



UGR | Universidad
de **Granada**

Departamento de Microbiología

*“Cultivo y Utilización de Microorganismos
Fotosintéticos Psicrófilos Obtenidos de Laguna de La
Caldera en Parque Nacional de Sierra Nevada para su
Potencial Utilización en Biotecnología”*

TESIS DOCTORAL

Programa Oficial Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

Luis Andrade Triviño

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Luis Humberto Andrade Triviño
ISBN: 978-84-9163-229-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/46937>



Universidad de Granada

*Departamento de microbiología. Facultad de Farmacia. Instituto de
investigación del Agua.*

Programa de doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

***“Cultivo y Utilización de Microorganismos
Fotosintéticos Psicrófilos Obtenidos de Laguna de La
Caldera en Parque Nacional de Sierra Nevada para su
Potencial Utilización en Biotecnología”***

*Luis Andrade Triviño
Tesis Doctoral*

*Directores:
Dr. Jesús González López
Dra. M.J. Belén Juárez Jiménez*

Universidad de Granada

Departamento de microbiología. Facultad de Farmacia. Instituto de investigación del Agua.

Programa de doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

***“Cultivo y Utilización de Microorganismos Fotosintéticos Psicrófilos
Obtenidos de Laguna de La Caldera en Parque Nacional de Sierra
Nevada para su Potencial Utilización en Biotecnología”***

Memoria para la obtención del grado de Doctor

Fdo. Luis Andrade Triviño

Directores.

***Fdo. D. Jesús González López
Catedrático en Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada***

***Fdo. Dña. Belén Juárez Jiménez
Profesora contratada doctora
Dpto. Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad Granada***

El doctorando, Luis Andrade Triviño y los directores de la tesis Jesús González López y Belén Juárez Jiménez garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y a hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, XX Mayo 2017

Director/es de la tesis

Fdo. Jesús González López

Fdo. Belén Juárez Jiménez

Doctorando

Fdo. Luis Andrade Triviño

A mis padres y hermanos.

A Belén Juárez, por su dedicación, apoyo y paciencia en cada capítulo y cada paso de este proyecto. Por adoptarme y rescatar este hermoso proyecto. Por no escatimar en tiempo y mimos cuando los necesité, donde además nació una gran amistad.

A Jesús González, por su constante presencia constructiva en todo el proyecto, por ser un excelente profesor y director, sobre todo por apoyar y darme la confianza necesaria en todas las ideas que se me presentaron y hacerme sentir parte de un gran equipo de trabajo

Agradezco el gran honor que fue poder compartir y conocer a Mavi, y mis agradecimientos a ella, por haber sido una persona clave en mi llegada al instituto del agua, puesto que, gracias a su dedicación, palabras, risas y armonía, me ofreció un grupo de trabajo cálido y de respeto, donde no solo salieron compañeros de trabajo sino grandes amigas. Todos mis respetos y recuerdos en tu eterno descanso.

A compañeras de instituto, Chiara. Paula, Patri, que sin sus abrazos y risas, no hubiera sido tan alegre mi estancia en la Universidad y por esa gran amistad que ha perdurado con el tiempo y espero que sea por mucho tiempo mas.

A Ginés González, por estar siempre con una sonrisa y alegrar cada día de trabajo en el instituto. Por ser un excelente profesional y sobre todo una maravillosa persona.

También a quienes forman parte del instituto de investigación del agua, profesores y personal, por ser parte de una gran familia y dar un hueco de acogida a este Chileno investigador.

A Jaime Lazúen Alcón por su desinteresada ayuda y gran paciencia para completar este proyecto.

A Armando y Miguel. Por haber sido y ser mi familia, mi hogar, un refugio y apoyo. Por ser una gran razón por la cual, elegir Granada como mi ciudad adoptiva. Por recibirme y darme siempre un respaldo cálido, grato, acogedor y de risa en cada momento compartido durante todo el proceso.

A Mariluz, Leo, Eva, Inés, Fran, Dani, Saloua, M^a Angeles, M^a Ascen, Helga, Benoit, Anita De Amor, Graciela, Monica, Andres, German, Alvarito, Rafa, Javier, Emilio, Aurora, Gonzalo, Frankie, Candy, Yessi, Noelia, Karen, Sonia, Lili, Nancy, Miguel, Nela, Pame, Angel, Pata, Paty, Rosa, Mónica y Chrsitian Sara, Sara Calvente, Sergio, Vicky, Vito, Belen, Carolina, Cecilia, Diana, Luis Carlos, Juanfran y tantos otros... que han hecho que Granada sea como mi hogar.

A mi madre por, ser la mejor madre del mundo, por tu amor incondicional por tu entrega y tu lucha, por ser mi ídolo y fuente de valores.

Y en especial a ti... Por darme el apoyo y amor que me faltaba para poder terminar este proyecto, por hacerme sentir único y mimarme cada vez que lo necesito. Por ser mi otra parte y por estar a mi lado en mi momento favorito del día y convertir todos los días en una razón más para estar a tu lado.

“Lo que puede el sentimiento, no lo ha podido el saber, ni el más claro proceder ni el más ancho pensamiento.... “
Violeta Parra, Chile

“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar.” Hipatia de Alejandría

Esta tesis doctoral fue realizada en el marco del proyecto “*Biotechnological recycle of olive mills washing water by microalgae*” acronym ALGATEC. Commission Communities European Project Proposal N° 232331, Coordination by BIOAZUL S.L. Instituto de investigación del Agua. Dpto. Microbiología. Universidad de Granada. Granada. España.

También gracias a la beca de estudios, otorgada por Ministerio de Asuntos Exteriores y AECID, para ser realizada en dependencias del Instituto de Investigación del Agua y Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada. España

1.- Introducción	17
1.- Ambientes Extremófilos	17
1.1.- Introducción	17
1.2.- Tipos de microorganismos extremófilos	20
1.3.- Ambientes psicrófilos acuáticos	28
2.- Ambientes psicrófilos acuáticos de Sierra Nevada	30
2.1.- Parque Nacional de Sierra Nevada	30
2.1.1.- Generalidades, Ubicación	30
2.1.2.- Reconocimientos y declaraciones de protección	32
2.2.- Lagunas glaciares y lagunillas de Sierra Nevada, presencia según épocas estaciones.	38
2.3.- Interés del estudio de comunidades microbianas en lagunas glaciares.	43
3.- Microalgas presentes en ambientes psicrófilos	54
4.- Microalgas en ambientes psicrófilos de sierra nevada	56
4.1.- Cultivo de microalgas	58
4.2.- Formulación de los medios de cultivo	60
4.3.- Técnicas de cultivo.	62
4.3.1.- Cultivo discontinuo o “batch”	63
4.3.2.- Cultivo continuo	63
4.3.3.- Cultivo Semi-Continuo	64
5.- Identificación de microorganismos fotosintéticos	66
5.1.- Extracción de ADN como herramienta identificación	66
5.2.- Identificación genética de microalgas	68
5.3.- Otras técnicas de identificación de microalgas	70
6.- Obtención de productos de interés en biotecnología a partir de microalgas	73
6.1.- Aspectos Generales	73
6.2.- Pigmentos en microalgas	77
6.3.- Vitaminas en microalgas	79
6.4.- Esteroles en microalgas	80
6.5.- Ácidos Grasos en microalgas	81
6.5.1.-Clasificacion de ácidos grasos	81

7.- Uso de microalgas en la obtención de Biodiesel	86
III.- Objetivos	87
II. Material y métodos.	98
1.- Sierra Nevada	99
1.1.- Selección de zonas de muestreo	99
1.2.- Toma de muestras, traslado y almacenamiento	100
2.- Medios de cultivo	101
2.1.- Medios de cultivo control	101
2.2.- Diseño del medio de cultivo Rodríguez-López modificado (RLMo)	104
2.3. Ensayos estadísticos	105
3.- Cepas control y ambiental	105
3.1. Cepas control empleadas	105
3.2. Preparación de precultivos e inóculos	106
3.3. Cámaras de cultivo	107
3.4. Medida de Nitrógeno y Fósforo	107
3.5. Crecimiento celular	110
4. Medio de cultivo y Estadística de superficie de respuesta (RSM)	112
4.1. Hipótesis de Modelo de 1° Orden	115
4.2. Hipótesis de Modelo de 2° Orden	116
4.3. Diseño experimental de superficie de respuesta	116
5. Cultivo en masa con agua procedente de la laguna de La Caldera	117
5.1. Verificación de concentración de nutrientes del medio RLMo	118
5.2. Toma de muestras de cultivos enriquecidos y Aislamiento	118
6.- Identificación Genética	119
6.1.- Análisis filogenético	119
6.2. Extracción de ADN y amplificación del rRNA 16S	120
6.4.- Purificación y secuenciación	123
6.5. Análisis informático de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos	123
7. Cultivos individuales de microalgas aisladas	124
7.1.- Preparación de inóculos de microalgas	124
7.2.- Cultivos de Masificación individual	125
8.- Estudio de Lípidos totales de cultivos individuales	126
8.1.- Reactores y condiciones de cultivo	127
8.2. Parámetros físico-químicos, Medida de pH y conductividad	128

9.- Estudios fisiológicos de microalgas por citometría de flujo	128
9.1.- Preparación de las muestras	129
9.2. Viabilidad Celular Total	129
9.3. Polarización de membrana mitocondrial	130
9.4. Estudio de Lípidos neutros y polares	132
10.- Análisis cualitativo/cuantitativo del contenido en ácidos grasos mediante GC/MS	132
IV.- Resultados	137
1.- Selección medio de cultivo	137
1.1.- Cultivos a 10°C y 20C en medios de cultivos RL, GL y RLMo con microalgas control SX1 y <i>Scenedesmus Obliquus</i>	137
1.1.1. Cultivos a 10° C con medios RL, GL y RLMo de microalga SX1	137
1.1.2. Cultivos a 10° C con medios RL, GL y RLMo de microalga S, Obliquus	138
1.1.3. Cultivos a 20° C con medios RL, GL y RLMo de microalga SX1	140
1.1.4.- Cultivos a 20° C con medios RL, GL y RLMo de microalga S.obliquus	141
1.2.- Modelización matemática	145
1.2.1.- Control de medio de cultivo mediante RSM	145
1.3.- Cultivo de microalgas obtenidas de laguna de La Caldera en parque Sierra Nevada.	147
1.3.1.- Selección de la época y zonas de muestreos	147
1.3.2.- Temperatura y pH.	149
1.4.- Aislamiento e identificación de microalgas de la laguna de La Caldera	150
1.4.1.- Árbol filogenético de las microalgas obtenidas a partir de los aislamientos realizados al inicio de verano de los años 2009, 2010 y 2011.	150
1.4.2. Árbol filogenético de las microalgas obtenidas a partir de los aislamientos realizados a finales de verano de los años 2009, 2010 y 2011	151
1.5.- Cultivos individuales	154
1.5.1.- Cultivo individual de Microalga S121 en medio RLMo	154
1.5.2.- Cultivo individual de Microalga S41 en medio RLMo	155
1.5.3.- Cultivo individual de Microalga S117 en medio RLMo	156
1.5.4.- Cultivo individual de Microalga S81 en medio RLMo	157
1.5.5.- Cultivo individual de Microalga S62 en medio RLMo	158
1.5.6.- Cultivo individual de Microalga S21 en medio RLMo	159
1.5.7.- Cultivo individual de Microalga S101 en medio RLMo	160
1.5.8.- Cultivo individual de Microalga S84 en medio RLMo	161
1.5.9.- Cultivo individual de Microalga S3 en medio RLMo	162
1.5.10.- Cultivo individual de Microalga S120 en medio RLMo	163

1.5.11.- Comparativa de cultivos individuales a 10° C	164
1.6.- Cultivo de microalga S21 y temperatura optima de crecimiento	166
2. Estudio de Viabilidad celular de microalga S21, mediante tinción con Diacetato de Fluoresceína (DAF) y Ioduro de Propidio (IP)	168
2.1. Estudio realizado a 10°C a los 8 días de incubación en BIL (Baja intensidad de Iluminación) y AIL (Alta Intensidad de Iluminación), y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% (p/v) y 50% (p/v).	168
2.2. Estudio realizado a 10°C a los 20 días de incubación con BIL (Baja intensidad de Iluminación) y AIL (Alta Intensidad de Iluminación), y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% (p/v) y 50% (p/v).	170
2.3. Estudio realizado a 20°C a los 8 días de incubación en BIL (Baja intensidad de Iluminación) y AIL (Alta Intensidad de Iluminación) y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% (p/v) y 50% (p/v).	172
2.4. Estudio realizado a 20°C a los 20 días de incubación en BIL (Baja intensidad de Iluminación) y AIL (Alta Intensidad de Iluminación) y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% (p/v) y 50% (p/v).	174
3. Estudio de Polarización de membrana de la microalga S21, mediante tinción con Yoduro de 3.3.- Dihexilcarbocianina (DiOC6) y Ioduro de Propidio (IP).	176
3.1. Ensayo realizado a 10°C durante 8 días de incubación en presencia de alta y baja intensidad de luz y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% y 50% (p/v).	176
3.2.- Ensayo realizado a 10°C durante 20 días de incubación en presencia de alta y baja intensidad de luz y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% y 50% (p/v).	180
3.3.- Ensayo realizado a 20°C durante 8 días de incubación en presencia de alta y baja intensidad de luz y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% y 50% (p/v)	184
3.4.- Ensayo realizado a 20°C durante 20 días de incubación en presencia de alta y baja intensidad de luz y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% y 50% (p/v).	188
4.- Estudio de la producción de lípidos polares y neutros de la microalga S21 en medio de cultivo RLMo mediante tinción con Rojo Nilo	192
4.1.- Ensayos realizados a 10°C durante 8 días de cultivo	192
4.1.1. Cultivo a 10°C durante 8 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).	192
4.1.2.- Cultivo a 10°C durante 8 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v)	194
4.1.3.- Cultivo a 10°C durante 8 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).	196
4.1.4. Cultivo a 10°C durante 8 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).	197
4.2. Ensayos realizados a 10°C durante 20 días de cultivo	199
4.2.1.- Cultivo a 10°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v)	199

4.2.2.- Cultivo a 10°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).	200
4.2.3.- Cultivo a 10°C durante 20 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).	202
4.2.4.- Cultivo a 10°C durante 20 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v)	203
4.3. Ensayos realizados a 20°C durante 8 días de cultivo	205
4.3.1.-Cultivo a 20°C durante 8 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).	205
4.3.2.- Cultivo a 20°C durante 8 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).	206
4.3.3.- Cultivo a 20°C durante 8 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).	208
4.3.4.- Cultivo a 20°C durante 8 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v)	210
4.4. Ensayos realizados a 20°C durante 20 días de cultivo	212
4.4.1.-Cultivo a 20°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v)	212
4.4.2.- Cultivo a 20°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).	214
4.4.3.- Cultivo a 20°C durante 20 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).	216
4.4.4.- Cultivo a 20°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v)	218
5. Caracterización cualitativa de lípidos esenciales de interés producidos por la microalga S21 en distintas condiciones nutricionales utilizando el medio de cultivo RLMo.	220
5.1. Estudio realizado a 10°C con medio de cultivo RLMo al 20%, p/v con baja intensidad de luz (BIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.	220
5.2. Estudio realizado a 10°C con medio de cultivo RLMo al 50%, p/v con baja intensidad de luz (BIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.	221
5.3. Estudio realizado a 10°C con medio de cultivo RLMo al 20%, p/v con alta intensidad de luz (AIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo	223
5.4. Estudio realizado a 10°C con medio de cultivo RLMo al 50%, p/v con alta intensidad de luz (AIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.	224
5.5. Estudio realizado a 20°C con medio de cultivo RLMo al 20%, p/v con baja intensidad de luz (BIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.	226
5.6. Estudio realizado a 20°C con medio de cultivo RLMo al 50%, p/v con baja intensidad de luz (BIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.	227
5.7. Estudio realizado a 20°C con medio de cultivo RLMo al 20%, p/v con alta intensidad de luz (AIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.	229

Indice

5.8. Estudio realizado a 20°C con medio de cultivo RLMo al 50%, p/v con alta intensidad de luz (AIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.	230
<i>V. Discusión</i>	235
<i>VI.- Conclusiones</i>	263
<i>VII.- Publicaciones y congresos</i>	265
<i>VIII.- Referencias bibliográficas</i>	267

A. Cultivo y aislamiento de microalgas aisladas de matrices acuáticas de Sierra Nevada

1. Ambientes extremófilos

1.1. Introducción

El término extremófilo fue acuñado por primera vez por Macelroy en 1974; este autor definió "Ambiente Extremo" como un término relativo, no considerándose un aspecto negativo para la supervivencia, ya que aunque determinadas condiciones ambientales extremas influyen desfavorablemente para unos microorganismos, a la vez pueden ser esenciales para la supervivencia de otros microorganismos. Según este autor, en términos de evolución, cabría plantearse la pregunta de si es razonable suponer que los microorganismos presentes en estos ambientes evolucionaron gradualmente a partir de microorganismos primitivos de ambientes intermedios. Parece evidente que los componentes celulares de los microorganismos extremófilos son estrictamente estables en condiciones ambientales extremas, lo que sugiere que aunque los extremófilos "modernos" podrían ser el resultado de la acumulación de gran cantidad de mutaciones a lo largo del tiempo, de igual modo podrían ser descendientes de microorganismos primitivos con capacidad de adaptarse libremente a una gran variedad de entornos. En torno a esta idea, un ejemplo sería la descripción realizada por Horikoshi en 1998 y Ma *et al.* en 2010 quienes demostraron la existencia de microorganismos localizados a grandes profundidades acuáticas capaces de desarrollarse en presencia de un amplio rango de concentraciones de sales, y bajo condiciones de presiones hidrostáticas de entre 500 y 1000 bares.

Se ha podido constatar que muchos de estos extremófilos pertenecen a los dominios *Archaea* y *Bacteria* (Van Den Burg, 2003; Margesin *et al.*, 2010), aunque también se han descrito otros microorganismos tales como las microalgas con alta capacidad de adaptación a entornos extremos (Takeuchi *et al.*, 2004); Un ejemplo sería *Chlamydomonas Novalis* (Stibal *et al.*, 2007) capaz de desarrollarse sobre la nieve tiñiendo de color rosa la superficies de neveros de alta montaña, junto a las algas del género *Chloromonas*. Otras algas adaptadas a estos ambientes y de amplia distribución son *Ancylonema nordenskiöldii* y *Mesotaenium berggrenii*, halladas en casi todos los glaciares estudiados por Takeuchi *et al.*, 2004. En la **Tabla 1** se describen algunos ejemplos de microorganismos extremófilos.

Tabla 1: Ejemplos de microorganismos extremófilos que han suscitado interés en los últimos años.

	Cualidad extremófila	Microorganismos	Referencia
18	Termófilos	<i>S. aquatilis</i>	Castenholz, 1967 Volk <i>et al.</i> , 2006 Pembroke <i>et al.</i> , 2016
	Termófilos extremos	<i>Synechococcus lividus</i>	Meeks <i>et al.</i> , 1971 Roy <i>et al.</i> , 2015 Paliwal <i>et al.</i> , 2016
	Hipertermófilos	<i>Pyrodictium occultum</i>	Uemori <i>et al.</i> , 1995 Mosé <i>et al.</i> , 2002 Utturkar <i>et al.</i> , 2016
	Acidófilos	<i>Metallosphaera sedula</i>	Huber <i>et al.</i> , 1989 Mosé <i>et al.</i> , 2002; Auernik <i>et al.</i> , 2010 Zebec <i>et al.</i> , 2015
	Alcalinotolerantes	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2015 Yamano <i>et al.</i> , 2015
	Alcalófilos	<i>Spirulina</i> sp.	Kristjansson <i>et al.</i> , 1995 Urek <i>et al.</i> , 2012 Varshney <i>et al.</i> , 2015
	Acidofilos	<i>Nitzschia capitellata</i> <i>Euglena mutabilis</i>	DeNicola <i>et al.</i> , 2000 Pedrozo <i>et al.</i> , 2010 Oeding <i>et al.</i> , 2015
	Halofilos tolerantes	<i>Microbulbifer salipaludis</i>	Yoon <i>et al.</i> , 2003 Tang <i>et al.</i> , 2008
	Halofilos extremos	<i>Salinicoccus</i> sp. <i>Haloferax volcanii</i>	Jayachandra <i>et al.</i> , 2012; Gaur <i>et al.</i> , 2015 Bhat <i>et al.</i> , 2015; Bitan-Banin <i>et al.</i> , 2003 Strillinger <i>et al.</i> , 2016; Hattori <i>et al.</i> , 2016
	Psicrófilos	<i>Nitzschia seriata</i> <i>Chlamydomonas</i> sp.	Fehling <i>et al.</i> , 2004; Teoh <i>et al.</i> , 2010 Coello-Camba <i>et al.</i> , 2015; Kim <i>et al.</i> , 2016
	<i>Barofilos</i>	<i>Moritella yayanosii</i>	Nogi Y. <i>et al.</i> , 1999; Xu <i>et al.</i> , 2003.; Arakawa 2006

Microorganismos extremófilos son, por tanto, aquellos organismos capaces de colonizar entornos drásticos para la supervivencia de la mayoría de las células comunes. (Stetter, 1999), siendo capaces de sobrevivir y crecer óptimamente a valores de pH inferiores a 5 o superiores a 8, bajo presiones superiores a 1 atm, concentraciones de salinidad superiores a 30 g/l o bajo condiciones térmicas inferiores a 10°C o superiores a 50°C (Constantinos *and* Antranikian, 2004;

Sharma *et al.*, 2012; Varshney *et al.*, 2015; Cobos-Vasconcelos *et al.*, 2015; Seckbach., 2015; Foflonker *et al.*, 2016)

Independientemente del valor de pH del entorno en que viva un microorganismo, el pH intracelular debe estar siempre próximo a la neutralidad con objeto de no provocar la destrucción de macromoléculas lábiles (Slonczwski *and* Foster, 1996; Seckbach *et al.*,2015). Una disminución de 1 o 2 unidades de pH tienen un efecto drástico sobre una población microbiana, no obstante, se han podido detectar que diversas especies de arqueas, microalgas y bacterias presentan la capacidad de adaptación a altas oscilaciones de pH gracias a potentes bombas de H⁺ en sus respectivas membranas celulares (Seckbach *et al.*, 2015). No son abundantes los microorganismos que aún viviendo en ambientes de pH extremo (inferiores a 2 o superiores a 10), pueden presentar oscilaciones de 1-1,5 unidades en su pH neutro intracelular.

Aunque la mayoría de los estudios se han realizado sobre procariontes y arqueas en ambientes altamente ácidos, igualmente la presencia de eucariontes es también de gran interés debido a que forman comunidades simbióticas complejas con protistas (Johnson, 1998). Hansen en 2002, demostró que algunos diflagelados tales como la microalga *Heterocapsa triquetra* tras ser aislada de ambientes con pH próximo a la neutralidad, puede desarrollarse en pH superiores a 9, lo cual indica que presenta una alta capacidad de adaptación a pH extremos. Por otro lado Steinberg *et al.*, en 1998 identificó especies de diversas cianobacterias (*Oscillatoria*, *Limnothrix* y *Spirulina*) en lagos Bávaros donde el pH oscila alrededor de 2. Seckbach *et al.* (1994) describieron la presencia de especies de *Chroococcus* en lagos canadienses con condiciones ácidas.

La clasificación de estos seres vivos, se realiza de acuerdo a la característica principal predominante en los diferentes hábitat, (**Tabla 2**) de tal modo que pueden localizarse tanto en áreas geotermales de altas temperaturas, como en regiones polares donde las temperaturas rozan los puntos de congelación; también pueden encontrarse en las regiones más profundas de los océanos donde imperan las altas presiones, e igualmente en manantiales caracterizados por condiciones extremas de alcalinidad o acidez (Constantinos *and* Antranikian, 2004; Seckbach *et al.*,2015). Por tanto, de acuerdo con sus condiciones de supervivencia, los organismos extremófilos se clasifican en varios grupos fisiológicos: barófilos, alcalófilos, acidófilos, halófilos, psicrófilos, termófilos e hipertermófilos (Van den Burg *et al.*, 2002).

Tabla 2: Clasificación de microorganismos extremófilos según las diferentes condiciones de hábitat. (Weigel, 1998, citado por Oliver *et al.*, 2000).

<i>Microorganismos extremófilos</i>	<i>Rango mínimo</i>	<i>Rango óptimo</i>	<i>Rango máximo</i>
<i>Temperatura</i>			
Termófilos (°C)		>50	>60
Termófilos extremos (°C)	>35	≥ 65	>70
Hipertermófilos (°C)	>60	≥ 80	> 85
Psicrófilos (°C)	≈ 0	< 25-30	
<i>pH</i>			
Acidófilos	> 0	2,5 - 3,0	
Alcalinotolerantes		< 8,5	≥ 9,0
Alcalófilos		≥ 8,5	≥ 10
<i>Concentración NaCl</i>			
Halofilos tolerantes (%)		2 - 5	
Halofilos moderados (%)		5 - 20	
Halofilos extremos (%)		20 - 30	
<i>Presión</i>			
Barofilos (MPa)	> 0,1	10 - 50	100

1.2. Tipos de microorganismos extremófilos

Termófilos y termófilos extremos

De los primeros microorganismos termófilos aislados cabe destacar *Bacillus stearothermophilus*, aislado en 1920 (Horne *et al.*, 1972), no obstante es a partir de los años 60 y 70 cuando se comienza a describir un gran número de microorganismos termófilos principalmente del dominio *Archaea* tales como *Thermus* sp. o *Sulfolobus* sp. siendo a partir de los años 80 cuando se comienza a utilizar el término "hipertermófilo" para aquellos microorganismos capaces de sobrevivir a temperaturas superiores a 80°C (Starich *et al.*, 1996), mayoritariamente descritos en el dominio *Archaea*.

Los microorganismos termófilos son capaces de crecer a temperaturas superiores a los 45°C (Vieille and Zeikis, 2001; Li *et al.*, 2005; Seckbach 1994, 2013); tal es el caso de *Bacillus acidocaldarius*, capaz de sobrevivir a temperaturas entre 45-70°C siendo su rango óptimo de crecimiento de 60-65°C (Darland and Brock, 1971), y *Bacillus stearothermophilus* cuyo rango de

supervivencia es de 30-70°C siendo su óptimo de 55°C (Nazina *et al.*, 2001). No obstante, cabe destacar que existen además termófilos extremos capaces de crecer óptimamente a altas temperaturas entre 70-80°C, como por ejemplo *Thermus aquaticus* o *Thermoanaerobacter ethanolicus*, e incluso superando los 80°C tales como *Thermotoga maritima* o *Pyrococcus furiosus* (Pedroza, 2001). En relación a las adaptaciones a temperaturas extremas, la termoestabilidad de las proteínas es un componente primordial (Jaenicke and Zavodszky, 1990).

