A.M. Guzman-Grenfell, J.J. Hicks. 1996. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. ARCH MED RES. 27(1):1-6.
- Vitòria, L., N. Neus Otero, A. Soler, À. Canals. 2004. Fertilizer Characterization: Isotopic Data (N, S, O, C, and Sr). ENVIRON SCI TECHNOL. 38(12):3254-3262.
- Watanabe, K., N. Takihana, H. Aoyagi, S. Hanada, Y. Watanabe, N. Ohmura, H. Saiki, H. Tanaka. 2005. Symbiotic association in *Chlorella* culture. FEMS MICROBIOL ECOL. 51(2):187-196.
- Wehr, J.D. 2007. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology by Barsanti; Gualtieri, P. J PHICOL. 43(2):412-414.
- Xin, L., H. Hong-ying, G. Ke, S. Ying-xue. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. BIORESOURCE TECHNOL. 101(14):5494-5500.

- Xu, J., Y.-S. Tian, R.-H. Peng, A.-S. Xiong, B. Zhu, X.-L. Hou, Q.-H. Yao. 2010. Cyanobacteria MT gene SmtA enhance zinc tolerance in *Arabidopsis*. *MOL BIOL REP.* 37(2):1105-1110.
- Yeh, K.-L. J.-S. Chang. 2012. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *BIORESOURCE TECHNOL.* 105:120-127.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *PHYSIOL REV.* 74(1):139-162.
- Zakian, V.A. 1995. Telomeres: beginning to understand the end. *SCIENCE (New York, N.Y.)*. 270(5242):1601-7.
- Zeiger, A.M., S. Dimmeler, J. Haendeler, J. Hoffmann, J.F. Diehl, M. Vasa, I. Spyridopoulos. 2004. Replicative Senescence of Endothelial Cells Antioxidants Inhibit Nuclear Export of Telomerase Reverse Transcriptase and Delay Antioxidants Inhibit Nuclear Export of Telomerase Reverse Transcriptase and Delay Replicative Senescence of Endothelial Cells. *CIRC RES.* 94:768-775.
- Von Zglinicki, T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *TRENDS BIOCHEM SCI.* 27(7):339-344.