Acidófilos

Los ambientes ácidos surgieron como consecuencia de procesos naturales geoquímicos tales como la producción de gases sulfurosos en las aberturas hidrotermales y en algunas fuentes termales, o bien de las propias actividades metabólicas de microorganismos acidófilos (Hutchinson *et al.*, 1966), siendo conocido que la mayoría de los microorganismos presentes en estos ambientes son los denominados fotosintéticos (Gyure *et al.*, 1987; Lopez-Archilla *et al.*, 2001).

En general, se consideran acidófilos a aquellos microorganismos que son capaces de vivir a pHs inferiores a 5 (Madigan *et al.*, 2003), existiendo subdivisiones en esta categoría en función de las temperaturas de crecimiento; así, Johnson *et al.* en 2002, describieron un grupo de microorganismos (arqueas) capaces de crecer en ambientes ácidos y por sobre los 60° C.

La diversidad de microorganismos en estos ambientes aun no es ampliamente conocida, no obstante, se han descrito microorganismos tales como *Alicyclobacillus acidoterrestres* anteriormente conocida como *Bacillus acidoterrestis* aislado de diferentes tipos de suelos con valores de pH altamente ácidos (Komitopoulou *et al.*, 1999), demostrándose, además, que presenta la cualidad de ser termófila (Deinhard *et al.*, 1987; Komitopoulou *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Gocmen *et al.*, 2005); Bevilacqua *et al.*, 2012).

Existen minas metalúrgicas cuyos drenajes de aguas, generalmente ácidos, contienen altos niveles de metales pesados y donde es posible encontrar ciertos microorganismos capaces de desarrollarse en tales condiciones (Robb *et al.*, 1995); Nancuqueo *et al.*, en 2012 aisló a partir de minas de cobre abandonadas, microorganismos fotosintéticos acidófilos, tales como *Chlorella protothecoides* y *Euglena mutabilis*; estos microorganismos presentaban la capacidad de crecer y desarrollarse a pH cercanos a 2,5, producían a su vez manitol y glucosa, glúcidos que podían ser

metabolizados rápidamente por bacterias tales como, *Acidiphilium* sp. y *Acidobacterium* sp. demostrando de este modo una relación simbiótica microalgas-bacterias (Ñancuqueo *et al.*, 2012).

| 22

Se ha podido comprobar que la biodiversidad de este tipo de ambientes no es constante en el tiempo, de tal modo que pueden producirse desplazamientos de especies a lo largo de los años. Lukešová *et al.* (1987) observaron las poblaciones algales en las lagunas de desechos de minerías en la región de Most (República Checa), comprobando que en el proceso inicial de colonización de la matriz acuática había especies cocales de clorofitas las cuales se vieron desplazadas por diatomeas y cianofitas al cabo de un año de colonización; en estos ambientes, a partir de los siete años -de modo habitual- aparecen las filamentosas del grupo de xantofíceas convirtiéndose en las especies mayoritarias.

Por otro lado, Okibe *et al.* en 2012, aislaron cuatro microorganismos procedentes de un reactor de lixiviación, atribuyendo que debido a su característica acidófila, se favorecía la disolución de minerales sulfurosos tóxicos. Por otro lado, en minería también se ha demostrado que *Acidithiobacillus caldus*, no solamente tiene la capacidad de realizar procesos de lixiviación a pH altamente ácido, sino que también posee un mecanismo de resistencia frente a la presencia de arsénico liberado durante dicho proceso (Dopson *et al.*, 2001).

En general, los microorganismos acidófilos se caracterizan por presentar una capacidad de adaptación a ambientes extremos ácidos gracias a la presencia de *extremoenzimas* capaces de operar a $\text{pH} < 1$ y localizadas en sus paredes celulares y membranas citoplasmáticas (Vieille, 1996). Esta característica fisiológica hace de estos microorganismos el objetivo de una serie de investigaciones dirigidas a la búsqueda de enzimas cuya actividad enzimática no se vea afectada por el pH o que pueda operar a amplios intervalos de pH sin sufrir desnaturalización. (Golyshina *et al.*, en 2011).

Alcalófilos y alcalinotolerantes

En los últimos 30 años se ha incrementado el interés de este tipo de microorganismos (Muntyan *et al.*, 2005), ya que son capaces de proliferar en ambientes alcalinos, como por ejemplo lagos sódicos o suelos muy carbonatados donde el pH es superior a 9 (Madigan, 2003).

Dependiendo de las condiciones químicas el agua y de las densidades poblacionales, algunas microalgas, cianobacterias, eubacterias y aqueobacterias, pueden causar una coloración notable en los cuerpos de agua llamados *blooms* (Tindall *et al.*, 1988).

Muchos de ellos tienen una velocidad óptima de crecimiento con valores de pH próximos a la neutralidad, pero con capacidad para desarrollarse a pH superiores a 9 a velocidades de crecimiento menores (Horikoshi, 1998); Este tipo de microorganismos son conocidos como alcalinotolerantes.

Los microorganismos alcalófilos, generalmente se caracterizan por tener tolerancia y afinidad con ambientes salinos (halófilos) (Madigan, 2003) y, al igual que en caso que los acidófilos, poseen mecanismos metabólicos responsables del mantenimiento de la neutralidad en su interior (Ulukanli *et al.*, 2001; Pulz *et al.*, 2004); En estos microorganismos las extremoenzimas se localizan en las partes funcionales más externas de la célula (pared celular y membrana citoplasmática), siendo las responsables de la protección interna celular. (Liszka *et al.*, 2012).

El interés de este tipo de microorganismos radica en la producción de enzimas alcalofilas tales como amilasas, xilanasas, manasas y proteasas (Honda *et al.*, 1985; Akino *et al.*, 1987; Fujiwara *et al.*, 1987; Qureshi *et al.*, 1991; Kumar *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Shivakumar *et al.*, 2012), siendo, por ejemplo, *Bacillus cereus* un microorganismo de gran interés biotecnológico por su actividad proteasa (Guffanti *et al.*, 1986; Uyar *et al.*, 2011).

En relación a las microalgas, es de destacar la utilización de cepas de tales como *Spirulina platensis*, *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. para el tratamiento de aguas con alto contenido en nitrógeno y fósforo (Sarethy *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2012; Beuckels *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Mennaa *et al.*, 2015; Sukačová *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015; Gutwinski *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016), así como la utilización de la biomasa como fertilizantes para suelos agrícolas (Ak *et al.*,

2013; Coppens *et al.*, 2015; Renuka *et al.*, 2015; Doğan-Subaşı *et al.*, 2016) o para la eliminación de pesticidas en suelos contaminados (Matamoros *et al.*, 2016).

Halofilos tolerantes, moderados y extremos

Hasta el momento, son muchos los estudios realizados sobre microorganismos con capacidad para desarrollarse a altas concentraciones salinas. Una de las microalgas más estudiadas por su halotolerancia es *Dunaliella salina* (Tornabene *et al.*, 1980; Borowitzka *et al.*, 1984; Ginzburg., 1993; Oren, 2002; Chen *et al.*, 2012; Miandoob *et al.*, 2015). En la **Tabla 3** se describen algunos de estos microorganismos.

Tabla 3: Microalgas halófilas y halotolerantes.

<i>Microorganismo</i>	<i>Referencia</i>
<i>Chroomonas sp</i>	Henderson <i>et al.</i> , 1992
<i>Tetraselmis sp</i>	Fon Sing <i>et al.</i> , 2014
<i>Tetraselmis suecica</i>	Moheimani <i>et al.</i> , 2016
<i>Dunaliellasalina</i>	Nguyen <i>et al.</i> , 2016
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Perez <i>et al.</i> , 2016
<i>Aphanothece halophytica</i>	Monisha <i>et al.</i> , 2016

En relación a la microbiota aislada de ambientes salinos, se ha podido demostrar que la adaptación de la composición lipídica de sus membranas citoplasmáticas frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye notables modificaciones en la composición de fosfolípidos y ácidos grasos (Ramírez *et al.*, 2006), siendo la principal estrategia de estos microorganismos la acumulación masiva de diferentes concentraciones de compuestos iónicos y no iónicos, en el citoplasma con objeto de lograr compensar la presión osmótica del medio que lo rodea (Madern *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 2006); así, por ejemplo, se ha demostrado que en *Archeas* la acumulación de KCl conlleva una adaptación a las altas concentraciones salinas, lo que deriva en la protección de las proteínas y otros componentes celulares tales como los ribosomas (Dennis *et al.*, 1997).

Por otro lado, Moronta *et al.* en 2006 cultivó *Chlorella sorokiniana*, y comprobó que el incremento de la salinidad producía un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la microalga estudiada. A 25 y 35 mg/L, la densidad celular disminuyó en un 97,9% y en un 98,5%

respectivamente, en cultivos no axénicos. En cultivos mixotróficos, la microalga creció a todas las salinidades, con un descenso hasta del 61,8% cuando se cultivó a 40 mg/L.

Barófilos

En 1998, Barbosa-Canova *et al.* establecieron una clasificación de microorganismos en función de su capacidad para desarrollarse en situaciones de presiones superiores a la atmosférica. (Tabla 4).

Tabla 4: Clasificación general de microorganismos en función de la presión a que se desarrollan

<i>Microorganismos</i>	<i>Rango de presión (MPa)</i>
Barófilos	>40
Euriboricos	0,1 - 40
Barodúricos	40 - 202

De acuerdo con Lee *et al.* (2002), en general, los microorganismos no sobreviven a presiones superiores a 400-600 MPa, sin embargo, algunas especies esporuladas sí son capaces de sobrevivir a presiones mayores a 1000 MPa a temperatura ambiente (Palou *et al.*, 1997). Una de las estructuras celulares afectadas por la presión en los microorganismos es su pared celular, debido a la desnaturalización irreversible que se produce en las enzimas que intervienen en la replicación y transcripción de ADN, siendo las *Gram positivas* las que más se afectan por las altas presiones (Cheftel *et al.*, 1995; López-Caballero *et al.*, 2000).

Delong *et al.* (1997) describieron algunas proteobacterias tales como *Shewanella*, *Photobacterium*, *Colwellia* y *Moritella* capaces de desarrollarse a muy bajas temperaturas y altas presiones. La mayoría de los estudios de barófilos están enfocados principalmente hacia la búsqueda de metodologías que permitan detectarlos y eliminarlos de alimentos sin modificar las características organolépticas y nutricionales de los alimentos (Rendueles *et al.*, 2011).

Psicrófilos

Los ambientes psicrófilos representan la mayor parte de los ambientes presentes en la biosfera (Morgan-Kiss *et al.*, 2008). Los océanos, lagos y en especial zonas de alta montaña están expuestas a temperaturas por debajo de 0°C (Georlette, 2004), lo que despierta un especial interés debido a que son hábitat donde proliferan microorganismos adaptados al frío. Las aguas de alta montaña están sometidas a fluctuaciones de temperatura a lo largo de todo el año, y presentan variaciones en relación al pH, tensión de oxígeno, transparencia y condiciones nutricionales (Wehr and Sheath, 2003; Margesin *et al.*, 2011; Ciccazzo *et al.*, 2015; Maccario *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2015).

| 26

En 1887, Forster aisló microorganismos que podían crecer y reproducirse a 0°C, desde entonces se han llevado a cabo muchos estudios acerca de estos. Kobori *et al.*, (1984) realizaron uno de los primeros estudios de microorganismos psicrófilos exponiendo los potenciales usos biotecnológicos del metabolismo enzimático de estos microorganismos tales como su posible uso como aditivos en detergentes, industria alimentaria, biorremediación ambiental, biotransformación y biología molecular entre otras aplicaciones. En la actualidad esta línea de investigación ha sido objetivo de numerosos estudios (Karan *et al.*, 2012; Varshney *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2015; Seckbach *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Dickinson *et al.*, 2016). **(Tabla 5)**

Tabla 5: Enzimas extremófilas obtenidas de diferentes microalgas

Enzimas	Microorganismo	Referencia
α-Amilasa	<i>Alteromonas haloplanctis</i>	Kumagai <i>et al.</i> , 2009 Mao <i>et al.</i> , 2015 Feller <i>et al.</i> , 2003
β-Lactamasa	<i>Psychrobacter immobilis</i>	Hsieh <i>et al.</i> , 2015
Ca ²⁺ , Zn ²⁺ -proteasa	<i>Pseudomonas</i> sp.	Bhagwat <i>et al.</i> , 2015 Struvay <i>et al.</i> , 2012
Lipasa	<i>Psychrobacter</i> sp	De Santi <i>et al.</i> , 2012 Kim <i>et al.</i> , 2015
Glucosa-6-fosfato deshydrogenase	<i>Koliella antarctica</i>	Ferrara <i>et al.</i> , 2013
Quitinasa	<i>Glaciozyma antarctica</i>	Ramli <i>et al.</i> , 2012 Alcaíno <i>et al.</i> , 2015
carboxil esterase	<i>Oleispira antarctica</i>	Lemak <i>et al.</i> , 2012 Tchigvintsev <i>et al.</i> , 2015

Un ecosistema particularmente interesante son las nieves perpetuas, la superficie de hielos y las nieves de los glaciares de alta montaña donde se han podido aislar diversas especies de microalgas y bacterias. Entre las microalgas más comunes se encuentran *Chlamydomonas nivalis*, microorganismo aislado de glaciares situados a una altitud mayor a 1600 m (Pocock *et al.*, 2004); Además se han aislado especies del genero *Chloromonas*, así como otras especies adaptadas y de amplia distribución tales como *Ancylonema nordenskiöldii* y *Mesotaenium berggrenii*, estos últimos se han hallado en una gran mayoría de glaciares (Takeuchi *et al.*, 2004; Hodgson *et al.*, 2009; Uetake *et al.*, 2010; Vonnahme *et al.*, 2015).

Los psicrófilos se han convertido en un importante recurso para la prospección biológica debido a sus adaptaciones al frío. Algunos ejemplos de microorganismos adaptados a ambientes fríos son:

Bacterias negativas	Gram	<i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Polaromonas</i> , <i>Psychroflexus</i> , <i>Polaribacter</i> , <i>Moritella</i> , y algunas especies del género <i>Pseudomonas</i>
Bacterias Gram positivas		<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i>
Levaduras		<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i>
Archaeas		<i>Methanogenium</i> , <i>Methanococcoides</i> , <i>Halorubrum</i>
Hongos		<i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i>
Microalgas		<i>Chloromonas</i> (Margesin <i>et al.</i> , 2002; Fendrihan <i>et al.</i> , 2012) <i>Nitzschia sp</i> , <i>Thalassiosira sp.</i> (Van Baalen <i>et al.</i> , 1985) <i>Ancylonema nordenskiöldii</i> , <i>Cylindrocystis brebissonii</i> ; <i>Mesotaenium berggrenii</i> (Uetake <i>et al.</i> , 2010)

La capacidad de los psicrófilos para sobrevivir y prosperar a temperaturas bajas se debe a que han sufrido numerosas adaptaciones al frío tales como: a) la reducción de la actividad enzimática, b) aumento de la despolarización de sus membranas, y como consecuencia la reducción del transporte nutrientes y de metabolitos secundarios a través de dichas membranas, c) disminución de los niveles de transcripción y por tanto reproducción celular, y d) reducción de la desnaturalización de proteínas por la modificando del plegamiento de proteínas y la formación de hielo intracelular (Russell *et al.*, 1990; Gerday *et al.*, 2000; Varshney *et al.*, 2015; Seckbach *et al.*, 2015).

Estos microorganismos han evolucionado con éxito modificando algunas expresiones genotípicas y/o fenotípicas (D'Amico *et al.*, 2006). La microalga *Nitzschia seriata* común en los hielos profundos del ártico, posee una temperatura óptima de crecimiento que va desde los 6°C a

los 10°C (Smith *et al.*, 1994); estos autores demostraron que esta microalga disminuye su actividad fotosintética a temperaturas inferiores a 4°C, incrementando su tamaño, y siendo los rangos letales de temperatura para su supervivencia las inferiores a -1,8 y superiores a 15°C.

| 28

Se ha descrito que la mejor adaptación de los microorganismos fotosintéticos se debe a la optimización de su eficiencia metabólica y a la compensación del nivel de proteínas, y no a la velocidad de crecimiento (Willem *et al.*, 1999; Feller *et al.*, 2003). Un ejemplo sería el estudio realizado con la enzima *Rubisco*; esta enzima se ha obtenido tanto de dos microalgas psicrófilas del género *Chloromonas* como de microalgas mesófilas tales como *Chlamydomonas reinhardtii*, siendo más termoestable la obtenida de microalgas psicrófilas (Devos *et al.*, 2002).

1.3.- Ambientes psicrófilos acuáticos

Los océanos, ocupan gran cantidad de la superficie terrestre y mantienen una temperatura promedio por debajo de los 5°C (Margesin *et al.*, 2010), existiendo zonas como los cascos polares que permanecen congeladas de forma prácticamente continua todo el año.

Hooker en 1840 fue de los primeros investigadores en dar a conocer la presencia de vida en ambientes marinos de baja temperatura; posteriormente, en 1887, Forster describió enzimas aisladas de peces que crecían a temperaturas cercanas a 0°C.

Una gran parte de los microorganismos marinos se desarrollan perfectamente a temperaturas de entre 0 y 4°C aunque la temperatura óptima de desarrollo de muchos de ellos se encuentra entre 18 y 22°C; en su mayoría son bacterias *Gram* negativas localizadas en la columna de agua (Zobell *and* Upham, 1944; D'Amico *et al.*, 2006; Baek *et al.*, 2015) y bacterias *Gram* positivas localizadas en los sedimentos marinos. (Moriarty *and* Hayward, 1982).

Habitualmente se considera que la biodiversidad disminuye con el aumento progresivo de la latitud, llegando a registros mínimos en las zonas polares más extremas. Este patrón se atribuye a un gradiente de temperatura, humedad y duración de la estación estival (Smith, 1994; Convey, 2001; Kappen, 2004) sin embargo, estas conclusiones están basadas, en términos generales, en observaciones y patrones de estudios ecológicos realizados con organismos más complejos y no tendría por qué suceder en el caso de la diversidad microbiana. De hecho, en la Antártida se han descrito altísimas diversidades tanto de procariotas (Tindall, 2004) como de

eucariotas (Lawley *et al.*, 2004), observándose que los mayores índices de biodiversidad terrestre de todo el continente Antártico se dan en los archipiélagos antárticos y subantárticos localizados en la periferia del continente (Convey *and* Stevens, 2007).

En relación a las regiones polares, las comunidades microbianas están dominadas mayoritariamente por cianobacterias del orden *Oscillatoriales* (Vincent *et al.*, 2000). Velázquez *et al.*, en 2011 estudiaron la secreción de exopolisacáridos de la cianobacteria *Leptolyngbya* sp., llegando a la conclusión de que originaban estructuras cohesivas capaz de proporcionar una base muy propicia para la creación de microhábitats donde posteriormente podrían asentarse otros microorganismos con diferentes características ecológicas.

En estos hábitats, los ecosistemas están sometidos a condiciones extremas como los ciclos de congelación-descongelación, variaciones en la radiación recibida (incluida la radiación ultravioleta) y aportes desiguales tanto de nutrientes como de salinidad (Velázquez *et al.*, 2011), siendo ambientes típicos de zonas polares del Ártico y del Antártico.

Los *Oscillatoriales* polares tienen una amplia tolerancia térmica (Tang *et al.*, 1997). En términos generales, la mayor cantidad de microorganismos suelen encontrarse en la zona más superficial, donde se localiza el fitoplancton. Estos últimos, se encuentran constituidos principalmente por cianobacterias y algas eucariotas, capaces de extenderse por todos los océanos mediante las corrientes marinas (Riquelme *et al.*, 2003). Es también de destacar que el fitoplancton interactúa con otros microorganismos tales como zooplancton, bacterias y virus (Suttle *et al.*, 1990; Plum *et al.*, 2015; Frada *et al.*, 2015; Lima-Mendez *et al.*, 2015; Montiel-Martínez *et al.*, 2015; Ramanan *et al.*, 2016).

2. Ambientes psicrófilos acuáticos de Sierra Nevada

2.1.- Parque Nacional de Sierra Nevada

2.1.1. Generalidades, ubicación

| 30

El macizo de Sierra Nevada, se sitúa en la Península Ibérica, próximo a la costa del Mediterráneo entre las provincias de Granada y Almería, concretamente se extiende desde la zona centro sureste. Bautizada como la “*Sierra del Sol*” en la Edad Media, este sistema montañoso alberga un patrimonio cultural de alto valor, derivado de los legados romanos, visigodos y árabe. **(Figura 1)**



Figura 1: Panorámica de Sierra Nevada y la ciudad de Granada

Constituida por un sistema montañoso de clara diferenciación geográfica, se encuadra dentro del sistema Penibético, siendo las coordenadas geográficas entre las que se encuentra de: 36°55' a 37°15' de latitud norte, y de 2°56' a 3°38' de longitud oeste. Sierra Nevada es una alineación montañosa de dirección Este-Oeste, de unos 80 km de longitud y anchura variable, entre 20 y 35 km, con una extensión total de unas 200.000 hectáreas.

Esta cordillera se caracteriza por presentar más de 20 cumbres coronadas por picos situados por encima de los 3.000 metros sobre el nivel del mar, entre las que destacan el *Mulhacén*, con 3.482 metros que lo convierten en el pico más alto de la Península Ibérica, y el pico *Veleta*, con una altura con 3.392 metros. Los grandes desniveles existentes, unido a la diferenciación térmica, propician la presencia de cinco de los seis pisos de vegetación (bioclimáticos) de la

región Mediterránea, con la consiguiente variabilidad de ecosistemas que esto lleva emparejado. (BOJA núm. 155, 2011 de 09 de agosto de 2011, Decreto 238/2011 de 12 de julio).

Sierra Nevada presenta cierta homogeneidad en lo referente a su geología, ya que, la mayor parte de su superficie está asentada sobre micaesquistos, materiales metamórficos de edad paleozoica, pertenecientes desde el punto de vista geológico al complejo nevado-filábride (zona interna de las Cordilleras Béticas).



Figura 2: Laguna de *La Caldera*

Son materiales impermeables, pero en las zonas altas, debido al grado de alteración de los mismos, se posibilita la infiltración de las aguas de deshielo y escorrentía. Alrededor de estos materiales y a cotas más bajas hay una serie de dolomías y calizo-dolomías de edad triásica generalmente muy fracturadas, pertenecientes al Complejo Alpujárride. (García Canseco, 2001).

La arista de cumbres permite repartir sus aguas en dos vertientes hidrográficas muy diferentes entre sí: la vertiente mediterránea al Sur es la más extensa, y es donde se encuentran la mayor parte de las lagunas de alta montaña existentes en Sierra Nevada, estando caracterizada por suaves lomas que drenan sus aguas al mar Mediterráneo. En su lado opuesto se localiza la vertiente Atlántica, al Norte, presentando fuertes pendientes, y donde tiene lugar el nacimiento de numerosos ríos ubicados casi todos ellos en la cuenca del Río Guadalquivir, drenando sus aguas hacia el océano Atlántico (Castillo Martín *et al.*, 1999).

Todas estas altas cumbres destacan, por tanto, por sus peculiaridades árticas que los convierten en elementos de alto valor científico.

2.1.2. Reconocimientos y declaraciones de protección

Sierra Nevada, Reserva de la Biosfera

(Datos obtenidos de: <http://reddeparquesnacionales.mma.es/parques/>)

| 32

El programa MaB (*Man and the Biosphere*) de la UNESCO se constituye como nuevo ámbito de investigación en las relaciones entre los sistemas ecológicos y el hombre.

El concepto de "*Reservas de la Biosfera*" se concibió a mediados de la década de los 70, aunque el conjunto de orientaciones concretas no se plasmaron hasta 1983, momento en el que se celebró el Congreso Internacional de Reservas de la Biosfera, celebrado en la ciudad de Minsk (Bielorrusia). De esta reunión emanó un Plan de Acción que contenía directrices, recomendaciones y una serie de medidas necesarias a poner en práctica en estos espacios.

Posteriormente, en la Cumbre de Río de Janeiro (1992), se planteó la necesidad de revisar y actualizar nuevos documentos de trabajo para la Red Internacional de Reservas de la Biosfera. Finalmente, en el marco de la Reunión Internacional de Expertos sobre las Reservas de la Biosfera, celebrada en Sevilla, en 1995, se elaboró un nuevo documento que adecuaba y consolidaba el concepto de *Reserva* a las actuales condiciones ambientales y sociales.

Básicamente, las Reservas han de cumplir tres funciones:

- ♣ La conservación de la diversidad biológica, los recursos genéticos y los ecosistemas.
- ♣ El desarrollo sostenido de los recursos de la región, en estrecha colaboración con la población local.
- ♣ Su integración en una Red Internacional como base para la investigación, la enseñanza y la vigilancia del medio ambiente.

Existen más de trescientas Reservas de la Biosfera en todo el mundo. En 1977 la UNESCO declaró las dos primeras Reservas de la Biosfera españolas: Grazalema y Ordesa-Viñamala. En 1978 se añadieron Doñana y el Montseny y, en 1986, prueba del reconocimiento internacional, de la singularidad y su riqueza natural excepcional, *Sierra Nevada* fue declarada

por la UNESCO *Reserva de la Biosfera*, constituyéndose la decima en España, de un total de quince reservas.

Sierra Nevada, Parque Natural

Tres años más tarde, mediante la Ley 2/1989, de 18 de julio, (BOJA 60/1989, de 27 de julio; BOE 201/1989, de 23 de agosto), por la que se aprueba el Inventario de Espacios Naturales Protegidos de Andalucía y se establecen medidas adicionales para su protección, en su artículo 7, se declara Parque Natural a Sierra Nevada (Granada-Almería), detallándose una superficie de 140.200 hectáreas.

De acuerdo con los criterios de clasificación, los espacios naturales protegidos se agrupan en figuras declarativas. Dentro de cada figura declarativa, los distintos espacios se relacionan con las provincias en que se integran. Cuando un mismo espacio natural protegido afecta a más de una provincia, se incluye dentro de aquella a la que corresponde la mayor superficie. Así, en el caso de Sierra Nevada se considera Parque Natural de Granada-Almería.

Breve descripción del recorrido del Parque Natural de Sierra Nevada

Por Decreto 64/1994, de 15 de marzo, por el que se aprueba el Plan de Ordenación de los Recursos Naturales y el Plan Rector de Uso y Gestión del Parque Natural de Sierra Nevada, se precisó la descripción literaria de los límites de este Parque (artículo 3.2) en su Anexo 3º:

Por el *Oeste*, comienza en el lugar de la confluencia del término municipal de la Peza con el Río Padules. Continúa por éste último hasta el Barranco de los Tejos por donde asciende al Pico de las Cuatro Lindes, la Fuente de los Amigos y el Collado del Pino, para continuar por el Barranco del Pino hasta confluir con el Río Maitena. Continúa en dirección *Sur* por el monte desde el pueblo de Lanjarón hasta su intersección con el río Lanjarón y de aquí hacia el sur por la acequia Mesquerina hasta contactar con el límite de los términos municipales de Lanjarón-Cañar y Cañar-Orgiva. Una vez alcanzada Trevélez, continúa por el *Este* hacia Mecina Alfahar y Laroles. Sigue hacia el *Norte* hasta Bayarcal y Laujar-Andarax, llegando hasta el término municipal de Lugros, La Peza y Güejar, lugares tomados como punto de partida.

Términos municipales del Parque Natural de Sierra Nevada:

Almería: Bayarcal, Paterna del Río, Laujar de Andaras, Beires, Ohanes, Fiñana, Abrucena, Abla, Doña María, Nacimiento, Alcolea, Fondón, Terque, Alboloduy, Canjayar y Ragol.

| 34

Granada: Güejar-Sierra, Monachil, La Zubia, Gojar, Dilar, Padul, Durcal, Nigüelas, Lecrín, Lanjarón, Pañar, Orjiva, Suportujar, Pampaneira, Dólar, La Calahorra, Lanteira, Lugros, Bubión, Capileira, Portugos, Busquistar, Almegijar, Cástaras, Trevaes, Juviles, Berchules, Alpujarra de la Sierra, Valor, Nevada, Huénejar, Ferreira, Aldeire y Jerez Marquesado.



Figura 3: Laguna de *Las Yeguas*. Parque Nacional de Sierra Nevada. Fotos tomadas en Julio de 2011.

Sierra Nevada, Parque Nacional

(Datos obtenidos de la legislación vigente tanto en BOJA como en BOE acerca de Parques Nacionales españoles así como de la red de Parques Nacionales:

<http://reddeparquesnacionales.mma.es/parques/>).

La Red de Parques Nacionales es un sistema integrado para la protección y gestión de una selección de las mejores muestras del Patrimonio Natural Español. Está conformada por los Parques Nacionales que la integran, el marco normativo, los medios materiales y humanos, las instituciones y el sistema de relaciones necesario para su funcionamiento. Su finalidad es asegurar la conservación de los Parques Nacionales, y posibilitar su uso público y la mejora del conocimiento científico de sus valores naturales y culturales, así como fomentar una conciencia social conservacionista, el intercambio de conocimientos y experiencias en materia de desarrollo sostenible, la formación y cualificación de los profesionales que trabajan en ella y su incorporación y participación en redes y programas internacionales.

Mediante la Ley 3/1999, de 11 de enero, se declaró el Parque Nacional de Sierra Nevada, lo que supuso la incorporación de los ecosistemas naturales de alta montaña mediterránea en la Red de Parques Nacionales. Este hecho fue de gran relevancia ya que con ello se agudizaba y blindaba la protección y preservación de este espacio natural situado en el lugar más meridional de la Península Ibérica. A partir de este momento, su gestión ha quedado vinculada a la Administración General del Estado así como a la Comunidad Autónoma de Andalucía. De esta manera, de acuerdo con la doctrina de la Reserva de la Biosfera, se configura para el macizo de Sierra Nevada un sistema de protección con una zona núcleo, que se corresponde con el Parque Nacional, para la que se establece un régimen jurídico de protección más intenso y amplio, gestionado desde 1 de julio de 2006 exclusivamente por la Comunidad Autónoma de Andalucía..(BOJA núm. 155, 2011 de 09 de agosto de 2011, Decreto 238/2011 de 12 de julio).

El Parque Nacional de Sierra Nevada viene, por tanto, a sumarse a la Red de Parques Nacionales (Ley 3/99, de 11 de enero de 1999), alcanzándose la cifra de 12 parques en todo el territorio español. Con ello, Sierra Nevada incorpora a dicha Red los ecosistemas de alta montaña mediterránea, que hasta el momento no estaban representados.

La Ley 5/2007, de 3 de abril, de la Red de Parques Nacionales, (BOE, núm. 81) establece en su artículo 3 la definición de Parques Nacionales como aquellos espacios de alto valor ecológico y cultural, poco transformados por la explotación o actividad humana que *-en razón de la belleza de sus paisajes, la representatividad de sus ecosistemas o la singularidad de su flora, de su fauna, de su geología o de sus formaciones geomorfológicas-* poseen unos valores ecológicos, estéticos, culturales, educativos y científicos destacados cuya conservación merece una atención preferente, declarándose por todo ello de interés general del Estado. La declaración del Parque Nacional de Sierra Nevada es, por tanto, la primera que se produce por las Cortes Generales tras la modificación de la Ley 4/89, de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora y Fauna Silvestre, por la Ley 41/97.

Declarar Parque Nacional a Sierra Nevada ha tenido por objeto:

- Proteger la integridad de sus ecosistemas, que constituyen una extraordinaria.
- Representación de los sistemas mediterráneos de montaña y alta montaña.
- Asegurar la conservación y la recuperación, en su caso, de los hábitats y las especies.
- Contribuir a la protección, el fomento y la difusión de sus valores culturales.
- Promover el desarrollo sostenible de las poblaciones cuyo territorio esté, en todo o en parte, dentro del Parque Nacional.
- Aportar al patrimonio común una muestra representativa de los ecosistemas de la alta montaña mediterránea, incorporando el Parque Nacional de Sierra Nevada a los programas nacionales e internacionales de conservación de la biodiversidad.

Tabla 1: Legislación Básica de de la Red de Parques Nacionales de España.

<http://reddeparquesnacionales.mma.es>

PATRIMONIO NATURAL Y BIODIVERSIDAD

LEY 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad.
(BOE, nº 299, de 14 de diciembre de 2007).

CREACIÓN DEL OAPN

REAL DECRETO 1055/1995, de 23 de junio por el que se modifica parcialmente la estructura orgánica básica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
(BOE, nº 158, de 4 de julio de 1995)

ADSCRIPCIÓN DEL OAPN AL MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Real Decreto 401/2012, de 17 de febrero, por el que se desarrolla la estructura orgánica básica del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
(BOE, nº 42, de 18 de febrero de 2012).

RED DE PARQUES NACIONALES

Ley 4/1989, de 27 de marzo, de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora Y Fauna Silvestres . (BOE nº 74, de 28 de marzo de 1989).
(El régimen sancionador aplicable a los Parques Nacionales es el establecido en el Título VI de esta Ley, por lo demás derogada por la ley 42/2007).

LEY 5/2007, de 3 de abril, de la Red de Parques Nacionales.(BOE, nº 81, de 4 de abril de 2007).

CONSEJO DE LA RED DE PARQUES NACIONALES

REAL DECRETO 12/2008, de 11 de enero, por el que se regulan la composición y el funcionamiento del Consejo de la Red de Parques Nacionales. (BOE, nº 11, de 12 de enero de 2008).

COMISIONES MIXTAS Y PATRONATOS

REAL DECRETO 1760/1998, de 31 de julio, por el que se determina la composición y funcionamiento del consejo de la Red de Parques Nacionales, de las Comisiones Mixtas de Gestión de dichos parques y de sus Patronatos. (BOE, nº 209, de 1 de septiembre de 1998).

PLAN DIRECTOR

REAL DECRETO 1803/1999, de 26 de noviembre, por el que se aprueba el Plan Director de la Red de Parques Nacionales. (BOE, nº 209, de 1 de septiembre de 1998).

Sentencia del Tribunal Constitucional 101/2005, de 20 de abril de 2005. Conflicto positivo de competencia planteado por el Consejo de Gobierno de la Junta de Andalucía en relación con el Real Decreto 1803/1999, por el que se aprueba el Plan director de la red de parques nacionales

(BOE núm 120, de 20 de mayo de 2005).

SUBVENCIONES

REAL DECRETO 1229/2005, de 13 de octubre, por el que se regulan las subvenciones públicas con cargo a los Presupuestos Generales del Estado en las áreas de influencia socioeconómica de los Parques Nacionales. (BOE núm. 246, 14 octubre 2005).

LEY DE DECLARACIÓN Y RECLASIFICACIÓN DE LOS PARQUES NACIONALES

LEY 3/1999, de 11 de enero, por la que se crea el Parque Nacional de Sierra Nevada (BOE, nº 11, de 13 de enero de 1999).

LEGISLACIÓN DE LAS COMUNIDADES AUTÓNOMAS

(BOE, nº 141, de 14 de junio de 2006).

PLANES DE ORDENACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES DE LOS PARQUES NACIONALES

DECRETO 238/2011, de 12 de julio, por el que se establece la ordenación y gestión de Sierra. (BOJA, nº 114, de 9 de agosto 2011)

LEY DE PARQUES NACIONALES, aprobada en diciembre de 2014, el Consejo de la Red, y el Plan Director de la Red de Parques Nacionales, aprobado con rango de Real Decreto.

Otros reconocimientos:

Los Parques Nacionales españoles tienen un reconocimiento internacional que viene dado por su estado de conservación, planificación y gestión integrada de los recursos naturales.

En concreto, Sierra Nevada posee diferentes reconocimientos a nivel internacional el ya citado de Reserva de la Biosfera (1986). Lugar de Interés Comunitario para la Red Natura 2000 (Lic), así como la declaración de zona ZEPA (zona especial de protección para las aves), en el año 2000 (RED NATURA, 2000). El día 2 de Octubre de 2004, Europarc concedió la Carta Europea de Turismo Sostenible (CETS) al Parque Nacional de Sierra Nevada (Boletín Europarc, núm. 18 de noviembre de 2004 (<http://www.redeuroparc.org>)).

En definitiva, como consecuencia de las distintas denominaciones citadas anteriormente, en el macizo de Sierra Nevada, se encuentran tanto el *Parque Nacional*, ocupando las altas cumbres, como el *Parque Natural*, lugar periférico al anterior y que incluye algunas zonas habitadas y núcleos de población. Se dispone así de una graduación en los niveles de protección del macizo que permite una diferente regulación de los usos y aprovechamientos.

Es interesante comentar que en la actualidad existe una red de seguimiento del Cambio Global. Se trata de una plataforma abierta para la captura y el intercambio de datos e información sobre el cambio global en la Red de Parques Nacionales. El objetivo del programa es crear una infraestructura de toma, almacenaje y procesamiento de datos, además de su intercambio con la Comunidad Científica, que permita el desarrollo de un sistema de evaluación y seguimiento de los impactos que se pueden generar en la red de Parques Nacionales españoles como consecuencia del Cambio Global; se basa, por tanto, en la información obtenida a partir de la toma de datos *'in situ'*. Del conjunto de los catorce espacios incluidos en la Red NATURA, Sierra Nevada ha sido seleccionada como uno de los Parques más representativos para el estudio del Cambio Climático Global.

Por último, cabe mencionar que ambos parques (el Natural y el Nacional) de Sierra Nevada han sido designados *Lugares de Importancia Comunitaria* (LIC) de la *Región Biogeográfica Mediterránea*, por decisión de la Comisión Europea de 19 de julio de 2006, de conformidad con la Directiva 92/43/CEE, de 21 de mayo de 1992, (LIC Sierra Nevada, código ES6140004).

2.2. Lagunas glaciares y lagunillas de Sierra Nevada, presencia según épocas estacionales

Aspectos generales

(Datos obtenidos de <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente>)

Sierra Nevada representa el reducto más meridional del glaciario en Europa el cual dejó su impronta en la fisonomía del paisaje de cumbres conformando circos, valles glaciares y nichos de nivación que, tras la retirada de los hielos, dieron lugar a las lagunas que actualmente se asientan sobre estas formaciones. Sin embargo, la capacidad erosiva de los glaciares fue de escasa consideración, debido a la baja latitud de este sistema montañoso y a la dureza de los materiales geológicos, por lo que las cubetas generadas por la incidencia del glaciario son, en general, de modestas dimensiones, tanto en lo que se refiere a su superficie como a su profundidad.

En el núcleo central de la Sierra, donde se encuentran las cumbres más elevadas, afloran materiales del conjunto *Nevado-Filábride*, constituido por materiales de zócalo donde predominan micaesquistos acompañados de cuarcitas, mármoles, gneises, serpentinas y anfibolitas; rodeando al anterior aparece el conjunto Alpujárride, formado por micaesquistos del Paleozoico y Precámbrico, filitas con cuarcitas del Permotriás y una potente formación, en el tramo superior, de calizas y dolomías triásicas.

La red hidrográfica de Sierra Nevada está formada por numerosos arroyos, ríos y barrancos con poca agua en invierno y un caudal elevado en primavera y principios de verano, momento en el que comienza la fusión de las nieves. Entre los principales cursos fluviales destaca el río Izbor, que nace en su núcleo central, el río Genil, que recoge las aguas de la vertiente septentrional, y los ríos Andarax y Guadalfeo, que tienen su origen en la parte más meridional de la sierra.

En Sierra Nevada, la morfogénesis glacial ha configurado unas cincuenta cubetas localizadas, en su mayoría, entre los 2800 y 3040 m de altitud y entre las que destaca la laguna de *La Caldera* (**Figura 2**), con aproximadamente dos hectáreas de superficie y doce metros de profundidad máxima o la laguna de *Las Yeguas* (**Figura 3**). También son conocidas las lagunas de *Aguas Verdes*, *Laguna Larga*, *Peñón Negro*, *Hondera*, *Vacares* o *Alterra* (**Figura 4**). Las lagunas de *La Caldera* y *Aguas Verdes* son las que se sitúan a cotas más elevadas, a 3040 m y 3030 m de altitud, respectivamente.

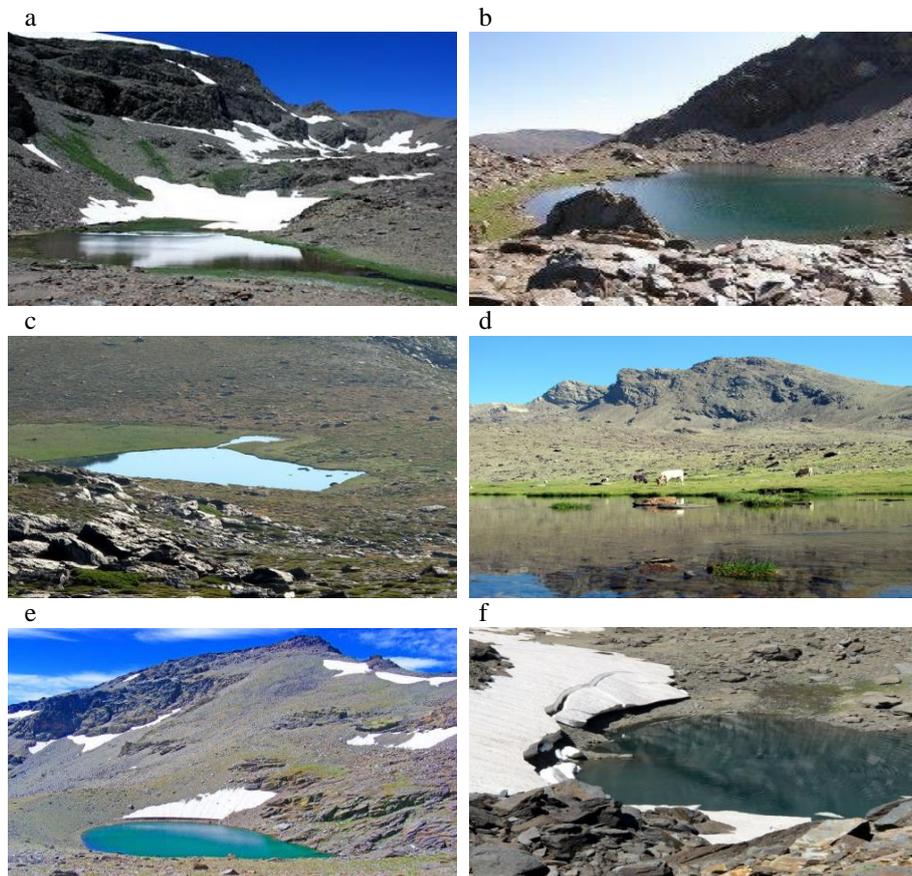


Figura 4: Algunas lagunas de Sierra Nevada. a: Laguna de Aguas Verdes; b: Laguna Larga; c: Laguna del Peñón Negro; d: Laguna Hondera; e: Laguna de Vacares; f: Laguna Altera.

Las lagunas de Sierra Nevada se alimentan por aportes superficiales (sistemas epigénicos) de escorrentía y deshielo, existiendo, en la mayoría de ellas, pequeños arroyuelos afluentes.

Aunque en general se trata de cubetas de aguas permanentes, están sujetas a fluctuaciones de nivel en el periodo estival, más o menos acusadas en función de su localización y de sus características morfométricas, de manera que algunas de ellas pueden llegar a secarse completamente en verano. En estos sistemas, los efluentes naturales, de existir, se forman por rebose, si bien puede producirse cierta percolación del agua contenida en algunas cubetas a través de fracturas y diaclasas, con lo que se incrementa la pérdida añadida a la evaporación.

Desde un punto de vista hidrogeológico, debido a la naturaleza dura y cristalina de los materiales, en general micaesquistos con distintos grados de metamorfismo prácticamente impermeables, no existen acuíferos en sentido estricto y, por tanto, los aportes de agua subterránea no son relevantes. Se puede hablar de cierta acumulación de agua relacionada con micaesquistos fracturados o acumulación de derrubios de gran potencia, pero en cualquier caso el agua almacenada tiene escasa entidad.

El complejo de lagunas glaciares de Sierra Nevada representa una particular tipología hidroquímica dentro del ámbito regional andaluz. Lejos de la tendencia general de los humedales andaluces, las lagunas de Sierra Nevada, que permanecen heladas durante gran parte del año, son de aguas dulces y débilmente mineralizadas, lo que constituye las señas de identidad de este tipo de ecosistemas acuáticos de alta montaña. **(Figura 5)**



Figura 5: Chorreras de la Laguna de *La Mosca*

Características físico-químicas

La naturaleza cristalina del sustrato rocoso sobre el que se asientan confiere, por un lado, una alta resistencia a la erosión hídrica, con lo que el aporte de iones por disolución del sustrato es reducido. Y por otro, limita la variabilidad en la composición química de las aguas de estas lagunas, debido a la naturaleza geológica relativamente homogénea de dicho sustrato.

A principios de primavera, cuando suele comenzar el deshielo, surgen numerosas lagunas, lagunillas y charcas en los circos, depresiones y cubetas. La mayor parte son almacenamientos efímeros. Ya que, conforme avanza el estiaje, la acción de factores climáticos como el sol y el

viento, dan lugar a una alta evaporación que unida a las posibles pérdidas por filtración y la carencia de nuevas aportaciones externas, hacen que la mayor parte de ellas desaparezcan.

| 42

El amplio abanico de lagunas glaciares representa sistemas acuáticos oligotróficos, ajenos a actividades antrópicas importantes, cuyo único aporte de nutrientes externo es el recibido por los flujos de aerosoles provenientes del Sahara. En los sistemas acuáticos oligotróficos la importancia de los aportes de nutrientes atmosféricos ha sido demostrada desde hace tiempo; por otro lado, las investigaciones realizadas en las lagunas glaciares de Sierra Nevada situadas entre las cotas de 2.800 y 3.100 metros apoyan la idea de que pueden afectarse de forma importante por el flujo de aerosoles (Morales Baquero *et al.*, 2001). La principal afección que trae consigo estas aportaciones es el aumento del nivel de fósforo, lo que puede cambiar su carácter oligotrófico (Gibson *et al.*, 1995).

En estudios realizados en algunos de estos cuerpos de agua (Consejería de Medio Ambiente, 2000, 2004) se han registrado salinidades que varían, aproximadamente, entre 0,02 g/l y 0,05 g/l. Estos valores van asociados a conductividades eléctricas igualmente muy bajas, ya que en los periodos estivales, en los que aumenta la concentración iónica de las aguas, no se suelen superar los 0,05 mS/cm.

En relación con la composición iónica de estas lagunas, se trata de sistemas de aguas bicarbonatadas en cuanto a su composición aniónica, en la que los iones cloruro y sulfato suelen representar, conjuntamente, porcentajes inferiores al 50%. Su composición catiónica aparece mayoritariamente representada por secuencias del tipo Ca- Mg-(Na).

Otra de las características limnológicas de estas lagunas de alta montaña es la baja concentración de clorofila A, considerada como estima de la biomasa fitoplanctónica, que confiere a la mayoría de estos medios acuáticos el carácter de oligotróficos en función de este parámetro.

Las bajas concentraciones de clorofila A (frecuentemente inferiores a los 3 mg/m³) responden a un reducido aporte de materia orgánica y, por consiguiente, de nutrientes, aunque se han llegado a registrar moderadas concentraciones puntuales (en torno a 10 mg/m³) en algunos de estos cuerpos de agua.

En general, son sistemas que presentan una capacidad de tamponamiento relativamente más elevada que la que sería esperable por la naturaleza de las rocas sobre las que se asientan las cubetas, con valores de alcalinidad que han estado comprendidos entre 0,07 meq/l y 0,4 meq/l y valores de pH entre 6,5 y 8,5 unidades. En este sentido, algunos autores han señalado la contribución de episodios esporádicos, pero no infrecuentes, de precipitación (lluvia o nieve) cargada de material particulado procedente del norte de África que no sólo modifican las propiedades ópticas de los sistemas y representan entradas alóctonas de nutrientes (determinando incrementos puntuales de la concentración de clorofila), sino que constituyen la fuente principal en la generación de la alcalinidad de las aguas (Morales-Baquero, *et al.*, 1992; Cruz-Pizarro, 1994).

2.3. Interés del estudio de comunidades microbianas en lagunas glaciares

Estudios realizados sobre la microbiota de ambientes psicrófilos glaciares y lagunas alpinas

De todo lo expuesto anteriormente, resulta evidente la necesidad de estudio de la microbiota de lagunas de alta montaña, ya que se sitúan en la base de la pirámide biológica. El impacto climático está ya ocasionando aceleradas variaciones sobre los microorganismos, los cuales modificarán inexcusablemente las características tanto biológicas como físicas y químicas de los ecosistemas alpinos, afectando inevitablemente a otros organismos que dependen de las rutas bioquímicas microbianas.

Los microorganismos juegan un indiscutible papel en la ecología del planeta y más aún en sistemas altamente protegidos donde el paisajismo, la fauna y la flora constituyen la referencia en relación a los diferentes grados de protección. No obstante, en contraposición con el interés de naturistas y ecólogos tradicionales cabe cuestionarse si el grado de prioridad debería comenzar por la protección y control de los ecosistemas microbianos, ya que éstos constituyen los pilares de todas las rutas metabólicas y bioquímicas del resto de los seres vivos.

Es bien conocido que, hasta las últimas décadas, no se le ha dado la suficiente importancia a la presencia microbiana en el aire (Sommaruga *and* Casamayor, 2009). Los sistemas de blindaje microbiano en los ecosistemas “al aire libre” cada vez son más cuestionados por la comunidad de microbiólogos, dado que existe una interconexión global a través de corrientes aéreas y terrestres de la que no escapan los microambientes lagunares de alta montaña.

La información disponible hasta el momento sobre los diferentes grupos microbianos en diversos medios ambientes acuáticos es todavía insuficiente para poder obtener una idea global de los ecosistemas microbianos (Sommaruga *and* Casamayor, 2009). En el caso de los lagos, existen relativamente pocos estudios que prueben que los factores ambientales, geográficos y locales afectan de manera decisiva a la composición de la comunidad bacteriana de un ecosistema.

Yannarell *and* Triplett (2004) estudiaron el efecto positivo de los factores de "distancia geográfica" (500 km) y "ambientales" sobre la composición de la comunidad bacteriana en el norte y el sur de los lagos de Wisconsin. A escala espacial más pequeña (menor de 10 km), Crump *et al.* (2007) utilizando las técnicas de estudio de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) mediante secuenciación del gen 16S rRNA, demostraron que la distancia geográfica y la conexión física del lago (es decir, debida a las corrientes) influyen en la distribución del bacterioplancton. Por el contrario, Reche *et al.* (2005) trabajando a una escala espacial similar, no detectaron la influencia del factor "distancia" en las lagunas de alta montaña de Sierra Nevada. Considerando que la ejecución de los análisis biogeográficos OTUs es un procedimiento válido, la falta de información sobre la afiliación taxonómica no permite la comparación con filotipos ya descritos desde fuera de la región estudiada (Sommaruga *and* Casamayor, 2009).

Teóricamente, podría decirse que los microorganismos pueden ser transportados por todo el planeta y que el único factor que puede limitar la habitabilidad de transporte de innumerables especies son las propias condiciones de su maquinaria metabólica. De este modo, bacterias estrictamente psicrófilas podrían ser transportadas a diversos lugares del planeta, prosperando únicamente si alcanzan nuevos ambientes psicrófilos; en este sentido, también podría intuirse que bacterias psicrotolerantes aerotransportadas desde ambientes de alta montaña podrían sobrevivir en valles próximos a altas montañas donde las temperaturas son más moderadas.

Uno de los conceptos más debatidos en Microbiología del Medio Ambiente, especialmente en el ámbito acuático, es si los microorganismos se encuentran sujetos a lo que se denomina "*Biogeografía*". A pesar de que se ha demostrado que existen patrones biogeográficos entre taxones microbianos al aire libre, la heterogeneidad del medio ambiente tiene en muchos casos, una influencia parcial en la variación espacial de la diversidad microbiana (Hughes-Martiny *et al.*, 2006;. Ramette *and* Tiedje, 2007).

Moulin *and* Chiapello (2006) aseguran que la generación de grandes masas de polvo en forma de aerosoles atmosféricos es un fenómeno creciente a escala global que se ha visto acelerado en los últimos años por efectos ligados al Cambio Global, destacando dos puntos de referencia de emisión de partículas: por un lado, la zona Sahara-Sahel en África y por otro la zona Gobi-Takla-Makan en Asia. Dichas masas se desplazan a miles de kilómetros y pueden portar miles de millones de microorganismos con capacidad para colonizar nuevas áreas del planeta con similares condiciones ambientales. En relación al estudio de la microbiota de lagos de alta montaña, concretamente en lagunas en la región del monte Everest, Sommaruga *and* Casamayor (2009), nos comentan que dichas lagunas actúan como colectores naturales muy útiles para estudiar las diferentes comunidades microbianas inmigrantes y/o invasoras. Del diagnóstico de estos ecosistemas se puede intuir que los lagos de gran altitud son probablemente colectores de bacterias del aire que se transportan a través de la atmósfera debido al levantamiento de masas de aire y la orografía que conjuntamente provocaría precipitaciones a altas altitudes (Lovett *and* Kinsman (1990).

En los lagos de una de las regiones del Everest, Sommaruga *and* Casamayor (2009), encontraron que los principales grupos filogenéticos bacterianos fueron *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Cyanobacterias*. Utilizando las similitudes de las secuencias del gen 16S rRNA de las muestras estudiadas con las secuencias disponibles en el GenBank, estos autores observaron la presencia de Betaproteobacterias tales como *Polaromonas* sp. y *Alcaligenes* sp., especies que se encontraban estrechamente relacionadas con las secuencias descritas anteriormente en esta base de datos. En relación a las Alfabroteobacterias, detectaron la presencia de diversas cepas idénticas a *Sphingomonas* y *Flectobacillus* sp., registradas en el lago Craters de Oregon (USA). Igualmente, detectaron la presencia de *Synechococcus* con una alta similitud secuencial con

especies aisladas de lagos alpinos de Austria. También pudieron verificar la presencia de Actinobacterias, así como de Flavobacterias.

| 46

Por otro lado, hemos de advertir como dato importante la gran influencia de las variables físicas sobre la comunidad microbiana, tales como la turbidez, a la vez relacionada con la extensión geográfica del emplazamiento de los lagos, y las zonas de captación de agua. De acuerdo con Sommaruga *and* Casamayor (2009) resulta bastante difícil de averiguar cómo estas variables influyen directa o indirectamente de una forma separada o combinada sobre la composición de la comunidad microbiana de los lagos, ya que por ejemplo, existen evidencias de que en los lagos con tiempos de retención de agua de hasta 200 días, la entrada de agua controla la composición de la comunidad bacteriana (Lindström, *et al.*, 2006). Otro de los factores interesantes que destacan es el tiempo de muestreo (época estacional de toma de muestra), indicando que por razones de logística ésta se realizó en la estación libre de hielo para evitar la rápida descarga de masas de hielo o nieve sobre las lagunas de estudio.

Hemos de destacar la importancia de la influencia de la radiación ultravioleta incidente a determinadas alturas y que afectan y seleccionan, de algún modo, a la composición de la comunidad bacteriana de estas aguas (Sommaruga, 2001). Con excepción de las cuencas glaciares, los lagos de montaña se encuentran entre los ecosistemas acuáticos más transparentes del planeta (Sommaruga *and* Augustin, 2006). Bajo estas condiciones, la radiación UV solar puede causar diferentes tipos de efectos negativos sobre los organismos heterótrofos acuáticos y fototróficos, incluyendo la inhibición de la fotosíntesis, el daño del ADN y la reducción en el crecimiento celular (Sommaruga, 2003); a pesar de que los organismos en los lagos alpinos desarrollan diversas estrategias para reducir al mínimo los daños causados por la radiación UV (Sommaruga, 2001), las bacterias son relativamente sensibles a esta radiación dañina sobre todo en las aguas superficiales (Sommaruga *et al.*, 1997).

Además, existe la posibilidad de adaptación de especies acuáticas de diferentes ambientes tales como el marino y el de agua dulce y por consiguiente la posibilidad de tolerancia de concentraciones de sales por parte de los microorganismos transportados. Las emisiones anuales de polvo a la atmósfera global son altas y alcanzan valores de entre 500 y $5000 \cdot 10^6$ toneladas (Goudie *and* Middleton, 2006). Otros estudios también informan sobre la importancia de los suelos y la microcapa superficial del mar como fuente de microorganismos que entran en la

atmósfera (Aller *et al*, 2005, Schlesinger, *et al.*, 2006). Por ejemplo, se ha podido demostrar que las bacterias cultivables depositadas sobre un glaciar del Himalaya a 6.518 m de altitud, se encontraban relacionadas con el transporte de polvo continental y los aerosoles marinos, como consecuencia del pre-monzón y monzón (Zhang *et al.*, 2007). Esta hipótesis parece tener bastante sentido en tanto este tipo de vientos de dirección sur-norte a través del cinturón ecuatorial durante el verano están cargados de agua y puede actuar como transportadores de microorganismos.

Entre los últimos trabajos sobre estudios de biodiversidad en lagos de alta montaña destaca la investigación llevada a cabo por Chen Xi, *et al.* (2011) en los humedades de la zona alpina de la meseta de Qinghai-Tibet situados a 3400m de altura. Estos autores describen la presencia de diversas especies de *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Burkholderiaceae*, *Brevundimonas*, *Zoogloea*, *Chryseobacterium*, *Novosphingobium*, *Verrucomicrobia bacterium*, *Janthinobacterium*, *Azospirillum*, *Polaromonas*, *Antarctic bacterium*, *Hydrogenophaga*, entre otros. Dichos estudios fueron llevados a cabo por análisis de aguas mediante DGGE y posterior secuenciación del gen que codifica el rRNA 16S. En general, en esta zona alpina, el 55% de la microbiota analizada correspondió a las Proteobacterias (17,5% alpha proteobacteria, 17,5% beta proteobacteria, 17,5% delta proteobacteria and 2,5% gamma proteobacteria) y un 20% correspondiente a Bacteroidetes.

Se podría por tanto explicar que se produce una distribución global o cosmopolita de determinados taxones bacterianos. El mecanismo que parece más probable es el transporte mediante aerosoles permitiendo la colonización de determinadas especies en espacios altamente distantes (Bovallius *et al.*, 1980). Por otro lado, existen evidencias de que las endosporas bacterianas y hongos pueden ser transportados mediante este mecanismo incluso a escala inter-hemisférica (Griffin *et al*, 2002; Próspero *et al*, 2005).

En relación a esta idea, las bacterias conocidas por producir endosporas, y que por tanto son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir a condiciones extremas durante el transporte en la atmósfera, son típicamente bacterias grampositivas del *Phylum Firmicutes* con bajo contenido en G+C (Reisenman and Nicholson, 2000). Los miembros de este grupo bacteriano generalmente no se encuentran en el bacterioplankton de los ecosistemas de agua dulce y marinos. Por lo tanto, cabría preguntarse cómo otras bacterias logran sobrevivir a la dispersión por la atmósfera. Resulta evidente que la composición de los aerosoles a través de las corrientes

de aire juega un papel fundamental en la dispersión de las bacterias. (Goudie *and* Middleton, 2006). Además, estas partículas pueden proporcionar cierta protección contra la exposición directa de alta radiación UV durante el transporte en la troposfera. Los aerosoles de polvo típicos incluyen minerales de arcilla que contienen cantidades cuantitativamente importantes de agua y materia orgánica (Goudie *and* Middleton, 2006), lo cual puede proporcionar las condiciones idóneas para mantener el metabolismo basal de las bacterias hasta que -finalmente- encuentran un hábitat adecuado que poder colonizar.

Los lagos de gran altitud son probablemente hábitats muy eficientes para la colonización bacteriana a través de la atmósfera, ya que debido a la orografía, en estas zonas se producen fuertes precipitaciones que aumentan con la altitud (Lovett *and* Kinsman, 1990). Igualmente se podría pensar que es posible el transporte bacteriano a través de aves, pero a estas alturas parece ser menos relevante.

Por último cabe destacar que las estimaciones recientes sugieren que a nivel mundial hasta 10^{18} células bacterianas por año son transportados por aerosoles (Griffin *et al.*, 2002), lo cual explica de algún modo la posibilidad de comunidades dinámicas en los lagos alpinos de todo el planeta.

Estudios microbianos y fisico-químicos en las lagunas de Sierra Nevada

Las lagunas de alta montaña son lugares de gran singularidad; constituyen ecosistemas únicos, donde aún persisten especies endémicas, pero también son lugares de acusada fragilidad, ya que son particularmente sensibles a los cambios ambientales y pueden funcionar como sistemas de alarma temprana (Nauwerck, 1994) lo que las convierte en buenos indicadores de cambios ambientales al carecer “aparentemente” de influencia antropogénica. Por este motivo, a lo largo de las últimas décadas, se está generalizando su estudio, tanto desde un punto de vista abiótico como del estudio de sus distintas comunidades.

Pese al interés de las lagunas, podemos afirmar que existe una carencia detallada de información sobre las lagunas de Sierra Nevada (Castillo Martín *et al.*, 2005). Ya Round (1973) indica que la existencia de un buen número de especies denominadas *indiferentes* debería ser consecuencia de la escasez de estudios realizados al respecto.

Con idea de ir aumentando los estudios y la información sobre las lagunas glaciares de Sierra Nevada, actualmente se continúan realizando convenios entre la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y la Universidad de Granada. En 2005, con la colaboración del Instituto del Agua de la Universidad de Granada se llevó a cabo la catalogación de las lagunas de alta montaña (Castillo Martín, 2009).

Entre las primeras publicaciones encontradas sobre las lagunas de Sierra Nevada, son interesantes destacar la de Martínez, 1975 y la de Sánchez Castillo *et al.*, 1989, donde se realiza un estudio acerca de la caracterización del fitoplancton en relación con las características físico-químicas de diez lagunas de alta montaña; entre las lagunas estudiadas se encuentra *La Caldera*, de la cual se ha realizado una caracterización física y química: medidas de la temperatura, el oxígeno disuelto, mineralización, pH y alcalinidad, así como un estudio cualitativo y cuantitativo de los fosfatos, nitratos y silicatos; por otro lado, se estudió la estructura de las comunidades fitoplanctónicas, en las cuales resultaron ser mayoritarios los grupos de diatomeas, clorofíceas y zigofíceas. Posteriormente se han continuado realizando estudios de tipo limnológico en esta laguna así como en otras de Sierra Nevada (Morales-Baquero *et al.*, 1999; Linares Cuesta, 2000).

En 1990, Echevarria *et al.*, proporcionaron datos acerca de la distribución y taxonomía de la composición del plancton de la laguna de *La Caldera*. Los resultados mostraron una dominancia en el fitoplancton de la cianobacteria *Cyanarcus* sp., seguida por la crisófito *Chromulina nevadensis* y la diatomea *Cyclotella ocellata*, el zooplancton fue dominado por el copépodo *mixodiaptomus laciniatus*.

Respecto a la laguna de *Las Yeguas*, se observó que la mayor abundancia de fitoplancton tenía lugar nada más derretirse los hielos, época en la que se evidencia un incremento de radiación solar y una mayor disponibilidad de nutrientes acumulados en la nieve durante el invierno, observándose además que la mayor abundancia en zooplancton se detectaba en el mes de septiembre; este equilibrio entre el fitoplancton y el zooplancton determinó que existía una eficiente utilización de los recursos nutricionales. La tasa de autótrofos y heterótrofos fue menor a uno lo que les hizo pensar que había una alta productividad de algas por unidad de biomasa, controlada por el zooplancton (Cruz-Pizarro *et al.*, 1994).

Por otro lado, se evaluó el fósforo liberado por el zooplancton en la laguna de *La Caldera*, observándose valores más altos cuando el nauplii de *Mixodiaptomus laciniatus* dominaba la comunidad de zooplancton, siendo la tasa de recirculación de fósforo significativamente alta (Carrillo *et al.*, en 1996).

El comensalismo basado en el carbono suplido por el fitoplancton y la competición por nutrientes minerales, son importantes interacciones entre bacterias y fitoplancton en sistemas oligotróficos. Ambas interacciones están influenciadas por la actividad del zooplancton. Para estudiar la relación entre las algas y las bacterias en la laguna de *La Caldera*, Reche *et al.* en 1997 estudiaron la correlación entre el fitoplancton, las bacterias y la dinámica del fósforo. Según estos autores la abundancia de bacterias y la biomasa de algas tienen una relación positiva, siendo el carbono orgánico liberado por el fitoplancton mayor al requerido por las bacterias. Por otro lado, la alta biomasa de zooplancton satisface la demanda de fósforo por las algas y las bacterias, pero la liberación de carbono orgánico por el fitoplancton disminuye. Esta disminución del suplemento de carbono orgánico por las algas para las bacterias, podría conducir a un cambio en la interacción entre algas y bacterias desde competición a comensalismo.

En otro estudio publicado en 1999 por Morales-Baquero *et al.*, se analizan los cambios en el nitrógeno total (TN), el fósforo total (TP), el nitrógeno inorgánico disuelto (DIN) y el fósforo reactivo soluble (SRP), en 31 lagunas de Sierra Nevada (entre las que se encuentra *La Caldera*). El muestreo se realizó al principio y a la mitad de la época de deshielo, concretamente entre el 15-27 julio y 3-21 de agosto de septiembre de 1991. Estos autores determinaron que parámetros tales como la clorofila A, el nitrógeno total y el fósforo total aumentaban, mientras que la tasa de TN/TP disminuía entre los dos periodos; por el contrario, DIN, SRP, y las tasas de DIN/SRP fueron similares en ambos periodos en cada laguna. También comprobaron que la tasa de DIN/SRP fue menor en las lagunas de menor tamaño y que dicha tasa se incrementaba con el tamaño de la laguna. (Morales-Baquero *et al.*, 2006).

Por otro lado, se estudió la respuesta de la comunidad planctónica a las variaciones ocurridas en el volumen de *La Caldera* entre los años (1995-1997). Como consecuencia de un descenso de precipitaciones en 1995, la profundidad de la laguna disminuyó 2 metros, lo que contribuyó al incremento del fósforo disponible, causando la diversificación de la comunidad planctónica, y un ratio de autótrofos/heterótrofos inferior a 1. En 1996 el volumen volvió a

umentar y esto causó una severa limitación de fósforo siendo el ratio de autótrofos/heterótrofos igual a 1. Como consecuencia de estas variaciones de volumen se observó una disminución de bacterias y fitoplancton (Medina-Sánchez *et al.*, 1999). Así, se aislaron 13 cepas bacterianas de los sedimentos de la laguna de *La Caldera* y fueron caracterizadas morfológicamente y mediante parámetros bioquímicos. Las cepas fueron identificadas como *Streptomyces galbus* (Langó *et al.*, 1999).

En 2001, Villar-Argaiz. *et al.*, presentan un artículo sobre los cambios inter e intra anuales en la comunidad de fitoplancton en la laguna de *La Caldera*, durante un periodo de 3 años, teniendo en cuenta la influencia de las fuentes de fósforo externas (aporte atmosférico) e internas (fósforo suplido por el zooplancton y aporte de fósforo por el hielo). Estos autores determinaron que las diferencias interanuales en la biomasa del fitoplancton estaban asociadas a la temperatura y al contenido de fósforo disuelto; se pudo demostrar que existía una relación positiva entre la excreción de fósforo por el zooplancton y la biomasa del fitoplancton. Intra anualmente, las variaciones en el zooplancton fueron más pronunciadas que interanualmente, tendiendo a ser menor el ratio N:P de zooplancton después del deshielo (cuando la comunidad de zooplancton estaba dominada por el copépodo nauplii), y mayor a mitad y final del verano, dominada por otras especies. Según la composición de zooplancton, estos autores explican los cambios en la composición del fitoplancton.

Igualmente, se han estudiado los efectos de los aerosoles en las lagunas de Sierra Nevada. Las investigaciones realizadas apoyaron la idea de que las lagunas se ven influenciadas por el flujo de aerosoles procedentes del Sahara. En 1999, Morales-Baquero *et al.* demostraron que existía una baja proporción de nitrógeno inorgánico disuelto respecto de la de fósforo reactivo soluble (relación DIN/SRP) en las lagunas con menores cuencas de captación, pero que esta proporción aumenta progresivamente en las lagunas según se incrementa el tamaño de sus cuencas. Esto sugiere que las entradas directas de nutrientes a las lagunas por precipitación atmosférica, es más importante en las lagunas con cuencas de captación más pequeñas, (aportan proporcionalmente más fósforo que las entradas por escorrentía), por lo que incrementan su importancia relativa al aumentar el tamaño de las cuencas de captación (Morales-Baquero *et al.*, 2000).

Otro estudio realizado, centra su importancia en la variación del bacterioplancton: abundancia de bacterioplancton, (AB), producción de bacterioplancton (PB) y sus mecanismos potenciales de control (PT fósforo total; COD carbono orgánico disuelto; FeD hierro disuelto) en lagunas de alta montaña (entre ellas *La Caldera*). La variabilidad se estudió dentro de una misma laguna (considerada escala local) y en un conjunto de lagunas (considerada escala regional). A escala regional, tanto los descriptores del bacterioplancton como sus potenciales mecanismos de control, mostraron mayor variabilidad que a escala local. A escala regional, la PB se relacionó con la concentración de fósforo total; esta dependencia no se observó con la AB ni a escala local, excepto para la concentración de hierro disuelto. Los resultados indicaron que en las lagunas de Sierra Nevada, los dos descriptores del bacterioplancton tuvieron un comportamiento diferente y que el cambio de escala implicó diferentes patrones de variación (Pulido-Villena *et al.*, 2003).

Posteriormente, se estudió la estructura de la red trófica en la laguna de *La Caldera*. La cadena alimenticia de los microorganismos heterotróficos estaba débilmente desarrollada dentro de la red trófica dominada por copépodos y fitoplancton.

Las bacterias constituían una minoría en la comunidad de plancton, en términos de abundancia, biomasa y producción, en contraste con lo que ocurre normalmente en sistemas oligotróficos. Medina-Sánchez *et al.*, en 2004 midieron los factores bióticos y abióticos que regulan la producción y la biomasa de bacterioplancton, resultando ser las algas, el principal factor regulador del bacterioplancton debido a dos motivos: por un lado, el Comensalismo, definido como la dependencia de las bacterias respecto al carbono fotosintético liberado por las algas y por otro lado, debido al control predatorio, es decir, las bacterias actúan como alimento para mixótrofos. Concluyen diciendo que el metabolismo mixotrófico de las algas constituyen una estrategia adaptativa para superar el estrés de la alta incidencia ultravioleta de la zona, utilizando las bacterias como fuente de carbono y energía en condiciones de inhibición fotosintética y carencia en nutrientes minerales.

Los primeros datos sobre el inventario y caracterización morfométrica de las lagunas glaciares del Parque Nacional de Sierra Nevada, fueron aportados por Castillo Martín *et al.*, en 2005. Con el objeto de suplir la carencia de información sobre las lagunas, facilitaron los datos de morfometría de las 40 lagunas consideradas permanentes de Sierra Nevada, dejando de esta manera definidas todas las características principales de las mismas.

En otro artículo publicado (García Jurado *et al.*, 2007), se discute la importancia y necesidad de realizar estudios transdisciplinarios en lo referente al plancton, en las lagunas de Sierra Nevada, argumentando que para una correcta valoración de los procesos ecológicos que tienen lugar en ellas, es necesario abarcar su estudio desde los conocimientos y estudios de las diferentes disciplinas.

Recientemente se han estudiado los efectos de la radiación ultravioleta y los aportes atmosféricos de fósforo a la comunidad de algas, en una laguna de Sierra Nevada. La presencia de fósforo invertía el efecto positivo de la radiación UV en la tasa de crecimiento de los no flagelados, debido a un incremento en el efecto dañino de la radiación ultravioleta en la clorofila. Todo ello demostró que la comunidad de algas estaba aclimatada al flujo de radiación UV, pero no al alto contenido de fósforo (Delgado Molina *et al.*, 2009).

Las últimas investigaciones llevadas a cabo en lagunas de Sierra Nevada (Mladenov *et al.*, 2011) demuestran que existe una correlación entre la materia orgánica disuelta de las lagunas alpinas estudiadas y la abundancia bacteriana. Se han realizado estudios tales como: monitorización de ozono, índice de aerosoles procedente de polvo atmosférico, niveles de radiación ultravioleta, porcentaje de cobertura vegetal, tiempo de permanencia del agua en las lagunas, concentración de clorofila, así como evaluación de factores meteorológicos tales como precipitación media anual. De los estudios realizados se concluye que existen tendencias latitudinales significativas. Por otro lado, estos autores comentan que existe una correlación entre la abundancia bacteriana y la cantidad de materia orgánica disuelta; y afirman que el tiempo de residencia del agua en las lagunas era directamente proporcional a la abundancia bacteriana.

3. Microalgas presentes en ambientes psicrófilos

En los últimos años numerosos biólogos han recolectado una gran variedad de fitoplancton procedente de los océanos polares Ártico y Antártico (Fukase, 1962; Hasle, 1969; Fukuchi, 1980; Gosselin *et al.*, 1990; Furio *et al.*, 2012; Hodac *et al.*, 2012; Tronholm *et al.*, 2012; Hancke *et al.*, 2015; Pedrós-Alió *et al.*, 2015; Kosek *et al.*, 2016), siendo la temperatura uno de los factores físicos más relevantes que afecta a la distribución geográfica de algunas microalgas (Soeder and Stengel, 1974; Yanagita, 1990; Vonnahme *et al.*, 2015; Kubiszyn *et al.*, 2015; Heesch *et al.*, 2016).

En la Antártida se ha descrito un grupo de microalgas diatomeas bentónicas, capaces de vivir a grandes profundidades pegadas a las piedras o sedimentos; se ha podido observar que estas microalgas pueden realizar la fotosíntesis con niveles de luz muy bajos e incluso cubiertas por una capa de hielo marino (Uribe, 2009; Rocca *et al.*, 2015; Deregibus *et al.*, 2016).

Las microalgas presentan una gran capacidad para adaptarse a diferentes condiciones medioambientales (Cota *et al.*, 1991; Combe *et al.*, 2015) por lo que es común encontrarlas en todo tipo de ambientes. En ambientes psicrófilos, si bien no existe una extensa bibliografía sobre microalgas, diversos autores tales como Cota (1985), Fiala and Oriol (1990), Lizotte and Priscu (1992), Devos *et al.* (1998), Mock and Hock (2005), Ralph *et al.* (2005), Combe *et al.* (2015), Varshney *et al.* (2015) reconocieron la necesidad de conocer a fondo estos metabolismos adaptados zonas polares y de alta montaña.

Una de las microalgas más conocidas y estudiadas es *Chlamydomonas raudensis* UWO241 (Pocock *et al.*, 2004; Szyszka-Mroz *et al.*, 2015) aislada del lago Bonney ubicada en las montañas transantárticas. Este lago permanece al menos seis meses al año en oscuridad y con una gruesa capa de hielo de hasta cuatro metros (Morgan-Kiss *et al.*, 2008; Takizawa, *et al.*, 2009). De esta microalga, se han publicado numerosos artículos relacionados con su metabolismo, como por ejemplo la respuesta a la temperatura de su sistema fotosintético, llegando a concluir que esta especie y otras subespecies son capaces de sobrevivir incluso a temperaturas de 29°C sin verse modificada de forma drástica la capacidad fotosintética. (Pocock *et al.*, 2005; Gudynaite-Savitch *et al.*, 2006; Pocock *et al.*, 2007; Eddie *et al.*, 2008; Dietzel *et al.*, 2008; Takizawa *et al.*, 2009; Sing-Yi Hou *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha estudiado el efecto de la salinidad sobre

esta microalga, demostrándose que existe una distribución de energía desde el fotosistema-I al fotosistema-II bajo diversas condiciones de salinidad, y comprobándose que esta microalga y sus variantes son halotolerantes y no halófilas como se pensaba. (Morgan-Kiss *et al.*, 2005; 2008; Pockock *et al.*, 2007; 2011).

Actualmente, se ha investigado la diferencia bioquímica existente entre especies de microalgas psicrófilas bajo distintas condiciones de luminosidad y disponibilidad de nutrientes, con objeto de evaluar diferentes hipótesis sobre la capacidad de crecimiento y proliferación bajo las distintas condiciones que pueden llegar a encontrar a lo largo de todo el año en las matrices acuáticas. Así, en el Ártico se ha demostrado que existe un incremento de clorofilas A y C, y de ATP y glúcidos a medida que aumenta la temperatura, no siendo la razón el aumento de agua por deshielos (Gosselin *et al.*, 2004).

Por otro lado, también se ha demostrado que existe una competencia entre diferentes especies a medida que cambian las condiciones ambientales estacionales; se ha podido constatar que durante la entrada del verano o del invierno predominan ciertas especies con mayor capacidad de adaptación que otras.

Nogueira, en el año 2000, describió la dinámica de algunas especies existentes en el río Paranapanema (SanPablo). Este autor demostró que en la época de verano y otoño predominan *Microcystis aeruginosa* y *Anabaena* sp. respectivamente, mientras que en invierno las especies predominantes son *Anabaena circinalis* y *Anabaena spiroides*, atribuyendo estas dinámicas al aporte de nutrientes debido al aumento de caudal del río por los deshielos de las zonas más altas que vienen sucediéndose en los últimos años.

Por otro lado, Lazzara *et al.* en 2007 describieron las distintas especies dominantes en la Bahía de Terra Nova en una misma época del año y en función de la profundidad del hielo existente. Estos autores pudieron demostrar que en las capas más profundas predominaban especies tales como *Berkeleya rutilans*, *Entomoneis* sp., *Nitschia stellata*, *Pleurosigma* sp., mientras que en las capas más superficiales habitaba *Prymnesiophyta* así como algunas especies de diflagelados.

Sullivan *et al.* (2002) estudiaron la interacción entre diatomeas, cianobacterias y algas verdes en salinas, demostrando que las cianobacterias sólo eran abundantes cuando existían altos niveles de luz y que las más abundantes eran las diatomeas.

4.2.- Microalgas en ambientes psicrófilos de Sierra Nevada



Los microorganismos que habitan este tipo de ambientes presentan una gran sensibilidad a cualquier cambio de los factores ambientales provocando alteraciones importantes en las respuestas funcionales de las comunidades psicrófilas que los habitan.

(Figura 6)

Figura 6: Observación y recogida de microalgas de neveros próximos a la Laguna de la Caldera (Sierra Nevada).

De acuerdo con esta idea, es posible utilizar estas respuestas a los cambios, como bioindicadores de tales perturbaciones en las redes tróficas presentes en un sistemas bióticos como lo puede ser lagunas de alta montaña; ejemplo de ello son las lagunas oligotróficas tales como la laguna de *La Caldera* (Sierra Nevada) (García-Jurado *et al.*, 2007). Estos autores han podido identificar grandes variaciones de la comunidad planctónica especialmente de acuerdo al tamaño celular, atribuyendo este cambio a un incremento de energía externa al sistema biótico, como por ejemplo el aumento en la concentración de fósforo. Por el contrario, la desaparición de estas estructuras y la proliferación de organismos de pequeño tamaño manifiesta un estado de disipación energética (Echevarría *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 1990; Cruz-Pizarro y Carrillo, 1996).

Las comunidades planctónicas de las lagunas oligotróficas de alta montaña están conformadas por grupos heterogéneos de organismos, con gran diversidad de formas y de grupos funcionales que abarcan un amplio rango de tamaños (García-Jurado *et al.*, 2007; Thaler *et al.*, 2009).

En las lagunas de Sierra Nevada, la mayoría de los estudios realizados sobre microalgas en los ecosistemas acuáticos han tenido, sobre todo, un enfoque ecológico, considerando a las microalgas como productores primarios en su conjunto (Fanés *et al.*, 2009), sin embargo, hasta la fecha no existen estudios genéticos de la biodiversidad de microorganismos fotosintéticos en las lagunas de Sierra Nevada.

Se han descrito numerosas microalgas en las matrices acuáticas del Parque Natural de Sierra Nevada (**Tabla 7**). Así, en la laguna de *La Caldera* se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la diversidad microalgal, entre ellos los realizados por Martínez-Silvestre en 1977 identificando especies tales como *Scenedesmus ecornis* y *Tetraedron minimu*; esta última especie también ha sido estudiada por Sánchez-Castillo en 1986, identificando, además otras especies de microalgas tales como *Oocystis lacustris* y *Scotiella tuberculata* (Sánchez Castillo, 1986), *Desmodesmus armatus* (Sánchez Castillo, 1988), *Desmodesmus abundans*, *Oscillatoria planctónica*, *Nitzschia hantzschiana* y *Scenedesmus quadrispina* (Sánchez Castillo *et al.*, 1989).

Tabla 7: Microalgas identificadas en distintas matrices acuáticas del Parque Natural Sierra Nevada.

Especie	Procedencia	Referencia
<i>Chrysophyta</i> sp.		
<i>Scenedesmus ecornis</i>	Laguna de <i>La Caldera</i>	Martínez, R, 1977
<i>Tetraedron minimu</i>		
<i>Cocconeis placentula</i>	Río Lanjaron	Sánchez Castillo, 1984
<i>Cymbella ventricosa</i>	Río Trevez y Río Monachil	
<i>Hydrurua foetidus</i>	Río Monachil	
<i>Chromulina nevadensis</i>	<i>Virgen superior; Virgen Media y Aguas verdes</i>	
<i>Oscillatoria planctonica</i>	Laguna de <i>Las Yeguas</i> ; Río seco superior; Río seco; Río seco inferior y Laguna de <i>La Caldera</i>	
<i>Nostoc Kihlmani</i>	Laguna de: <i>Las Yeguas; Virgen Superior; Virgen Media; Aguas verdes; Río seco superior; Río seco; Río seco inferior</i>	Sánchez-Castillo <i>et al.</i> , 1989
<i>Synechococcus maior</i>	Laguna de: <i>Virgen superior; Virgen media; Río seco, Río seco superior; Gemela y Majano</i>	
<i>Gyanarcus</i> sp.	Laguna de <i>La Caldera</i>	Carrillo <i>et al.</i> , 1991
<i>Chromulina nevadensis</i>	Laguna de <i>La Caldera</i>	
<i>Daphnia pulicaria</i>	Laguna de <i>Las Yeguas</i>	Cruz-Pizarro <i>et al.</i> , 1994
<i>Chlamydomonas</i> sp.	Pico del Veleta (nieve)	Duval <i>et al.</i> , 1999
<i>Pediastrum boryanum</i>	Laguna de <i>Las Yeguas; Virgen Superior; Virgen Media; Aguas Verdes; Gemela y Majano.</i>	Fanés Treviño <i>et al.</i> , 2009
<i>Zygnemopsis decussata</i>	Laguna de <i>La Caldera</i>	Figueroa <i>et al.</i> , 2009
<i>Fragilaria rumpens</i>	Laguna de <i>La Caldera</i>	
<i>Nitzschia sublinearis</i>	Laguna de <i>La Caldera</i>	Sánchez-Castillo <i>et al.</i> , 2008
<i>Hantzschia amphioxys</i>	Laguna de <i>La Caldera</i>	

4.1.- Cultivo de microalgas

Como todo ser vivo, las microalgas requieren de ciertas condiciones especiales para poder multiplicarse y desarrollarse, existiendo factores que influyen de forma directa sobre la calidad y cantidad de la biomasa generada. Al ser organismos fotosintéticos, la cantidad de luz irradiada a las células debe estar controlada, pudiendo operarse en régimen de luz continua o con ciclos luz/oscuridad. Esta última forma, más próxima a las condiciones reales de día/noche, facilita posteriormente el aumento de productividad a escala de biorreactores (Evens *et al.*, 2007).

Condiciones de pH

Las microalgas crecen en un intervalo reducido de pH cuando se cultivan en biorreactores, y tienen un pH óptimo donde la velocidad de crecimiento alcanza un valor máximo. Este óptimo puede ser muy diverso para diferentes microalgas, así para especies del género *Chlorella* varía entre 6 y 7, para *Scenedesmus* oscila entre 6 y 8, y para diferentes especies del género *Spirulina* puede estar comprendido entre 8 y 10 (Soeder *et al.*, 1988). En general, el intervalo de pH en que las microalgas pueden crecer en biorreactores es más amplio para especies de agua dulce que para microalgas marinas (Hartig, *et al.*, 1990; Hendriks *et al.*, 2015; Wall *et al.*, 2015).

Celekli *et al.* (2008) realizaron estudios sobre el valor de pH máximo tolerable para diferentes especies, siendo para *Phaeodactylum tricornutum* y *Dunaliella tertiolecta*, de 10,3 y 9,4 respectivamente, y para *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris* de 10,6. Además, es de destacar que cuando el pH externo es diferente al pH celular interno, la célula genera un mecanismo de regulación derivando en un cierto nivel de estrés. (Lopez-Rodas *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015; Bunse *et al.*, 2016).

Efecto de la Temperatura

Cada reacción química individual, de todas las que conforman el metabolismo, se ve afectada por la temperatura, lo que conlleva que diferentes reacciones celulares se traduzcan en modificaciones en la velocidad de crecimiento, es decir, a medida que la temperatura aumenta también lo hace la velocidad del crecimiento microalgal hasta alcanzar un valor óptimo, por encima del cual un aumento de temperatura provoca una disminución de ella, por lo que al representar el efecto de la temperatura frente al crecimiento se obtiene una curva asimétrica típica.

La principal razón de este fenómeno se debe al efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas, pues a medida que la temperatura aumenta se incrementa la energía cinética de las moléculas aumentando la velocidad de las reacciones; sin embargo, si aumenta la temperatura en demasía, se alteran los procesos fisiológicos al producirse una desnaturalización de las enzimas y desorganización de algunas estructuras celulares. Esto no sucede a bajas temperaturas donde son las reacciones fisiológicas no se ven afectadas. (Fernández y Johnston, 2006).

La temperatura óptima de crecimiento es consecuencia de dos efectos: por un lado, depende de la propia idiosincrasia celular y por otro lado depende de la intensidad de irradiación óptima para el crecimiento. Es de destacar que la mayor parte de las microalgas de agua dulce son organismos mesófilos; tal es el caso de *Haematococcus pluvialis* cuyo máximo crecimiento se obtiene a 27°C y 260 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (Evens *et al.*, 2007).

| 60

Nutrientes

Las microalgas en su mayoría presentan requerimientos físicos-químicos tales como luz, temperatura (entre 15-20°C), salinidad baja (0,37%) y un pH comprendido entre 7 y 9. Además, presentan requerimientos de carbono en forma de CO_2 , nitrógeno en forma de nitratos o compuestos nitrogenados reducidos (sales de amonio), fósforo en forma de fosfatos, y azufre en forma de sulfatos, Na, K, Ca y Mg, y micronutrientes tales como: Fe, Zn, Mn, B, Br, Si, Cu, Co, Cl, Al, I, Sr, Rb. Igualmente, requieren vitaminas tales como B_{12} , Tiamina y Biotina. En los cultivos de microalgas, en general, se estudian los requerimientos particulares para cada especie de acuerdo a los objetivos que se persigan (Kinne, 1979; Chiu *et al.*, 2015; Hadley *et al.*, 2015).

Voltolina *et al.*, en 2004, analizaron la influencia de los ciclos de luz / oscuridad en la producción de biomasa en cultivos semicontinuos. Estos autores demostraron que aunque los periodos de oscuridad no afectan de forma significativa a la producción de biomasa, sí afectan a la eliminación de nutrientes, es decir, que durante los periodos de oscuridad, donde existe excreción de nitrato y de amonio al medio, la velocidad de eliminación para el caso del amonio era menor, siendo casi nula durante las primeras 24 horas de cultivo.

4.2.- Formulación de los medios de cultivo

Los medios artificiales se usan principalmente para fines experimentales, obteniéndose resultados constantes, aunque existen algunas especies que no crecen en medios artificiales debido a factores desconocidos que afectan a su crecimiento, las principales fórmulas utilizadas van desde el *Agua de Miguel*, que data de 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el *medio de End-Schreiber* de 1934, así como fórmulas específicas para el cultivo de diatomeas (Provasoli *et al.*, 1975). (**Tabla 8**).

Tabla 8: Algunos medios de cultivo descritos para microalgas.

Medio de cultivo	Descrito para	Referencia
Agua de Miguel	Microalgas oligotróficos y eutróficas	Allen-Nelson, 1910
Fert I y Fert II	Microalgas de matriz dulce acuícolas	Lim, 1991 y Sato, 1991
Descrito por el Laboratorio Haskins, NY	Diatomeas	Provasoli <i>et al.</i> , 1975
HAMGM	<i>Chlorella vulgaris</i>	Hadj-Romdhane <i>et al.</i> , 2012
CHU 10	Microalgas oligotróficos y eutróficas	Lincymol <i>et al.</i> , 2012
YASHIMA	Cloroficeas marinas	Sisffaa, 1964
MET 44	Bacilarioficeas	Schone & Schone, 1982
Rodríguez-López	Microalgas de matriz dulce acuícola	Rodríguez-López, 1964
Guillard	Microalgas de matriz dulce acuícola	Ryther <i>and</i> Guillard, 1959

Las formulaciones de medios de cultivo actuales, no siempre son adecuadas para la mayoría de las especies, y la elección depende de numerosos factores por lo que, en la mayoría de los casos, se hace necesario realizar múltiples ensayos para una especie determinada.

Los medios de cultivo se diseñan probando sucesivas modificaciones, generalmente basadas en consideraciones teóricas. El perfeccionamiento del diseño nutricional de los medios, para el cultivo en laboratorio de microalgas ha sido objeto de numerosas investigaciones en las últimas décadas, dando lugar a un amplio abanico de formulaciones disponibles en la literatura (Harrison *et al.*, 1980; Keller *et al.*, 1987; Fábregas *et al.*, 2000; Berges *et al.*, 2001; Barsanti *and* Gualtieri, 2005; incluso medios exclusivos para especies como *Chlorella vulgaris* descrito por Hadj-Romdhane *et al.*, 2012).

Las formulaciones de medios de cultivo más empleadas hoy en día en acuicultura son: f/2 (Guillard *and* Ryther, 1962), Walne (1970), no obstante, existen otros medios que incluyen en su composición sustancias orgánicas (vitaminas, aminoácidos) necesarios para especies de microalgas auxótrofas, es decir que no sintetizan por medio de la fotosíntesis este tipo de compuestos y cuya ausencia puede ser causa de limitación su crecimiento como ocurre con especies de los géneros *Platimonas* y *Chrysophytas*, o especies de la familia *Bacillariophyceas*. Además se ha podido constatar que la simbiosis con bacterias por ejemplo con *Microbacterium* sp. puede mejorar el crecimiento de especies de microalgas tales como *Chlorella* (Watanabe *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015; Ahamed *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

4.3.- Técnicas de cultivo

Las microalgas pueden ser cultivadas de acuerdo a distintos métodos: bajo estrictas condiciones de laboratorio y también en tanques de cultivo masivo al aire libre. El cultivo en laboratorio permite controlar parámetros como la iluminación, concentración de nutrientes, competencia y control de depredadores, microalgas competitivas y la temperatura; por otro lado, en los sistemas de tanques al aire libre son mucho menos costosos y facilitan los cultivos masivos. La consideración de factores tales como la luz, la razón CO_2/O_2 , la temperatura, los nutrientes, la salinidad, el pH, entre otros, resulta trascendental para el diseño de sistemas cerrados (Hernández *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2015; Cobos-Vasconcelos *et al.*, 2015; Pickard *et al.*, 2015; Kamarudin *et al.*, 2015). (Figura 7).

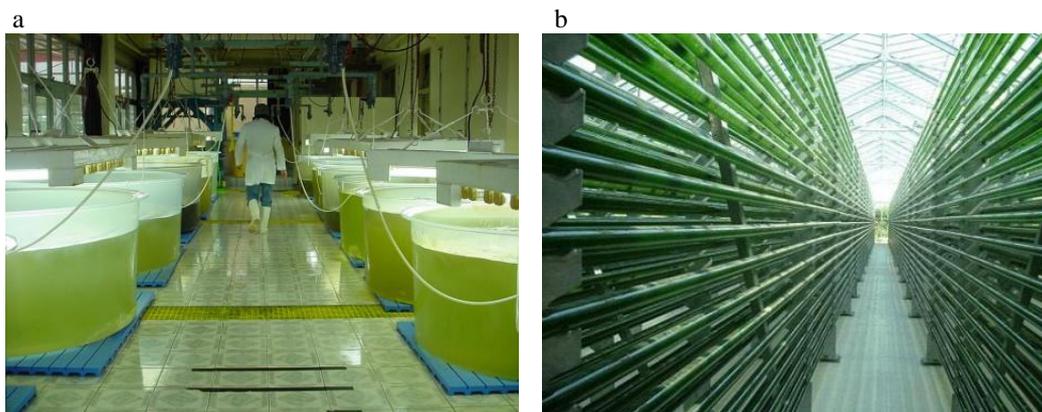


Figura 7: a: Laboratorio de Microalgas de la Facultad de Ciencias Naturales de la sede Trelew de la Universidad Nacional de la Patagonia; b: Cultivos de masificación y producción de biodiesel de la Universidad de Almería.

Otra alternativa podrían ser los cultivos axénicos, no obstante presentan la limitación de ser bastante costosos y de difícil mantenimiento a lo largo del tiempo, todo ello les confiere poca aplicabilidad industrial, debido a que se requiere una esterilización completa y estricta de todos los materiales necesarios para llevar a cabo el ensayo. Estas limitaciones hacen que sean poco viables. Por otro lado, los cultivos no axénicos surgen como una opción más económica, aunque los parámetros físico-químicos y nutricionales así como las propiedades del cultivo son más difíciles de controlar. De los diferentes tipos de cultivos de microalgas utilizados a nivel industrial, los más comunes son el batch, continuo, semi-continuo (Wernicke *et al.*, 2007; Padmanabhan *et al.*, 2012; Henrard *et al.*, 2015; Fuentes-Grünwald *et al.*, 2015; Zevin *et al.*, 2015; Mortezaeikia *et al.*, 2016).

4.3.1.- Cultivo discontinuo o "Batch"

Los sistemas de cultivo más comunes son los cultivos discontinuos o "Batch"; estos sistemas presentan la ventaja de la facilidad de manejo y su bajo costo. (Dunstan *et al.*, 1993). Son sistemas cerrados masivos, de volumen concreto, y factores de cultivo finitos, es decir, sin entrada o salida de ningún tipo de nutrientes. (Voltolina *et al.*, 2004).

| 63

En estos casos el crecimiento es exponencial y la productividad varía únicamente con el agotamiento de factores limitantes en el tiempo tales como nutrientes en el medio de cultivo, factores externos como la luminosidad, o hasta que algún tipo de metabolito se acumule en las células produciendo un efecto tóxico. Tras la fase exponencial, los cultivos derivan en fase estacionaria donde las propiedades celulares tales como el tamaño, composición y concentración de compuestos nutricionales intracelulares varían notablemente. (Ramirez, 2010). En estos sistemas, los cultivos llevados a cabo con microalgas se ajustan por lo general a funciones logarítmicas de diferentes órdenes (Schanz *and* Zahler, 1981). A este tipo de cultivos no se le adiciona ningún sustrato, ni tampoco se retira volumen de cultivo, aunque si puede ser necesario la incorporación de gases tales como CO₂.

James *et al.* (2012) utilizaron estos sistemas para el cultivo masivo de microalgas en tratamientos y depuración de aguas, comprobando el efecto de la intensidad de iluminación sobre la producción de ácidos grasos en *Chlorella* sp. en diferentes ensayos realizados en reactores tubulares.

4.3.2.- Cultivo continuo

Generalmente, este tipo de cultivos se utilizan para microorganismos, donde los nutrientes son adicionados constantemente y en forma regulada, con objeto de mantener constante un punto concreto en la curva de crecimiento en los biorreactores (Pelczar *et al.*, 1986). En la práctica, se adiciona constantemente, y a una velocidad proporcional a la tasa de crecimiento celular, un volumen de medio de cultivo fresco, a la vez que se retira un volumen proporcional de cultivo. Este método de cultivo microalgal permite el mantenimiento de cultivos próximos a la tasa de crecimiento máximo. (Drake *et al.*, 2002).

Existen dos variantes principales en los sistemas de cultivo continuo: quimiostatos y turbidostatos (Fogg *and* Thake, 1987). Los *quimiostatos* se caracterizan porque los nutrientes son adicionados al cultivo de forma constante. Se controla directamente la concentración de nutrientes, estando directamente relacionado con la densidad de celular del cultivo. Por otro lado, en los *turbidostatos* la densidad de la población está controlada por un fotosensor de manera que se mantiene un nivel preestablecido de población microalgal (Tempest, 1978). Además, en este tipo de cultivo se puede modificar la composición bioquímica de las microalgas en función de la concentración de nutrientes y de la salinidad (Fábregas *et al.*, 1987; Fabregas *et al.*, 1989).

4.3.3.- Cultivo Semi-continuo

En los cultivos de régimen semi-continuo se retiran cantidades de cultivo a intervalos de tiempo establecidos para los ensayos, generando tasas de renovación celular controladas. Este procedimiento se realiza tantas veces como sea necesario de acuerdo a los objetivos planteados en los ensayos. Con esta técnica se potencian tasas de división celular con objeto de alcanzar niveles altos. Por lo tanto, a pesar de que la producción es continua, la concentración de substrato y microorganismos no es constante a lo largo del tiempo.

El sistema semicontinuo es una opción y una alternativa a los sistemas continuos estando especialmente indicado para el caso de microalgas sometidas a periodos circadianos de luz y oscuridad, debido a que la alta tasa de división celular que se produce en estas condiciones no hace recomendable el cultivo continuo (Ferreira, 2011).

En el caso de hacerse coincidir los ciclos de renovación celular con los ciclos circadianos, la biomasa obtenida presenta características de homogeneidad y estabilidad que difiere de la de los cultivos continuos (Ruiz-Marín *et al.*, 2010). Se utiliza el término *ciclostato* para describir este tipo de cultivos sometidos a ciclos de luz / oscuridad, y poder diferenciarlos de los *quimiostatos* estándar (Chisholm *et al.*, 1975)

Los reactores discontinuos son los más versátiles y utilizados a escala de laboratorio, presentando la dificultad añadida de su funcionamiento en estado no estacionario. El funcionamiento de un reactor para cultivos discontinuos implica la adición constante de medio de cultivo, esterilización simultánea o sucesiva, acondicionamiento de las variables de

cultivo a los valores prefijados de acuerdo a los objetivos planteados en cada ensayo, inoculación y evolución del sistema.

En cultivos discontinuos aunque la intensidad de iluminación incidente permanezca constante, dadas las sombras generadas de unas células a otras a altas densidades poblacionales, pueden presentarse periodos de inhibición o de limitación de crecimiento debido a falta o exceso de luz. (Voltolina *et al.*, 2008). Para cultivos a gran escala los recipientes de plástico, estanques de hormigón o de madera son los más recomendables, incluyendo los estanques rústicos en áreas rurales (Bianchini *et al.*, 2008; Pickard *et al.*, 2015; Gangl *et al.*, 2015; Hoh *et al.*, 2016).

La elección de un sistema de cultivo, dependerá en todo momento de la microalga utilizada y de los objetivos que se persigan en los ensayos (Pérsico *et al.*, 2011), siendo los semi-continuos los más utilizados. Ruiz-Marín *et al.*, en 2010, compararon la capacidad de crecimiento de dos microalgas inmovilizadas y no inmovilizadas, *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*, en modo de cultivo Batch y semi-continuo, con objeto de evaluarlas mejores condiciones para eliminar nitrógeno y fósforo.

Diversos autores (Chevalier *et al.*, 1985; Mallick, 2002) pudieron demostrar que *Scenedesmus obliquus* inmovilizada y en modo de cultivo semi-continuo presentaba la mejor tasa de eliminación de nitrógeno y fósforo, estos resultados eran acordes con las investigaciones realizadas por Chih-Hung Hsieh *et al.* (2009), quienes además de obtener resultados similares, compararon la producción de lípidos, detectando que los niveles aumentaban en sistemas de cultivo semi-continuos de 0,124 g d⁻¹ L⁻¹ a 0,139 g d⁻¹ L⁻¹) en relación a los resultados obtenidos en cultivos Batch.

5.- Identificación de microorganismos fotosintéticos

5.1. Extracción de ADN como herramienta de identificación

| 66

La secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S ha sustituido en la actualidad a la secuenciación de catálogos de oligonucleótidos. Cuando se pretende amplificar el ARNr 16S prácticamente completo, se utilizan iniciadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, que originan amplicones de 1.500 pb, aproximadamente. Se ha demostrado, sin embargo, que una identificación precisa no siempre requiere la amplificación, y posterior secuenciación, del ARNr 16S completo. En estas circunstancias se utilizan oligonucleótidos que permitan la amplificación de fragmentos de menor tamaño, preferentemente las 500 pb correspondientes al extremo 5' del gen denominado V3 (Rodicio *et al.*, 2004; Fujimoto *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2015; Pushkareva *et al.*, 2015; Lawes *et al.*, 2016).

La secuenciación del rRNA es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas altas. Debido a que la molécula de rRNA 16S contiene regiones altamente variables, es usualmente posible encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias (Cercenado *et al.*, 2010).

Los análisis filogenéticos han favorecido los estudios de las relaciones evolutivas entre los organismos (Woese, 1987), de tal modo que en los últimos 20 años ha aumentado considerablemente el número de especies descritas en diferentes ambientes debido al uso y mejora de las técnicas moleculares. La comparación de los genes RNA ribosómicos realizada por Woese and Fox en 1977 dieron lugar a estudios que derivaron en un nuevo modelo filogenético en los años 1990, cambiando el concepto taxonómico y clasificando a los seres vivos en tres dominios, *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*.

Actualmente, las oportunidades para el descubrimiento de nuevos organismos y el desarrollo de los recursos basados en la diversidad microbiana son mayores. Las secuencias moleculares finalmente han generado un camino para definir distintos campos de estudio, mediante la filogenia molecular. Las secuencias también son las bases de las herramientas que permitirán explorar la distribución y el papel de los organismos en el ambiente y red trófica. Los métodos moleculares pueden ser usados para obtener esencialmente cualquier gen directamente

del medio ambiente sin cultivar el organismo en cuestión. (Amann *et al.*, 1995; Schleper, *et al.*, 1998; Segawa *et al.*, 2005; Lazarus *et al.*, 2015).

La extracción de ADN de procariontes, por lo general, se realiza mediante técnicas estandarizadas basadas principalmente en la ruptura de la pared celular bacteriana y la extracción del ADN que se encuentra libre en el citoplasma reunido en los nucleoides (Ausubel *et al.*, 1989; Gutiérrez *et al.*, 2008). Cuando se habla de microalgas, se habla de células fotosintéticas tanto procariontes como eucariontes (Cubas, 2008; Gómez, 2007), en el caso de los procariontes el ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas.

En los eucariontes existen unas proteínas nucleares de carácter básico llamadas histonas que permiten la conformación terciaria superenrollada del DNA (Urtasun *et al.*, 2005). El aislamiento de ácidos nucleicos de plantas y de macro y microalgas difiere de las técnicas utilizadas habitualmente para tejidos de origen animal; tanto las plantas como las macro y microalgas tienen paredes celulares compuestas principalmente de celulosa o de algún otro polisacárido complejo (Nishiguchi *et al.*, 2002; Doyle and Doyle, 1987).

Si bien existen métodos publicados para extracción de ADN de las algas verdes (Meusnier *et al.*, 2004), las algas rojas (Hong *et al.*, 1997, Waittier *et al.*, 2000) y las algas pardas (Phillips *et al.*, 2001), la mayoría requieren maceración de tejidos en nitrógeno líquido con el fin de romper paredes y estructuras membranosas, por lo que no existe un método estandar de ruptura de tejidos, sino que depende directamente de la naturaleza de la célula en particular.

Numerosos autores han establecido diferentes protocolos, la mayoría basados en el publicado por Doyle and Doyle en 1990, quienes proponen la utilización de bromuro cetiltrimetilamonio (CTAB) en solución salina, con EDTA y Tris-HCl. Este método se ha utilizado en el caso de algunas microalgas de reducido tamaño y rigidez de membrana que presentan dificultades en el momento de lisarlas. (Fawley *et al.*, 2004).

En 1995 Friedl, desarrolló una técnica efectiva para la extracción de ADN de microalgas, basado en una extracción inicial con bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB) y una ruptura mecánica de las células, seguido de una extracción con cloroformo y una precipitación con CTAB

en solución salina. Esta técnica, si bien resulta ser fácil y efectiva, presenta el inconveniente de la contaminación posterior debido a la presencia de polisacáridos y compuestos fenólicos no deseados en el lisado.

| 68

Con objeto de poder solucionar este inconveniente, Yang *et al.*, en 2008 publicaron una modificación de este método, donde incluían la utilización de β -mercaptoetanol para evitar reacciones de oxidación, y la utilización de polyvinylpolypyrrolidona (PVPP) para la eliminación de compuestos fenólicos, logrando de este modo un ADN más limpio y libre de contaminantes; no obstante, igualmente hay que tener en cuenta que con este método la eficiencia de la extracción será diferente para cada especie.

5.2. Identificación genética de microalgas

El análisis de rRNA es de gran valor para el estudio de eucariotes de diversos ambientes (Amaral Zettler *et al.*, 2002; López-García *et al.*, 2001, López-García *et al.*, 2003; Stoeck *et al.*, 2003; Willerslev *et al.*, 1999). El estudio de genes rRNA amplificados directamente de muestras ambientales ha demostrado que existe un gran número de linajes, siendo necesaria la reubicación de múltiples especies descritas con anterioridad, así como la descripción de nuevos reinos (Dawson & Pace, 2002; Cavalier-Smith, 2004; Marande *et al.*, 2009). Sin embargo, muchos de estos nuevos grupos descubiertos son conocidos únicamente por sus características moleculares, no teniéndose información acerca de su abundancia, distribución o *rol in situ*, o de sus características fisiológicas (Stoeck *et al.*, 2005).

En los eucariontes fotosintéticos el ARN se encuentra localizado en partículas de tamaño 80S, en las subunidades 5.8S, 18S y 28S; estando ubicados en uno o varios operones; así, el gen 18S ubicado en una subunidad pequeña del ribosoma, contiene información filogenética con una variabilidad suficiente para poder distinguir entre diferentes taxones.

Diez *et al.*, 2001, realizó un estudio de la diversidad de un sistema marino, mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos EukAy EukB (**Tabla 9**); estos oligonucleótidos ya fueron utilizados por Medlin en 1988 para amplificar el gen codificante rDNA 18S, de aproximadamente 1.800 pb; este autor también utilizó la técnica fingerprinting DGGE (*Denaturing gradient Gel Electrophoresis*) para la comparación de perfiles de microorganismos en matrices acuáticas marinas, identificando gran parte de éstos. La técnica de DGGE, permite la separación de

fragmentos de ADN de idéntica longitud pero de distinta secuencia. Es de destacar que Muyzer, en 1999, ya había mencionado la importancia y las aplicaciones ecológicas de las técnicas de TGGE/DGGE, siendo Ward *et al.* (1998) los primeros autores en describir la dinámica de especies en función de la época del año utilizando la técnica de 16S-DGGE.

Tabla 9: Oligonucleótidos para el estudio de biodiversidad marina.

Abreviación	Secuencia
EukA	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT
EukB	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC

Miller *et al.* (2009) realizaron ensayos aplicando técnicas de PCR-DGGE para determinar qué comunidades colonizaban diferentes tipos de roca. Esta metodología se han aplicado al estudio de comunidades microbianas responsables del proceso de biodeterioro en monumentos históricos, concluyendo en la dominancia de algunas cianobacterias como *Pleurocapsa* sp. en catedrales de Sevilla y Granada. Además demostraron la presencia de microalgas dominantes tales como *Chlorella* sp. en el monasterio de Santa Clara-a-Velha de Portugal.

Estas técnicas se han utilizado ampliamente en el estudio de las interacciones y evoluciones en el tiempo de comunidades microbianas presentes en distintas matrices ambientales (Asiloglu *et al.*, 2015; Ryu *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015; Karło *et al.*, 2015; Niro *et al.*, 2016; Minhas *et al.*, 2016; Bhatt *et al.*, 2016). Su uso no sólo permite la identificación de cepas a través del 18S y 16S, sino que permite también la asociación a taxas y familias. Andreoli *et al.*, 2009, indicaron que el uso de información molecular en las evaluaciones taxonómicas/ecológicas resulta ser de gran importancia no sólo para conocer la historia evolutiva de un grupo de organismos, sino también para evaluar diferentes hipótesis acerca de las distintas distribuciones geográficas de algunos taxas.

Ettl and Gartner en 1995, comentaron que los generos *Koliella* y *Raphidonema* no eran similares y que ambos pertenecían al orden Klebsormidiales; no obstante, Andreoli *et al.* (2009) quienes rebatieron esta afirmación demostrando mediante estudios del 18S que sí eran similares, y que ambos géneros pertenecían a la familia *Trebouxiophyceae* de las *Chlorophytas*.

Por tanto, las diferencias en las secuencias del gen 18S rDNA entre estas dos especies morfológicamente similares sugiere que, tal y como se observa en *Phaeocystis spp.* (Medlin *et al.*, 1994), los ancestros de las especies investigadas eran probablemente especies cosmopolitas de aguas templadas o terrestres de hace no más de 25-50 millones de años, y que el cambio de climas templados a fríos podría haber producido un cambio en la divergencia genómica y no un cambio morfológico en las especies (Andreoli *et al.*, 2009).

La amplificación del gen 18S mediante PCR con oligonucleotidos específicos permite la identificación de clases o diferentes filos en eucariontes, así como la creación de una bases de datos para buscar coincidencias o relaciones filogenéticas (Brandan *et al.*, 2015; Lam *et al.*, 2016; Nakada *et al.*, 2016; Nagai *et al.*, 2016).

5.3. Otras técnicas de identificación de microalgas

La microscopía electrónica es uno de los instrumentos que ha puesto de manifiesto la importancia ecológica de estos microorganismos. Butcher en 1952 describió la primera microalga con un tamaño inferior a 2 μm (*Chromulina pusilla*) dando a conocer, además, una gran cantidad de fotosintéticos con tamaños inferiores a 5 μm (Johnson and Sieburth en 1982). Es de destacar también que la utilización de pigmentos como marcadores indirectos de microalgas, es decir, en relación a la cantidad de pigmentos se estima la cantidad de microalgas (Gieskes and Kraay 1983) ha permitido estimar la distribución e importancia de los fotosintéticos en medios de agua dulce y oceánicos, permitiendo también su identificación.

Recientemente Peng *et al.* (2016) publican una nueva forma de identificación mediante la utilización de un espectrómetro de masas MALDI-MS (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz), el cual presenta la cualidad de ser económico, simple y efectivo.

Sin embargo, han sido las técnicas de Citometría de Flujo una de las mejores herramientas para estimar abundancia y distribución de picoplancton en ambientes acuáticos (Simon *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1988; Legendre *et al.*, 2001; Sieracki *et al.*, 2004; Franqueira *et al.*, 2000; Collier *et al.*, 2000; Stauber *et al.*, 2002; Franklin *et al.*, 2009; Hyka *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2015; Chaloub *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Havlik *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2015; Fachet *et al.*, 2016; Aslam *et al.*, 2016).

Si bien las primeras aplicaciones de la Citometría de Flujo fueron en estudios métricos y taxonómicos (Paau *et al.*, 1978; Yentsch *et al.*, 1983), los diversos avances en las disciplinas relacionadas con este área han permitido la descripción e identificación de microorganismos fotosintéticos, estableciéndose como una buena herramienta en estudios ambientales y toxicológicos. Estas técnicas se basan en el examen de las características intrínsecas del microorganismo dentro de una población, tales como tamaño o fluorescencia autóloga y/o inducida y se vienen utilizando entre otras cosas para el conocimiento del estado fisiológico de microalgas, permitiendo así el estudio de sus bioprocesos (Silvi *et al.*, 2013; Hyka *et al.*, 2012; Hyka *et al.*, 2013; Bertuccio *et al.*, 2015; Esperanza *et al.*, 2015; Nam *et al.*, 2015; Znachor *et al.*, 2015; Fachet *et al.*, 2016).

Jochem (2001) realizó estudios sobre la distribución y composición de las poblaciones de pico-y nanofitoplancton en el Mar Báltico, el Atlántico Norte, el Mar Caribe, el Océano Índico y en aguas de la Antártida, estudiando la distribución de proclorofitas, algas eucariotas y cianobacterias cocoides (*Synechococcus*). Además de las estimaciones de abundancia, obtuvo información acerca del estado fisiológico, pudo determinar el efecto sobre la pigmentación de celular (clorofila y concentraciones ficoeritrina) de fitoplancton en función de la profundidad y disponibilidad de nutrientes en los sistemas acuáticos estudiados.

Por otro lado, Veldhuis *and* Gijsbert, en el año 2000, mencionan las ventajas del uso de la Citometría de Flujo; estos autores comentan que es una excelente herramienta para evaluar la velocidad de crecimiento, mediante la cuantificación de la replicación de ADN en un período dado de tiempo, generalmente de 24h. (Simon *et al.*, 1995; Van Bleijswijk *and* Veldhuis, 1995; Pan *and* Cembella, 1998).

Veldhuis *and* Gijsbert, en 2000, también mencionan la posibilidad de evaluar la integridad de la membrana celular, utilizando fluorocromos como Ioduro de Propidio (PI) capaz de penetrar en las membranas de las células muertas uniéndose a ADN por intercalación entre la doble cadena de bases (Hutter *et al.*, 1978; Gasol *et al.*, 2000; Franklin *et al.*, 2001; Lopes da Silva *et al.*, 2009; Hyka *et al.*, 2013; Pelin *et al.*, 2014; Suman *et al.*, 2015; Adan *et al.*, 2016; Bodénès *et al.*, 2016).

Stauber *et al.* (2001) analizaron el efecto de la inhibición enzimática por la presencia de cobre en periodos cortos de tiempo en *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella* sp., *Dunaliella tertiolecta*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Tetraselmis* sp., *Entomoneis* sp. *punctulata*, *Nitzschia* sp. *Paleacea* sp. Estos autores evaluaron la actividad enzimática de esterasas y la viabilidad celular utilizando el complejo Diacetato de Fluoresceína/ Ioduro de Propidio.

| 72

Por otro lado, la pérdida de viabilidad celular también se puede estimar como pérdida del potencial de membrana mitocondrial, utilizando el fluorocromo 3,3'-diexyloxacarboianina yodido (DiOC₆). Este fluorocromo se incorpora a la célula y en los sistemas membranosos con elevada diferencia de potencial fluoresce intensamente, de ahí puede deducirse "indirectamente" que la célula presenta una alta actividad metabólica. (Marchetti *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2014; Hagström *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2016).

En los estudios de potencial de membrana de diferentes poblaciones celulares se viene utilizando el fluorocromo catiónico lipofílico DiOC₆. Este fluorocromo entra en los sistemas membranosos acumulándose en las mitocondrias, siendo la intensidad de fluorescencia emitida directamente proporcional a la diferencia de potencial entre el interior y exterior de las membranas, y por tanto a la actividad metabólica. (Reis *et al.* 2005; Lopes da Silva *et al.* 2005; Juárez-Jiménez *et al.*, 2010)

Cid *et al.*, en 1996, analizaron el efecto sobre la viabilidad y potencial de membrana con los fluorocromos PI y DiOC₆ respectivamente en *Phaeodactylum tricornerutum* tras la exposición a diferentes concentraciones de cobre en distintos intervalos de tiempo. Estos autores demostraron que la integridad de la membrana de esta especie se ve progresivamente afectada a medida que aumentaba el tiempo de exposición al metal, lo cual conlleva una interrupción del proceso de división celular, y por tanto, al aumento del tamaño de las células. Riisgard *et al.*, en 1980 obtuvieron resultados similares evaluando el efecto de la presencia de cobre en *Dunaliella salina*.

Mediante esta técnica, Wen *et al.* (2014) pudieron conocer el proceso por el cual la paja de arroz inhibe el desarrollo de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, evaluando la integridad de membrana, la viabilidad y el crecimiento de esta microalga en diferentes tiempos de exposición.

6. Obtención de productos de interés en biotecnología a partir de microalgas

6.1. Aspectos generales

Hoy día es indiscutible la importancia económica de las microalgas; a diferencia de las plantas superiores, contienen relativamente pequeñas cantidades de material estructural y gran cantidad de componentes celulares con reconocido valor económico. Contienen una gran cantidad de pigmentos esenciales que bajo la acción de la luz solar, sustancias inorgánicas simples como CO₂, compuestos nitrogenados y fosforados, a través del proceso fotosintético son transformados en compuestos orgánicos complejos como carbohidratos, lípidos, o proteínas que, posteriormente, se acumulan en las células y en los tejidos de los organismos simples y superiores. Por el proceso de fotosíntesis también regulan el contenido de O₂ y CO₂ en la atmósfera, colaborando en el control del efecto invernadero, las lluvias ácidas y la reducción de la capa de ozono. (Travieso y Benítez, 1998).

| 73

Las cianobacterias fueron de los primeros organismos fotosintéticos en poblar la Tierra hace millones de años. Estos microorganismos fijaban el CO₂ presente en la atmósfera (a altas concentraciones) y producían O₂, siendo los principales agentes responsables de la creación de la actual atmósfera terrestre (Velázquez, 2011; Raeesossadati *et al.*, 2015).

Estos microorganismos son clave en el equilibrio planetario, ya que la dinámica del CO₂ en la Tierra está, en gran medida, determinada por ellos y, además, constituyen la base de las cadenas tróficas que permiten la vida en los océanos, condicionando las propiedades físico-químicas del agua y la estructura de otras comunidades bióticas, por ejemplo zooplancton y peces. (Jeppesen *et al.*, 2011).

Son microorganismos apenas explorados, que en la actualidad son objeto de intensas investigaciones para la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas susceptibles de ser utilizadas en medicina o de nuevos usos productivos como la biorremediación ambiental o la elaboración de biocombustibles. (Volkman *et al.*, 1998).

Las aplicaciones biotecnológicas y comerciales de las microalgas son tan diversas como numerosas son las especies que integran este grupo de microorganismos. Sus usos van desde la producción de alimentos para consumo humano (Maranesi *et al.*, 1983; Becker *et al.*, 2004;

Dawczynski *et al.*, 2007; Gouveia *et al.*, 2008; Armand *et al.*, 2015); lípidos para la producción de biodiesel (McMullan *et al.*, 2015; Bharathiraja *et al.*, 2015; Naghdi *et al.*, 2015; Drira *et al.*, 2016; Milano *et al.*, 2016; Neves *et al.*, 2016); industria farmacéutica (Rasala *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Astroc *et al.*, 2016); industria de la cosmética (Wang *et al.*, 2015; Balboa *et al.*, 2015); y hasta en la producción de hidrógeno con aplicaciones energéticas (Melis *et al.*, 2001; Ghirardi *et al.*, 2006; Torzillo *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2015; 2016; Cherad *et al.*, 2016; Yilmaz *et al.*, 2016).

En los últimos 30 años las microalgas más estudiadas y cultivadas con propósitos comerciales han sido *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Chlorella* y *Spirulina* (Zendejas *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2012; Fradique *et al.*, 2012; Horst *et al.*, 2012; Rekha *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2015; Velu *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2016; Varol *et al.*, 2016).

Chlorella y *Spirulina* se utilizan ampliamente en la industria alimentaria como suplementos dietéticos en forma de biomasa deshidratada en tratamientos de profilaxis y complemento en gran variedad de enfermedades (Carvajal *et al.*, 2002). Además, se ha potenciado el uso de *Dunaliella salina* para la producción de β -carotenos, y el uso de *Haematococcus pluvialis* para la obtención de astaxantina. (Borowitzka *et al.*, 1999). Un consorcio de ambas microalgas también ha sido desarrollado para la biofijación de CO₂ proveniente de efluentes gaseosos y líquidos de centrales termoeléctricas (Silva Vaz *et al.*, 2016).

Por otro lado, la utilización de “*Maerl*” (Macroalgas rodofitas calcáreas) en las costas del Canal de La Mancha como fertilizante y corrector de suelo ácidos data de principios del siglo XVIII (Black *et al.*, 2007), y la primera patente de “*Seaweed Manure*” (estiércol de macroalgas marinas) de mediados del siglo XIX (Gardissal, 1856; Craigie *et al.*, 2011). Maurya *et al.*, en 2016 proponen la utilización de biomasa microalgal residual procedentes de la extracción de lípidos para biodiesel, como fertilizantes, con la finalidad de evitar el uso fertilizantes químicos. (Coppens *et al.*, 2015).

Las cianobacterias se han utilizado como biofertilizantes en arrozales, (Metting, 1996), así como macroalgas marinas para la producción de harinas e hidrosiembras, detoxificación de suelos, o como activadores de compost (León-Bogarín *et al.*, 1994).

Muchas de estas aplicaciones se deben a la presencia de polisacáridos matriciales (alginatos, carragenatos, agar, ulvanos, mucopolisacáridos, y sus oligosacáridos), polisacáridos de reserva (manitol, fucoidan, laminarano, almidón florideo), y de pared celular (celulosa y hemicelulosa) (De la Noue *et al.*, 1989; Fernandes *et al.*, 1989; Fischer *et al.*, 1997; De Philippis *et al.*, 1989; De Philippis *et al.*, 2001; Tannin-Spitz *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2004; Banskota *et al.*, 2006; Carlucci *et al.*, 2012; Velu *et al.*, 2015; Morais *et al.*, 2015; Silva Vaz *et al.*, 2016; Raposo *et al.*, 2015; 2016).

Igualmente, se han utilizado como fuente de: macronutrientes, nitrógeno (aminoácidos), potasio, calcio, magnesio, fósforo (Granéli *et al.*, 1999); También como fuente de oligoelementos y quelantes, y como bioantioxidantes y/o activadores tales como polifenoles, xantofilas, carotenoides, enzimas (Guedes *et al.*, 2011); fitohormonas y reguladores del crecimiento (citoquininas, oligosacáridos, betaínas); biotoxinas (Anderson *et al.*, 2003), inhibidores y repelentes de insectos (compuestos aromáticos y terpenoides halogenados con actividad anti-fúngico (Abdo *et al.*, 2012).

Las microalgas no sólo se han utilizado en el área alimentaria, sino que se encuentran presentes en aplicaciones biotecnológicas y médicas: Morris *et al.*, en 2003, evaluaron la utilización de proteínas extraídas de la microalga *Chlorella vulgaris* como complemento de la dieta convencional en la recuperación de la inmunocompetencia de ratones con malnutrición proteico-energética inducida experimentalmente por restricción dietética.

Brown *et al.*, en 1997 describieron la composición bioquímica de al menos 40 especies de microalgas cultivadas en condiciones estándar, siendo las proteínas el componente orgánico más abundante (15-52%, p/v del peso seco), seguido de los lípidos (5-20%, p/v) y carbohidratos (5-12%, p/v).

Es de destacar que la composición bioquímica no siempre se correlaciona directamente con el valor nutricional, ya que en numerosas ocasiones se produce la deficiencia en algunos nutrientes esenciales. Se han realizado numerosos estudios para comprobar cómo varía la composición bioquímica de algunas microalgas bajo distintas condiciones de cultivo (Vu *et al.*, 2015; Bae *et al.*, 2015; Michelon *et al.*, 2015; Zheng, *et al.*, 2016; Whitton *et al.*, 2016).

Las condiciones de cultivo (nutrientes, temperatura, intensidad de luz) influyen en la composición bioquímica microalgal. Sin embargo, se ha demostrado que dependiendo de las diferentes especies de microalgas, los lípidos y/o carbohidratos tienden a acumularse en la fase de estacionaria, independientemente de las condiciones que conducen a esta fase. (Wikfors, 1986; Whyte, 1987; Moal, *et al.*, 1987).

| 76

Las microalgas son consideradas alimentos funcionales, capaces no sólo de elevar el contenido nutricional de los alimentos tradicionales, sino también de tener efectos positivos en la salud de animales y humanos, debido a que contienen cantidades apreciables de proteínas, vitaminas y ácidos grasos polinsaturados. Bajo condiciones de cultivo específicas, algunas microalgas presentan un contenido aminoacídico superior al descrito en alimentos convencionales; tal es el caso de *Scenedesmus* sp. que posee niveles de lisina superiores a determinados alimentos patrones (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), y niveles de proteína entre 25 y 35 %, lo que hace de esta microalga, una atractiva fuente de proteínas. (Quevedo *et al.*, 2008). (Tabla 10).

Tabla 10: Contenido total de proteínas y aminoácidos mayoritarios en cultivos de microalgas.

Aminoácidos	Microalgas	Concentración (%)	Referencia
Lisina	<i>Scenedesmus</i> sp.	24-35	Quevedo <i>et al.</i> , 2008
Glutamina y Alanina	<i>Chorella vulgaris</i>	35	Quevedo <i>et al.</i> , 1999
Arginina y ac. Aspártico	<i>Spirulina</i> sp.	55-70	Avila-Leon <i>et al.</i> , 2012
Ficocianina	<i>Porphyridium cruentum</i>	34.4	Gantt <i>et al.</i> , 1974; Hernández-Míreles <i>et al.</i> , 2006
Glutamina y Leucina	<i>Dunaliella bardawil</i>	50-60	Azevedo, 2009
Fenilalanina	<i>Chlorella pyreïnoidosa</i>	27-44	Camacho <i>et al.</i> , 1988

En relación a la composición de glúcidos, la presencia de lípidos neutros, principalmente glicéridos, representa una fuente potencial de glicerol, por ser el producto secundario de la reacción de síntesis de biodiesel mediante la reacción de transesterificación; además algunas especies de microalgas como *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella salina* pueden producir glicerol libre (Taha *et al.*, 2012).

Por último, cabe mencionar que la chloropyta marina *Dunaliella salina* contiene cantidades significativas de glicerol que pueden incrementarse en respuesta a un aumento de la presión osmótica externa (Ahmed *et al.*, 1987; Naira *et al.*, 1991). Ben-Amotz *et al.* (1981) demostraron que *Dunaliella bardawil* es capaz de producir hasta 20g/m²*día de glicerol

intracelular. Otros autores igualmente han optimizado el cultivo de *Dunaliella* para la producción de glicerol (Zhao *et al.*, 2015; Chow *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015).

6.2. Pigmentos en microalgas

Bajo ciertas condiciones, las microalgas pueden acumular elevadas concentraciones de pigmentos (Begum *et al.*, 2015; Stengel *et al.*, 2015; D'Alessandro *et al.*, 2016; Cheirsilp *et al.*, 2016) tales como ficobiliproteínas (ficocianinas), presentes en determinadas cianobacterias. Por ejemplo, la ficoeritrina, extraída de *Porphyridium cruentum* se utilizaba como colorante natural en alimentación o cosmética y en aplicación clínica para inmunoensayos o reactivos biomédicos de diagnóstico (Fábregas *et al.*, 1998). Wu *et al.* (2005; 2016) igualmente ensayaron diferentes condiciones de cultivo para la producción de pigmentos procedentes de varias microalgas, y Song *et al.* (2016) buscaron el mismo objetivo pero variando las concentraciones de N y P.

Otro ejemplo es *Dunaliella salina*, un tipo de microalga halófila conocida por su contenido de compuestos con actividad antioxidante, y utilizada en cosméticos y en suplementos nutricionales. Esta microalga es la responsable de que las salinas se vean de color rojizo ya que acumula β -carotenos, siendo la mejor fuente natural de este pigmento (Taha *et al.*, 2012). Mendes *et al.* en 2003 demostraron la presencia del pigmento β -caroteno (en sus conformaciones *cis* y *trans*) en la microalga *Dunaliella salina*.

Otros pigmentos presentes en las microalgas (concretamente en *Haematococcus*) son zeaxantina y astaxantina (Fábregas *et al.*, 2000; Lorenz *et al.*, 2000; Sodoro *et al.*, 2002; Dufossé *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2015; Desai *et al.*, 2016). Lorenz *et al.* (2000) describieron numerosas aplicaciones industriales para estos pigmentos, por ejemplo, su uso como colorantes alimentarios, precursores vitamínicos, potenciadores del color en salmónidos y yema de huevo.

La microalga más estudiada para la producción de pigmentos es *Haematococcus pluviialis* (Boussiba, and Vonshak, 1991; Lee and Ding, 1995; Lorenz *et al.*, 2000) cuya producción de pigmentos puede ser estimulada por la luz y la presencia de acetato en el medio (Cordero *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1996) o temperatura elevada (Tjahjono *et al.*, 1994). Kim *et al.* en 2015 describieron la caracterización morfológica, molecular y bioquímica de esta microalga en la producción de astaxantina.

La carencia de nitrógeno es el principal factor de inducción para la producción de pigmentos (Fábregas *et al.*, 1998). Lubián *et al.* en 2000, estudiaron 6 especies de *Nannochloropsis* para tal fin en diferentes condiciones de cultivo, llegando a demostrar la presencia de altas concentraciones de carotenoides en *N. salina* y *N. gaditana*, así como el efecto positivo de la salinidad sobre la producción de zeaxantina en *N.gaditana*. Pancha *et al.* (2015) obtuvieron resultados similares para *Scenedesmus* sp. estudiando la producción de clorofilas y carotenoides.

Las microalgas presentan numerosas ventajas frente a otros modelos de producción de pigmentos mucho más conocidos como son la levadura *Phaffia rhodozyma*, ya que la producción de pigmentos en las microalgas alcanza desde el 1% hasta el 5%, (p/v) de su biomasa, mientras que las diferentes subespecies de esta levadura no superan el 0,4% (Girard *et al.*, 1994). En la **Figura 8** y en la **Tabla 11** se presentan algunos pigmentos extraídos de cultivos de microalgas.

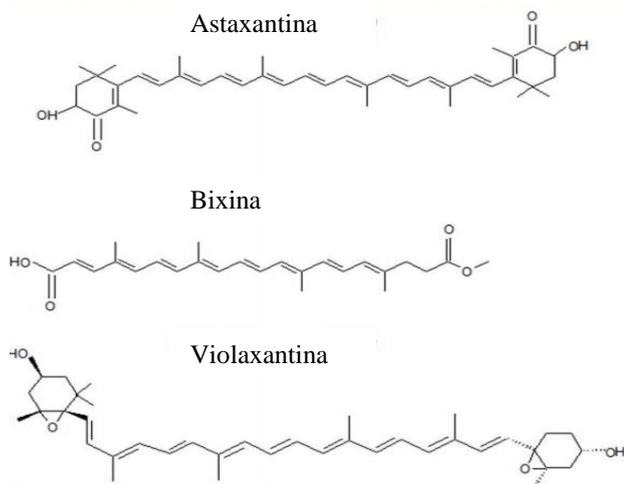


Figura 8: Estructura de algunos pigmentos extraídos de cultivos de microalgas con aplicaciones biotecnológicas.

Tabla. 11: Pigmentos extraídos de microalgas con aplicaciones biotecnológicas.

Pigmento	Color	Microalgas	Aplicación	Referencia
β -Caroteno	Amarillo	<i>Dunaliella salina</i>	Vitamina A ,Aditivo alimentario E160a	Cañizares-Villanueva <i>et al.</i> , 2012 Miandoob <i>et al.</i> , 2015
α -Tocoferol	Marrón	<i>Nannochloropsis oculata</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i>	Vitamina E, aditivo alimentario E306, E307, E308, antioxidante en cosméticos y alimentos	Goh <i>et al.</i> , 2009 Millao <i>et al.</i> , 2016
Violaxantina	Naranja	<i>Botryococcus Braunii</i>	Aditivo alimentario E161e	Muntean <i>et al.</i> , 2007 Zhu <i>et al.</i> , 2015
Ficocianina	Verde- Azul	<i>Arthrospira platensis</i> (Spirulina)	Colorante alimentario, técnicas inmunofluorescentes , anticuerpos	Valle Pérez <i>et al.</i> , 2002 Sánchez <i>et al.</i> , 2002 Satyantini <i>et al.</i> , 2015
Chlorofila A	verde	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Arthrospira platensis</i>	En la industria farmacéutica y cosmética	Cheirsilp <i>et al.</i> , 2016 Kim <i>et al.</i> , 2015

6.3. Vitaminas en microalgas

La mayoría de las vitaminas liposolubles son producidas por microalgas (Fábregas and Herrero 1990; Brown *et al.*, 1999). Las vitaminas presentes en las microalgas están en mayor concentración que en la mayoría de los alimentos convencionales. La ingestión de cantidades pequeñas de microalgas permiten cubrir las necesidades básicas de algunas vitaminas en la alimentación animal, incluida la nutrición humana (Fábregas and Herrero 1990; De Roeck-Holtzhauer *et al.*, 1991), recomendándose, además, en dietas para peces (Sheguineau *et al.*, 1996). En la **Tabla 12** se muestran algunas microalgas productoras de vitaminas así como las vitaminas que producen.

Por otro lado, se ha estudiado que las microalgas cuando son cultivadas de forma autótrofa, producen niveles más altos de vitaminas que cuando son cultivadas en forma mixotrofica. (Cabral *et al.*, 1999). Estos autores comprobaron que cuando cultivaba *Chlorella* sp, en condiciones autótrofas se producía mayor cantidad de biomasa, que en condiciones mixotróficas, y por consiguiente valores mas altos de vitamina A y C.

Tabla 12: Microalgas productoras de vitaminas.

Microalgas	Vitaminas	a	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ac. Ascórbico	24,4 - 117,1	Quintana <i>et al.</i> , 1999
	Riboflavina	8,8 y 24,7	
	Biotina	214,60 a 305,2	
	Tiamina	2,6 y 3,4 (g)	
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Ac. Ascórbico	320	Brown <i>et al.</i> , 1999
	β -Caroteno	29	
	Tiamina (B ₁)	7	
	Riboflavina (B ₂)	6	
<i>Tetraselmis suecica</i>	Ac. ascórbico	83.7	Roeck-Holtzhauer <i>et al.</i> , 1991
	Tiamina (B ₁)	62.7	
	Riboflavina (B ₂)	4.2	
	Cianocobalamina (B ₁₂)	116.2	
<i>Spirulina</i> sp.	Ac. Ascórbico	42,8-195	Babadzhanov <i>et al.</i> , 2004
	Tiamina (B ₁)	11-15	
	Cianocobalamina (B ₁₂)	0,3-0.8	
	Rivoflavina	0,2-0,9	

a: Concentración (mg/100g de Biomasa seca)

6.4. Esteroles en microalgas

A diferencia de los esteroides humanos, que en su mayoría se tratan de colesterol, los esteroides presentes en las microalgas son muy complejos y en algunos casos específicos para cada especie.

Diversos autores han podido constatar que los esteroides del fitoplancton se encuentran en forma libre como lípidos neutros (Ballantine *et al.*, 1979; Volkman *et al.*, 1981). Por otro lado, los esteroides polares también han sido estudiados como una forma glicosilada de los esteroides (Verón *et al.*, 1998).

La diferencia existente en los niveles de esteroides en microalgas depende de la fase de crecimiento, nutrientes y condiciones de iluminación de los cultivos (Ballantine *et al.*, 1979; Gordillo *et al.*, 1998). En las diatomeas se han encontrado altas concentraciones de colesterol, siendo muy utilizado como alimento en los cultivos masivos de moluscos. (Trider *and* Castell, 1980).

Es de destacar que las asociaciones simbióticas en la naturaleza entre moluscos y diatomeas posiblemente se deba a los altos contenidos de colesterol presentes en estas microalgas, siendo este esteroide esencial para el crecimiento de moluscos; así por ejemplo, se ha podido

cuantificar hasta un 50% de peso seco de colesterol en biomasa de *Chaetoceros muelleri*, (Trider and Castell 1980), a su vez utilizado para el cultivo y crecimiento de ostras.(Volkman *et al.*, 2003; Mendiola, 2008).

Tabla 13: Microalgas productoras de esteroides.

Esteroides	Microalgas	Aplicaciones	Referencia
Poriferasterol	<i>Pyramimonas cordata</i>	Industria Química y laboratorios	Ponomarenko LP <i>et al.</i> , 2004
Fungisterol	<i>Scenedesmus acutus</i>	Industria farmacéutica	Rezanka <i>et al.</i> , 1986
Desmosterol	<i>Rhodymenia palmata</i>	Industria farmacéutica	Idler <i>et al.</i> , 1968
Colesterol	<i>Sargassum</i> sp.	Industria alimentaria y farmacéutica	Carrillo <i>et al.</i> , 2012
Stigmasterol	<i>Amphora coffaeiformis</i>	Industria farmacéutica	Gladu <i>et al.</i> , 1991

6.5. Ácidos grasos en microalgas

Los ácidos grasos son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de tipo lineal, y con un número par de átomos de carbono. Tienen en un extremo de la cadena un grupo carboxilo, cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble. Los ácidos grasos son moléculas anfipáticas, es decir, tienen una región apolar hidrófoba (la cadena hidrocarbonada) que repele el agua y una región polar hidrófila (el extremo carboxílico) que interactúa con el agua. Los ácidos grasos de cadena corta son más solubles que los ácidos grasos de cadena larga debido a que la región hidrófoba es más corta. (Gill *et al.*, 1997).

Clasificación de ácidos grasos

Ácidos grasos saturados

Carecen de dobles enlaces entre carbonos; tienden a formar largas cadenas y a ser sólidos a temperatura ambiente, excepto los de cadena corta. Poseen una fórmula general de $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$, donde $n = 4-24$ átomos de carbono. Algunas especies de microalgas presentan variedad de ácidos grasos saturados, por ejemplo *Rhodomonas baltica* ($\text{C}_{12}:0$, $\text{C}_{14}:0$, $\text{C}_{16}:0$, $\text{C}_{18}:0$, $\text{C}_{20}:0$, $\text{C}_{24}:0$) y *Pseudokirchneriella subcapitata* ($\text{C}_{14}:0$, $\text{C}_{16}:0$, $\text{C}_{18}:0$, $\text{C}_{20}:0$, $\text{C}_{24}:0$) (Patil *et al.*, 2006). Otras microalgas tales como *Thalassiosira pseudonana* y *Amphidinium carteri* tienen ácidos grasos saturados de 14 a 18 átomos de carbono ($\text{C}_{14}:0$, $\text{C}_{16}:0$, $\text{C}_{18}:0$) (Bigogno *et al.*, 2002).

Ácidos grasos insaturados

Son ácidos grasos con dobles enlaces entre carbonos y suelen ser líquidos a temperatura ambiente. Dentro de este grupo se describen ácidos grasos monoinsaturados, con un solo doble enlace, y los poliinsaturados con varios dobles enlaces, encontrándose, por lo general, en mayor proporción en relación al total de lípidos en células fotosintéticas. Patil *et al.* en 2006 describieron que en *Isochrysis galbana* un 56,9% del total de ácidos grasos eran insaturados y un 20,4% correspondían a ácidos grasos saturados; resultados similares se obtuvieron para *Pavlova* sp., *Rhodomonas baltica* y *Oocystis* sp., no obstante, las proporciones entre ácidos grasos saturados e insaturados pueden variar de acuerdo a las condiciones de cultivo y en cada especie (Bigogno *et al.*, 2002).

| 82

Ácidos grasos *cis* y *trans*

En la naturaleza la mayoría de este tipo de ácidos grasos poseen una configuración espacial, *cis* (Donovan *et al.*, 2000). Se han encontrado altas concentraciones de ácidos grasos insaturados como 18:4 (n-3) y 22:6 (n-3) en ambas conformaciones *cis* y *trans* en *Pavlova* sp. (Volkman *et al.*, 1991).

La composición de ácidos grasos en microalgas, generalmente presenta un patrón característico para cada grupo de microalgas (Khotimchenko *et al.*, 2005). Los ácidos grasos están distribuidos en tres clases de lípidos: neutros, glucolípidos y fosfolípidos. Entre los glucolípidos los principales componentes son glicéridos tales como monogalactosil y digalactosil. Los lípidos polares (glicolípidos y fosfolípidos) constituyen las membranas celulares, presentando un alto nivel de insaturación.

El pH y la salinidad son factores que modifican la síntesis de lípidos de diversas microalgas, sin embargo el tipo lípido y su concentración, también dependen de la especie y de la magnitud del cambio de éstas variables (Hernández *et al.*, 2006; Guschina and Harwood, 2006; Hu *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009).

La luz y la temperatura son factores que afectan principalmente a la composición de los galactolípidos, mientras que un cambio en las concentraciones de nutrientes, pueden hacer variar la composición de triglicéridos y fosfolípidos. Un descenso en la temperatura incrementa los

niveles de ácidos grasos polinsaturados (AGPI) en el plancton marino, aunque esta producción es progresiva y específica dependiendo de las especies (Gill *et al.*, 1997).

Piorreck *et al.* (1984) demostraron que a diferentes concentraciones de nitrógeno en cultivos *Batch*, algunas microalgas procariotas verde-azules como *Anacystis nidulans*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria rubescens* and *Spirulina platensis*, no varían su composición de ácidos grasos, sin embargo *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, ambas eucariotas, sí variaron su composición dependiendo de la concentración de nitrógeno utilizada en sus cultivos. Volkman *et al.* en 1989, demostraron que existen ácidos grasos polinsaturados como el ácido eicosapentaenoico, el cual es bastante común en diatomeas, tales como *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum* y *Thalassiosira pseudonana*.

Por otro lado, el contenido de lípidos totales y su distribución puede variar dependiendo del taxón (Ackman *et al.*, 2011), de las condiciones fisicoquímicas del cultivo o la microalga utilizada en los cultivos (Volkman *et al.*, 1991). Piorreck *et al.* (1984) demostraron que a bajas concentraciones de nitrógeno en cultivos *Batch* de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, se producían hasta un 45% de lípidos totales del peso seco de biomasa. Cohen *et al.* (1988) evaluaron el efecto de la intensidad de iluminación, temperatura, pH y salinidad en *Porphyridium cruentum*, demostrando que en condiciones óptimas y sin limitación de luz, el ácido eicosapentaenoico (C20:5 ω3) se encontraba en mayor proporción en relación al resto de lípidos presentes, sin embargo, cuando las condiciones de temperatura, pH y salinidad eran menores, se apreciaba un descenso de la concentración del ácido eicosapentaenoico y un aumento en la concentración de ácido araquidónico.

Kendel *et al.* (2012) demostraron que existen diferencias en la composición de ácidos grasos en *Grateloupia turuturu*, de tal modo que dependiendo de la estación del año, por ejemplo, en el paso de verano a invierno, la concentración de lípidos neutros aumenta de 20,1% a 41,8%, y los fosfolípidos aumentan de 11,2% a 33,4%; por otro lado, el ácido eicosapentaenoico se encuentra presente a lo largo de todo el año, aunque se han descrito mayores proporciones en la época estival.

Chen *et al.* (2012) demostraron que incluso el almacenamiento a bajas temperaturas de *Scenedesmus* sp. generaba un incremento en la concentración de ácidos grasos, desde concentraciones trazas a un 62% del peso seco de la biomasa. Resultados similares obtuvieron James *et al.* (2012) quienes además comprobaron que existía un aumento de insaturaciones como respuesta al descenso de las temperaturas.

En acuicultura, los ácidos grasos poliinsaturados, tales como el ácido linoleico (18:2 n-6), linoléico (18:3 n-6), araquidónico (20:4 n-6), eicosapentaenoico (20:5 n-3) y ácido docosahexaenoico (22:6 n-3), presentan un creciente interés biotecnológico, ya que son considerados esenciales en la dieta de diversos organismos marinos por favorecer su crecimiento y rango de supervivencia (Dunstan *et al.*, 1993).

A excepción del ácido linoleico, estos ácidos grasos no se encuentran en abundancia en la naturaleza, siendo las microalgas las mayores productoras de estos lípidos. Algunas de las especies microalgales han sido seleccionadas como potenciales productoras de estos compuestos: *Isochrysis* sp., *Isochrysis galbana* (Otero *et al.*, 1997), *Nannochloropsis* sp. (Serval *et al.*, 1994), *Porphyridium* sp., *Porphyridium cruentum* (Otero *et al.*, 1997; Fábregas *et al.*, 1998), *Nannochloropsis oculata* (Okauchi *et al.*, 1990; Dunstan *et al.*, 1993; Renaud and Parry, 1995), *Monodus subterraneus*, *Tetraselmis suecica* (Otero and Fábregas, 1997) y *Phaeodactylum tricornutum* (Borowitzka, 1988; Yongmanitchai and Ward, 1991; Otero *et al.*, 1997; Fajardo *et al.*, 2007; Burrows *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2012). *Chlorella vulgaris*, (Montoya *et al.*, 2014; Lohman *et al.*, 2015; Najafabadi *et al.*, 2015; Cheirsilp *et al.*, 2016; Caporgno *et al.*, 2016).

Tabla 14: Microalgas estudiadas por sus fines biotecnológicos y su alta proporción de ácidos grasos.

Microalga	Ácidos grasos	Referencia
<i>Nannochloropsis salina</i>	C:16; C16:2; C18; C18:1 ;C18:2; C:18:3 n-3; C:20:1 n-3; C:20:4n-3	Ben-Amotz <i>et al.</i> , 1987 Baumgardt <i>et al.</i> , 2016 Caporgno <i>et al.</i> , 2016
<i>Tetraselmis</i> sp.	C14:0; C:15:0; C:16:0; C:18:0; C:16:1n-7; C:18:1n-9; C:18:1n-7; C:18:3n-3; C:20:4n-6; C:20:5n-3	Moheimani <i>et al.</i> , 2013 Velu <i>et al.</i> , 2015 Kim <i>et al.</i> , 2015
<i>Chlorella vulgaris</i>	C16:0; C16: 1n-7; C18:0;C:18:1n-9; C18:2	Yoo <i>et al.</i> , 2010 Najafabadi <i>et al.</i> , 2015 Lin <i>et al.</i> , 2015 Cheirsilp <i>et al.</i> , 2016 Caporgno <i>et al.</i> , 2016 Zhou <i>et al.</i> , 2016
<i>Botryococcus Braunii</i>	C:16:0; C:16:1; C:18:0; C:18:1n-9; C:18:2; C:22:0; C:22:1	Rao <i>et al.</i> , 2006 Lee <i>et al.</i> , 2015 Ruangsomboon <i>et al.</i> , 2015 Manchanda <i>et al.</i> , 2016
<i>Isochrysis</i> sp.	C:14:0; C:14:1; C:15:0; C:16:0; C:16:1n-7; C:16:2n-4; C:18:0; C:18:1; C:20:0; C:22:0	Renaud <i>et al.</i> , 1991 Nalder <i>et al.</i> , 2015 Lin <i>et al.</i> , 2015
<i>Scenedesmus</i> sp.	C:14:0; C:16:0; C:16:1n-7; C:16:2n- 4; C:18:0; C:18:1n-7; C:18:1n- 9; C:20:1n-9.	Pratoomyot <i>et al.</i> , 2005 Vidyashankar <i>et al.</i> , 2015 Mandotra <i>et al.</i> , 2016
<i>Chlorococcum</i> sp.	C:14:0; C:16:0; C:16:1n-7; C:16:2n- 4; C:18:0; C:18:1n-7; C:18:1n-9.	Kiran <i>et al.</i> , 2015; 2016 Beevi <i>et al.</i> , 2015 Aravantinou <i>et al.</i> , 2016 Zhou <i>et al.</i> , 2016

C:14:0: ac.tetradecanoico (mirístico); **C:15:0:** ac. Pentadecanoico; **C:16:0:**ac. hexadecanoico (palmítico); **C:16:1n-7:** ac. hexadecenoico (Palmitoleico); **C:16:1n-9:** ac. hexadecenoico; **C:18:0:**ac. octadecanoico (esteárico); **C:18:1n-9:**ac. Octadecenoico (oleico); **C:18:1n-7:**ac. Octadecenoico (vacenico).

7. Uso de microalgas en la obtención de Biodiesel

El uso indiscriminado de combustibles fósiles ha originado que éstos estén catalogados como recursos limitados. Es por esto, que surge la necesidad de investigar nuevas fuentes de energía, derivando en los últimos años en la llamada "*Era de las energías renovables*". Se entiende por energías renovables aquéllas que se obtienen de fuentes naturales, virtualmente inagotables, así como las que son capaces de regenerarse de forma natural.

La naturaleza ofrece una gran variedad de recursos explotables y renovables, tales como el viento, las mareas, la luz del sol, etc. Dentro de este contexto se sitúan las plantas, tanto las de gran tamaño como las microscópicas.

La obtención de energía a través de las plantas es una forma indirecta de captación de la energía solar mediante la fotosíntesis vegetal. A través de este proceso las plantas, gracias a la clorofila, transforman el dióxido de carbono, el agua y los productos minerales sin valor energético, en materiales orgánicos con alto contenido energético que, a su vez, sirven de alimento a otros seres vivos.

La biomasa vegetal almacena a corto plazo la energía solar en forma de glúcidos y lípidos. Esta energía puede ser posteriormente transformada en energía térmica, eléctrica o carburantes de origen vegetal. El uso de plantas a nivel industrial para la obtención de biodiesel comenzó a desarrollarse en la década de los sesenta (Chisti, 2007), utilizándose métodos químicos para la obtención de los biocombustibles a partir de lípidos presentes en la biomasa.

Los aceites vegetales son la principal fuente natural para la producción de biodiesel, razón por la cual, el uso de cultivos de alto contenido oleaginoso ha sido estudiado exhaustivamente. Los principales materiales oleaginosos utilizados derivan de la palma, colza y soja, además del girasol, coco, cacahuete, oliva y mostaza, entre otros (Ma & Hanna, 1999; Al-Zuhair, 2007; Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; Quinn *et al.*, 2015; D'Alessandro *et al.*, 2016; Suganya *et al.*, 2016). (Tabla 15).

Tabla 15: Materias primas para la obtención de biodiesel.

Materia Prima	a	b	c	d
Maiz (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Cañamo (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Habe Soya (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatrofa (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola/rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Aceite de Palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalgae (bajo contenido lipidos)	30	58.700	0,2	51.927
Microalgae (Contenido medio lipidos)	50	97.800	0,1	86.515
Microalgae (Alto contenido Lipidos)	70	136.900	0,1	121.104

a: % lípidos en Biomasa; b: Litros aceite/Año/Ha; c: Espacio en m²/Kg biodiesel; d: Biodiesel productividad (kg biodiesel/ha/años).

alimentarias ante la escasez de suelos cultivables. (Dismukes *et al.*, 2008; Suganya *et al.*, 2016).

En el caso particular del sureste asiático y Brasil, el considerable incremento en su tasa de producción de biodiesel a partir de palma y soja, ha ocasionado problemas ambientales inherentes a la deforestación de regiones tropicales (Dismukes *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Cremonez *et al.*, 2015). Actualmente Brasil es uno de los países líderes en la investigación y utilización de biodiesel a partir de fuentes alternativas como microalgas proponiendo un segundo beneficio en la utilización de efluentes con altos contenidos en N y P como fuente de nutrientes para los cultivos algales. (Kligerman *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2015).

Como definición de este término se acepta la de “*biocombustibles sintéticos líquidos*” que se obtienen a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, nuevos o usados, mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación; estos productos pueden aplicarse para la obtención de sustitutos totales o parciales de petrodiesel o gasóleo obtenidos a partir del petróleo”(Chisti, 2007; Milano *et al.*, 2016).

El biodiesel es una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de recursos renovables tales como aceites vegetales o grasas animales (ASTM, 6751-09). Esta definición también está aceptada por la Unión Europea (estándar EU 14214) y puede usarse en su forma pura (B100) o en mezclas con diesel fósil al 2% (B2), 5% (B5) y 20% (B20). (Loera-Quezada *et al.*, 2010).

El proceso por cual los lípidos contenidos en la biomasa se transforman en biodiesel se denomina *Transesterificación* (**Figura 9**), y consiste en combinar el extracto lipídico con un alcohol de bajo peso molecular (Sheehan *et al.*, 1998; Fukuda *et al.*, 2001; Liu & Zhao, 2007; Pacheco *et al.*, 2010).

| 88

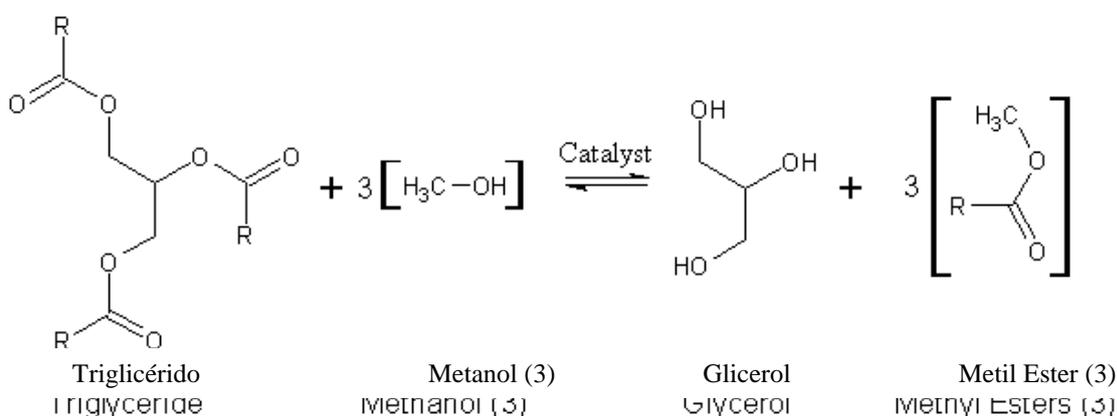


Figura 9: Reacción de transesterificación, para la obtención de biodiesel.

Los principales factores que influyen en el proceso, son la relación molar del alcohol involucrado, la concentración de glicéridos, el tipo de catalizador (álcalis, ácido, lipasas), la temperatura, el tiempo de reacción y el contenido de agua y ácidos grasos libres en la materia prima (Suganya *et al.*, 2016).

En la actualidad, la mayoría de las reacciones para producir biodiesel se realizan mediante *transesterificación alcalina*, dada su rapidez y reacción química relativamente fácil de conseguir. (Ma & Hanna, 1999; Al-Zuhair, 2007; Liu & Zhao, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Vasudevan & Briggs, 2008; Rajagopal *et al.*, 2009; Louw *et al.*, 2016; Piemonte *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2016). Los aceites vegetales son la principal materia prima para la producción de biodiesel, razón por la cual, los cultivos de vegetales con alto contenido oleaginoso han sido ampliamente estudiados.

No obstante, el elevado costo de la materia prima, que contribuye del 50 al 90% del precio de producción del biodiesel, ha obstaculizado la comercialización del biocombustible, motivo por el que se ha propuesto el uso de aceites de desecho y de grasas animales; esta alternativa que no ha sido del todo satisfactoria debido a los gastos adicionales necesarios para el refinamiento y

eliminación de compuestos no lipídicos (Al-Zuhair, 2007; Liu & Zhao, 2007; Song *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Santamaría *et al.*, 2015; Gomez *et al.*, 2015; Encinar *et al.*, 2016).

En el 2007, la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales (comestibles y no comestibles, vírgenes y usados) y grasas animales fue del 0,3% (12 Mtons) del consumo global de petróleo (3952,8 Mtons), situación que constata la incapacidad de estas fuentes para desplazar la demanda actual y futura de combustible (BP *Statistical Review of World Energy* 2008; Schenk *et al.*, 2008; Anuar *et al.*, 2016; Eryilmaz *et al.*, 2016).

Asimismo, la obtención de biodiesel a partir de plantas oleaginosas (comestibles y no comestibles) está limitada por varios inconvenientes: son necesarios largos periodos de producción (meses o años) inherentes a la tecnología agrícola, el contenido lipídico (menor al 5% del peso seco total), la dependencia a las condiciones climatológicas, la ubicación geográfica, la fertilidad de los terrenos para el cultivo y la elección de la especie cultivada; no obstante, el principal obstáculo lo constituye la extensa superficie de cultivo requerida y el enorme volumen de agua necesario para el riego (Li *et al.*, 2007; Chisti, 2007; Chisti, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Anuar *et al.*, 2016; Eryilmaz *et al.*, 2016).

La sustentabilidad de la industria del biodiesel requiere de materias primas alternas que permitan operar continuamente y superar las limitaciones señaladas (Liu & Zhao, 2007); una alternativa prometedora es la obtención de aceites a partir de cultivos de microalgas.

En la actualidad se ha detectado el uso de lípidos microalgales para la producción de biodiesel, ya que es una alternativa que asegura satisfacer o reemplazar la demanda global de petrodiesel. Esta tecnología es prometedora dadas las ventajas que ofrece en contraste con las plantas oleaginosas, tales como: mayor eficiencia fotosintética, eficacia superior en la asimilación de nutrientes, y periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, a causa de los breves tiempos de duplicación de las microalgas (Slininger *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016).

Los cultivos microalgales son independientes de la estacionalidad inherente a los cultivos agrícolas y de la fertilidad del suelo, condición que posibilita prescindir de herbicidas y pesticidas y además, permite emplear territorios marginales e inclusive zonas no aptas para la agricultura,

ganadería, industria y turismo. En la **Figura 10** se describe el proceso de cultivo de microalgas para la obtención de biodiesel.

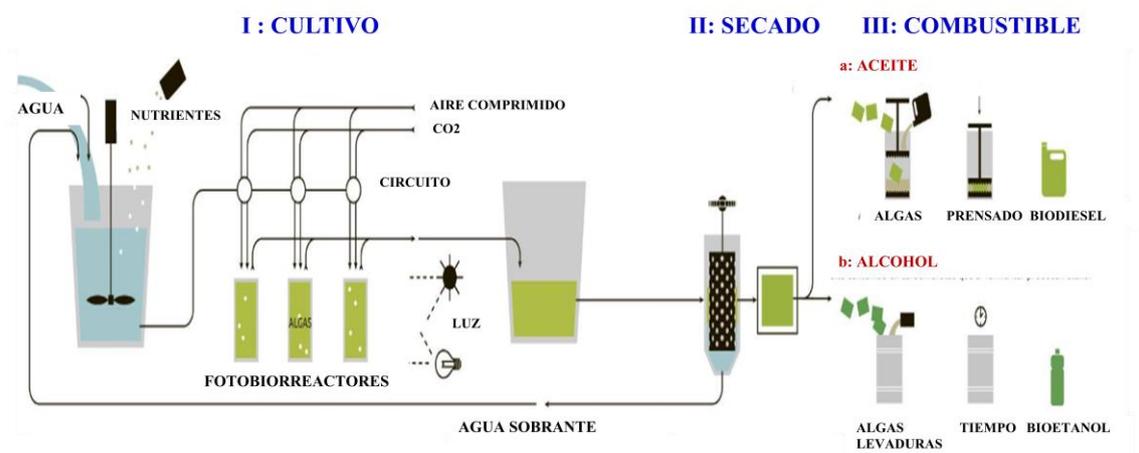


Figura 10: Descripción de un cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles. **A)** el cultivo se obtiene a partir de un inóculo de microalgas precultivadas a las que se le adicionan nutrientes. **B)** Masificación y posterior recolección de biomasa (cosechado), mediante técnicas de centrifugado. **C)** Extracción de lípidos a partir de la biomasa y posterior síntesis de biocombustibles.

I: CULTIVO: Mezcla de Agua y Nutrientes similar al abono para plantas

II: Se adiciona CO₂ y aire comprimido para hacer circular el circuito. Además se abastece de luz natural o artificial

III: SECADO: Centrifugación, liofilización y empaquetado al vacío. Eliminación del agua y compactación en un bloque de biomasa listo para ser transformado en combustible

IV: GENERACION DE COMBUSTIBLE: a. ACEITE (Biodiesel): Se seleccionan la Biomasa con alto contenido en grasas. b. ALCOHOL (Bioetanol): Se selecciona biomasa con alto contenido en carbohidratos para su posterior fermentación y producción de etanol.

Asimismo, en contraste con los cultivos tradicionales, requieren de menores cantidades de agua y son flexibles ante el tipo y la calidad de ésta, por lo que prosperan convenientemente tanto en aguas marinas, como dulces, salobres y residuales.

Sharma *et al.* (2012) aseguran que algunas microalgas pueden también modificar su metabolismo de los lípidos de manera eficiente en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. Igualmente, el contenido oleaginoso y el perfil de composición lipídica de las microalgas pueden ser controlados en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes y luz (Cheirsilp *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012;

Ruangsomboon *et al.*, 2012; Slininger *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016). Kumar *et al.* (2014; 2016) sugieren la utilización cultivos mixotrofos y la utilización de inductores de la síntesis de lípidos, tales como el acetato de sodio, glicerol, Mg₂Cl y NaCl, como complementos del medio de cultivo BG11 para inducir la síntesis de lípidos neutros. Se ha demostrado que algunas microalgas pueden acumular hasta un 60% de su peso seco en lípidos. (Tabla 16).

Tabla 16: Contenido en aceite y productividad de lípidos de diferentes especies de microalgas.

Especie	a	b	Referencia
<i>Nannochloropsis sp.</i>	60	204	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
<i>Neochloris oleoabundans</i>	56	13,22	Gouveia <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>	42	157	Zheng <i>et al.</i> , 2012
<i>Cryptocodium cohnii</i>	41	82	Mendoza <i>et al.</i> , 2008
<i>Scenedesmus obliquus</i>	33	NR	Baky <i>et al.</i> , 2012
<i>Nannochloropsis oculata</i>	42	64,71	Gu <i>et al.</i> , 2012
<i>Dunaliella</i>	67	33,5	Takagi <i>et al.</i> , 2006
<i>Scenedesmus rubescens</i>	70	107,8	Lin <i>et al.</i> , 2012
<i>Arthrospira platensis (Spirulina)</i>	8,3	0,460	Ferreira <i>et al.</i> , 2012

a: Contenido aceite (% del peso seco); b: Productividad de lípidos mg/L* día

La concentración de lípidos totales en microalgas puede llegar a valores de hasta 70% de su biomasa en peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo, como también de la fase de crecimiento y la edad del cultivo, donde el contenido y composición de los lípidos puede variar. En los cultivos microalgales se ha podido demostrar un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Spolaore *et al.*, 2006; Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2016).

Bigogno *et al.* (2002) demostraron que *Parietochloris incisa* posee un alto contenido de acilglicéridos en la fase logarítmica llegando a un 43 % del total de ácidos grasos, sin embargo, en la fase estacionaria, el contenido de acilglicéridos aumentó un 77% del total de ácidos grasos.

Cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales químicos y físicos, ya sea por separado o en combinación, se promueve la síntesis y acumulación de triglicéridos, seguido también de significativas alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos (Gim *et al.*, 2016). Kumar *et al.* (2016) realizaron pruebas para inducir la síntesis de lípidos neutros variando la fuente de carbono realizando mezclas de carbono inorgánico y orgánico, también la utilización de algunas sales (Signori *et al.*, 2016). Velu *et al.*, 2015, demostraron el efecto sobre la composición bioquímica, velocidad de crecimiento y

producción de lípidos en *N.salina* y *D.tertiolecta*, utilizando varias fuentes de carbono orgánico alternativas, demostrando mejores resultados cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono. Por otro lado, hay quienes sostienen que la utilización de glicerol, como subproducto de la síntesis de biodiesel, también podría ser utilizado por algunas microalgas como fuente de carbono. (Zhang *et al.*, 2016; Paranjape *et al.*, 2016). Otros autores han probado la utilización simultánea de glucosa, peptona y CO₂, logrando concentraciones óptimas de producción de biomasa mediante la utilización de MRS (Sun *et al.*, 2016).

Sharma *et al.* (2012) concluyeron que, factores como la iluminación, limitación de nutrientes, temperatura, salinidad y pH contribuyen al estrés y por consiguiente a un incremento en la producción de lípidos. Estos mismos autores, demostraron que la limitación de nutrientes y distintos ciclos de luz sobre cultivos de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata*, se traducían en cambios en el contenido celular, favoreciendo la acumulación de lípidos. La iluminación, por tanto, tiene un efecto inductor sobre la formación de lípidos polares (fosfolípidos y glucolípidos) (Hu *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2016).

Ya en 1972, Aaronson *et al.* demostraron que el aumento de la temperatura de 15 a 30°C en los cultivos de *Nannochloropsis oculata* conllevaba un incremento en la concentración de lípidos; resultados similares obtuvieron Converti *et al.*, 2009, quienes demostraron que el aumento de la temperatura de cultivo en 5°C incrementaba en un 100% el contenido total de lípidos.

Por otro lado, Renaud *et al.*, 2002, demostraron que incluso una variación de 3 grados (de 27°C a 30°C) en el cultivo de *Cryptomonas* sp. daba como resultado un aumento desde el 12,7 % a un 21,7% de lípidos totales del total de biomasa seca.

Además, el efecto de la temperatura no sólo puede verse reflejado en el contenido total de lípidos, sino también en la composición de ácidos grasos, de tal modo que se ha observado que en muchas algas y cianobacterias la insaturación de los ácidos grasos se incrementa a medida que la temperatura desciende y viceversa, es decir, cuando la temperatura aumenta, se incrementa también la saturación de los ácidos grasos. Sushchik *et al.*, 2003, demostraron que el aumento de la temperatura incrementaba el contenido de ácidos grasos saturados en cultivos de *Chlorella vulgaris* and *Botryococcus braunii*. Zhu *et al.* (1997) demostraron igualmente, que un aumento

en la temperatura en los ensayos realizados con *Isochrysis galbana* se traducían en un incremento de lípidos neutros.

La limitación de nutrientes, es otro factor que conlleva a un nivel de estrés que se traduce en un aumento en la concentración de lípidos totales. Illman *et al.* (2000) demostraron que una limitación de nitrógeno en el cultivo de *Chlorella vulgaris* daba lugar a un aumento en el contenido de lípidos totales, generándose un aumento de biomasa desde un 14,2 % hasta un 40%. Gordillo *et al.*, en 1998 demostraron que, los triglicéridos son los lípidos que se encuentran en mayor proporción en microalgas del género *Dunaliella* y que bajo condiciones de limitación de nitrógeno, los triglicéridos aumentaron del 1% al 22%, respecto a los lípidos totales; En este contexto, Xin *et al.* (2010), demostraron que una disminución conjunta de nitrógeno y fósforo en cultivos de *Scenedesmus* sp. incrementan la concentración de lípidos totales de un 30% a un 53% de la biomasa seca.

Las condiciones nutricionales, tales como limitaciones de nutrientes, al igual que sucede con la temperatura, lleva consigo no sólo un aumento en la concentración de lípidos totales, sino también en la diversidad y/o contenido de lípidos (Singh *et al.*, 2016). Los estudios realizados por Härtel *et al.* (2000) demostraron que cuando se limitaba la concentración de fósforo en el cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* se produce un descenso en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados; por otro lado, se pudo observar un incremento en acilglicerol cuando se limitaba la concentración de nitrógeno en los cultivos (Alonso *et al.*, 2000; Khozin-Goldberg *et al.*, 2006).

Actualmente la utilización de microalgas como fuente de lípidos para la producción de biocombustibles se presenta como una alternativa bastante fiable y rentable, aunque aún existen limitaciones: a) lograr una productividad de biomasa microalgal con el mayor contenido de lípidos posible, b) diseños de reactores con el fin de lograr mayores rendimientos de biomasa microalgal a costos de instalación y operación competitivos respecto a las formas convencionales de obtención de lípidos, c) diseñar nuevos procesos de cosecha y recolección de biomasa generada por los cultivos. Los métodos adicionales más utilizados para este propósito son la *centrifugación* (especialmente en el caso de las microalgas unicelulares), *filtración* cuando se han formado flóculos o se trata de microalgas o cianobacterias relativamente grandes o filamentosas y en algunos casos, *sedimentación por gravedad*, *flotación* o *técnicas de electroforesis*. Sin embargo,

la centrifugación es una técnica costosa y generalmente se aplica sólo cuando se quiere recuperar metabolitos de alto valor agregado (Uduman *et al.*, 2010).

Otro método también utilizado es la recuperación de biomasa microalgal por *floculación* basándose en que todas las bacterias, cianobacterias y microalgas están cargadas negativamente debido a la presencia de exopolisacáridos en la superficie celular (Lee *et al.*, 2009). Perez *et al.*, 2016 evaluaron el efecto de pH y salinidad en el proceso de floculación mediante FeCl_3 de *Chaetoceros gracilis*.

En el caso de las cianobacterias, se ha determinado que los polisacáridos extracelulares son heteropolímeros aniónicos complejos que contienen ácido urónico y otras moléculas peptídicas, radicales acetilo, pirúvico o derivados sulfatados (De Philippis *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayoría de los métodos de floculación no son adecuados para la cosecha de biomasa algal y algunos de ellos muestran interferencia con el agua de mar (Lee *et al.*, 2009). Hace falta seguir trabajando en este objetivo de manera que se pueda lograr un método económico y que no dañe la materia prima.

Por todo ello se hace necesario optimizar medios de cultivo y métodos de extracción de lípidos y de transesterificación, que permitan mayores rendimientos a menores costos, y por último diseñar cultivos que a la vez que se puedan obtener lípidos en gran cantidad se den lugar también a la generación de co-productos de alto valor agregado (Tuirán *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012; Griffiths *et al.*, 2016). En relación a la extracción de los lípidos intracelulares, este proceso se puede llevar a cabo con o sin rotura de membrana celular previa. La rotura de la membrana celular puede llevarse a cabo por métodos tradicionales como el uso de la “*prensa francesa*” que utiliza altas presiones, o por un método más moderno que es la *electroporación*, según el cual se aplica un campo eléctrico a las células para lograr perforaciones en su pared celular.

La extracción de los lípidos se puede realizar con solventes químicos en una o dos etapas, sin embargo, la extracción con solventes no es amigable con el ambiente, especialmente por las emisiones a la atmósfera y por la disposición final del mismo. En consideración a lo anterior, se han desarrollado métodos alternativos de extracción tales como el *proceso de extracción acuosa*, el cual tiene como ventaja que es menos costoso y más seguro, y se logra una producción simultánea de aceite y fracciones ricas en proteínas. Más aún, se han utilizado diversas enzimas

para mejorar la extracción de lípidos en este tipo de procesos, alcanzando porcentajes de recuperación hasta del 90% (Chun-Chong *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2011; Mercer *et al.*, 2011; Dang-Thuan *et al.*, 2012; Taher *et al.*, 2014; Zhuang *et al.*, 2016; Neves *et al.*, 2016);

Otros autores proponen técnicas fusionadas como el *secado convencional* y la *disrupción celular por microondas* o *sonicación* (Guldhe *et al.*, 2014), *saponificación directa* o la *extracción supercrítica-CO₂* (Li *et al.*, 2014).

Actualmente existe una línea de investigación que utiliza la transesterificación de los lípidos de manera directa en la biomasa algal (Suh *et al.*, 2015; Jazzar *et al.*, 2015; Kin *et al.*, 2015; Go *et al.*, 2016; Durairasan *et al.*, 2016).

En este sentido, la optimización de los medios de cultivo con fines industriales, en la mayoría de los casos ha sido efectuada mediante procedimientos empíricos de ensayo y error, no sólo en la formulación del medio de cultivo sino también en las condiciones de operacionales de cultivo celular. De cualquier manera es probable que el medio de cultivo original pueda ser optimizado, modificando el contenido de componentes nutricionales del medio y las materias primas utilizadas, siendo factible en muchos casos optimizar un medio de tal manera que no sea solamente más productivo, sino de menor o igual costo que el original. (Maddox, 1977)

Una de las técnicas más eficientes para la optimización de procesos es La *Metodología de Superficie de Respuesta* (MSR); la cual tiene como objetivo principal determinar las condiciones de operación óptima para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación. La MSR es utilizada con éxito en la industria química y en los últimos años se viene aplicando en ensayos de Microbiología Ambiental para la formulación de medios de cultivo y la optimización de cultivos con fines biotecnológicos (Benemann *et al.*, 1987; Dreyer *et al.*, 2000; Abdel-Fattah *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2015; Mandik *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2016; Abinandan *et al.*, 2016; Kumaran *et al.*, 2016; Kiran *et al.*, 2016).

La aplicación de estas herramientas estadísticas, ayuda no solo a diseñar medios de cultivos con objetivos de producción masiva cumpliendo con expectativas industriales, sino que por otro lado permite optimizar procesos industriales y obtener respuestas de procesos simulados, obteniendo así ecuaciones empíricas que dan lugar a escalar procesos de laboratorio a la industria. Dreyer *et al.* (2000) describieron un medio de cultivo con las condiciones óptimas para aumentar la producción de L-lisina en cultivos de *Corynebacterium glutamicum*. Por otro lado, Sánchez *et*

al. (2008), analizaron el efecto de factores como temperatura, pH, salinidad e iluminación en cultivos de *Scenedesmus almeriensis* para la producción de luteína, concluyendo que si bien la máxima producción de biomasa se obtuvo a 33°C y una intensidad de iluminación de 1700 $\mu\text{E}/\text{m}^2$, la mejor producción de luteína se obtuvo a 44°C y 1233 $\mu\text{E}/\text{m}^2$.

Isleten-Hosoglu *et al.* (2012) optimizaron la producción de lípidos en cultivos de *Chlorella saccharophila*, en función de la fuente de carbono (glucosa y peptona) y fuente de nitrógeno (NH_4Cl y NaNO_3). También con *Chlorella sorokiniana* se evaluó la optimización del crecimiento y acumulación de lípidos de manera simultánea mediante MSR (Kumar *et al.*, 2016) concluyendo que la mejor manera de aumentar la producción de lípidos para fines biotecnológicos es sincronizando el crecimiento y la síntesis de lípidos neutros.

Por último, si bien, constituye una herramienta estadística de gran ayuda en la optimización de condiciones nutricionales en medios de cultivo, también ha sido utilizada para optimizar procesos de extracción de metabolitos secundarios, Li *et al.*, 2012, optimizaron la extracción enzimática de polisacáridos totales en cultivos de *Gelidium amansii* y *Laminaria japonica*, optimizando la concentración de enzima necesaria y el tiempo de reacción para obtener la máxima producción de polisacáridos (Ramírez *et al.*, 2006).

Objetivos

- Diseño de un medio de cultivo que cumpla con los requisitos nutricionales específicos para el cultivo masivo y/o individual de microalgas psicrófilas aisladas de lagunas de alta montaña.
- Validación estadística de resultados de obtención de medio de cultivo.
- Obtención ecuación matemática estadísticamente válida, que prediga resultados de obtención de masa en función de variables como grados de dilución y temperatura con la finalidad de escalar a niveles de altas producciones.
- Identificación genética de microalgas aisladas de muestras de agua tomadas de laguna de La Caldera en Parque Natural de Sierra Nevada.
- Cultivo y masificación de microalgas aisladas de muestras de agua tomadas de laguna de La Caldera en Parque Natural de Sierra Nevada
- Caracterización de cultivos individuales, obtención de parámetros bioquímicos y de cultivo como, velocidad de crecimiento y concentración de biomasa en función de tiempo de cultivo.
- Determinación de viabilidad y poliarización de membrana celular, como actividad metabólica de microalga seleccionada, mediante citometría de flujo
- Caracterización cualitativa de lípidos presentes en microalga seleccionada mediante citometría y cromatografía de gases acoplado a detector de masas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sierra Nevada

1.1. Selección de zonas de muestreo

Para la realización de estos ensayos se seleccionó la *Laguna de La Caldera* localizada en el sistema montañoso de Sierra Nevada (Granada) (**Figura 11**).

Criterios de selección de la laguna de estudio:

- * Se localiza a una altura superior a 3000 m
- * Es la que posee mayor área de todas las existentes
- * Es de las más profundas
- * Presenta altas fluctuaciones de temperatura a lo largo de todo el año pasando del punto de congelación en invierno a los 15 grados en verano.

Esta laguna presenta un área superficial de aproximadamente 2 ha y una zona de captación es de 23,5 ha. La profundidad media es de 4,3 m, con un máximo de profundidad variable a lo largo del año entre los 2 y 14 m. Esto se debe a su carácter endorreico, por lo que las recargas hidrológicas y la evaporación son las responsables de este nivel de fluctuaciones. (Castillo *et al.*, 2009).



Figura 11: *Laguna de la Caldera* en Parque Nacional Sierra Nevada. Fotografía realizada por nuestro grupo de investigación en Julio de 2009.

1.2. Toma de muestra, traslado y almacenamiento

Se seleccionaron 2 puntos de estudio de la superficie de la laguna con la finalidad de obtener muestras representativas de las distintas zonas fóticas; para ello se tomó agua de los primeros 50 cm de profundidad. Los días de toma de muestra se muestran en la **Tabla 17** así como los parámetros físicos medidos in situ en la laguna. La temperatura y pH se midieron con un pHmetro ATC con compensación de temperatura y la conductividad con un Conductivímetro Nahita 910/3; El O₂ disuelto se midió mediante el método Winkler.

Tabla 17: Fechas de muestreo y valores de temperatura y pH tomadas en el punto de muestreo de la *Laguna de la Caldera*

<i>Fecha de muestreo</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Conductividad (pSIcm)</i>	<i>O₂ disuelto (mg*L⁻¹)</i>
2-Julio-2009	6	7,10	<60	8,8±0,4
30-Agosto -2009	16	6,9	<60	8,2±0,6
7-Julio-2010	8	7,15	<60	7,3±0,5
30-Agosto-2010	17	7,02	<60	6,8±0,4
3-Julio-2011	7	7,12	<60	7,0±0,5
29-agosto-2011	17	6,99	<60	5,9±0,4

Con objeto de no afectar a la comunidad autóctona psicrófila de las muestras obtenidas en la laguna de estudio (**Figura 11, 12**), éstas fueron recolectadas en envases de plástico previamente esterilizados procurando mantener la temperatura constante desde el punto de muestreo hasta su posterior análisis en el laboratorio, utilizando para ello neveras acondicionadas con sistemas de refrigeración portátil. La recolección de las muestras y su posterior traslado desde la laguna hasta nuestro laboratorio se realizó en la mayor brevedad posible.



Figura 12: Laguna de *La Caldera* (Sierra Nevada). Zonas de deshielo al inicio de verano. Fotografía tomada por nuestro grupo de investigación en julio de 2010.

Todos los ensayos se realizaron en los laboratorios del Instituto Universitario de Investigación del Agua (Universidad de Granada), concretamente en el laboratorio de Microbiología General y el de Microalgas al amparo del Grupo de Investigación de Microbiología Ambiental RMN270.

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas en una cámara fría acondicionada con sistema de iluminación artificial y temperatura de 6 ± 2 °C; el tiempo de almacenamiento hasta el inicio de los análisis no superó en ningún momento las 24h.

2. Medios de cultivo

2.1. Medios de cultivo control

En primer lugar se procedió a realizar diferentes ensayos de crecimiento de microalgas controles en diferentes medios de cultivo con objeto de poder establecer las condiciones nutricionales de las microalgas obtenidas de las matrices acuáticas de la laguna. Para ello se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Medio de Cultivo de Rodríguez López (RL)

Este medio de cultivo fue descrito por Rodríguez-López en 1964. Este autor comenta que en el caso de que se desee acelerar el crecimiento de un cultivo de una microalga (concretamente de *Chlorella pyrenoidosa*), es aconsejable el uso del medio de cultivo descrito en la **Tabla 18**. Este medio ha sido muy utilizado para el cultivo de microalgas pertenecientes a la división de las Chlorophytas, tales como *Botryococcus braunii* (Orpez *et al.*, 2009); *Scenedesmus Obliquus* (Martínez *et al.*, 2000) y *Chlorella vulgaris* (Maza-Márquez *et al.*, 2014).

Para la preparación de un litro de medio de cultivo líquido se tomaron 10 ml de las soluciones A, B y C, y 1 ml de las soluciones D, E y F, ajustando el pH a 7,2, y aforando el volumen final a 1L con agua destilada. (**Tabla 18**).

Tabla 18: Nutrientes del medio *Rodríguez-López (RL)*

<i>Solución</i>	<i>Nutrientes</i>	α
<i>Micronutrientes</i>		
A	KNO ₃	10,111
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	16,310
	NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0,780
B	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,50
C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147,000
<i>Micronutrientes</i>		
D	FeSO ₄ ·7H ₂ O	7,00
	ADTA	9,30
E	MnSO ₄ · H ₂ O	0,17
	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,29
F	CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,25

α : Concentración final del medio (mg*L⁻¹)

Medio de F-Guillard (GL)

Este medio fue descrito por R.R.H. Guillard en 1959. El autor comenta que los nutrientes de este medio de cultivo son los que se utilizan rutinariamente para el cultivo de fitoplancton marino, pero que en el caso de cultivos de microalgas las concentraciones son diferentes.

| 103

Para la preparación de 1 litro de medio de cultivo líquido se tomó 1 ml de cada solución de nutriente, así como 1 ml de solución de vitaminas ajustando el pH a 7,2, y aforando a un volumen final a 1L con agua destilada. (**Tabla 19**) (Guillard *and* Ryther, 1962; Stein, 1973; Guillard, 1975). Este medio de cultivo, también ha sido descrito para cultivos de microalgas de la división Chlorophyta. Entre ellas, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp.

Tabla 19. Nutrientes del medio *F- Guillard*.

<i>Solución</i>	<i>Nutrientes</i>	α
<i>Macronutrientes</i>		
A	NaNO ₃	85,01
B	K ₂ HPO ₄	8,71
C	NaHCO ₃	12,60
D	MgSO ₄ *7H ₂ O	36,97
E	Na ₂ SiO ₃ *9H ₂ O	28,42
F	CaCl ₂ *H ₂ O	36,76
<i>Micronutrientes</i>		
G	FeCl ₃ *6H ₂ O	3,15
H	Na ₂ EDTA	4,36
I	MnCl ₂ *4H ₂ O	0,18
J	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,022
K	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,01
L	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,01
M	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,006
<i>Vitaminas</i>		
	Tiamina HCl	0,1
N	Biotina	500
	Cianocobalamina	500

α : Concentración final del medio (mg*L⁻¹)

2.2 Diseño del medio de cultivo *Rodríguez-López modificado (RLMo)*

Con objeto de obtener un nuevo medio de cultivo óptimo para el crecimiento de las microalgas de estudio, y que supliera las deficiencias de los descritos en bibliografía, se realizaron ensayos con los diferentes medios de cultivo descritos en el apartado 2.1. modificando tanto algunos de los nutrientes como las condiciones de cultivo (**Apartado 3**). Con ello se pretendió aumentar el rendimiento en obtención de biomasa y por tanto la productividad de las microalgas aisladas de las matrices acuáticas de estudio.

Este medio fue diseñado en nuestro laboratorio y para su elaboración se utilizaron nutrientes tanto del medio RL como del medio F-Guillard. Para la preparación de un litro de medio de cultivo líquido se tomaron 10 ml de las soluciones A, B y C, y 1 ml de las soluciones D, E, F y G, se ajustó el pH=7,2 y finalmente se aforó a un volumen final de 1L con agua destilada. (**Tabla 21**).

Tabla 21: Nutrientes del medio *Rodríguez-López modificado (RLMo)*.

<i>Solución</i>	<i>Nutrientes</i>	α
<i>Micronutrientes</i>		
A	KNO ₃	10,111
	Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	16,310
	NaH ₂ PO ₄ *2 H ₂ O	0,780
B	NH ₄ Cl	30
	MgSO ₄ *7H ₂ O	246,5
C	CaCl ₂ *2H ₂ O	147
<i>Micronutrientes</i>		
D	FeSO ₄ *7H ₂ O	7
	EDTA	9,3
E	MnSO ₄ *H ₂ O	0,17
	ZnSO ₄ *7 H ₂ O	0,290
	CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,250
F	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,01
	H ₃ BO ₃	0,061
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4 H ₂ O	0,013
<i>Vitaminas</i>		
E	Tiamina HCl	0,1
	Biotina	500
	Cianocobalamina	500

α : Concentración final del medio (mg*L⁻¹)

2.3. Ensayos estadísticos

Las medidas de biomasa se realizaron mediante lecturas de Densidad Óptica (D.O.) a 560nm. (modelo espectrofotometro instituto). Se diseñaron una serie de ensayos utilizando el programa estadístico Desing Expert v8.0 con objeto de poder evaluar mediante una superficie de respuesta RSM, qué medio y condiciones de cultivo eran las óptimas para el crecimiento de cada cepa control.

2. Cepas control y ambiental

3.1. Cepas control empleadas

Como cepa control del ensayo a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ se utilizó la microalga "SX1" aislada de las aguas de lavado de las aceitunas recolectadas de la Almazara Nuestra Señora los Desamparados, Puente Genil, Córdoba. Esta microalga presentó una similitud filogenética de un 99% con *Chrorella vulgaris*, según la Base de Datos *National Center for Biotechnology Information*.

Como cepa control del ensayo realizado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ se utilizó la microalga *Scenedesmus obliquus* CCAP 276/3A suministrada por el Centro de Investigación *Culture Collection of Algae and Protozoa*, Oban (Reino Unido).

Se realizaron una serie de ensayos comparativos de ambas microalgas controles a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, probando 3 medios de cultivo, RL, GL y RLMO a diluciones 20%, 50% y sin diluir (100% de cc).

3.2. Preparación de precultivos e inóculos

106 Antes de iniciar un cultivo masivo de microalgas es necesario partir de un inóculo de células jóvenes de entre 6-7 días. Para ello se realizó un pre-cultivo en medio sólido con las cepas controles, inoculando mediante la técnica de siembra en zigzag 4 a 5 placas con medio RL-agar; posteriormente, se incubaron a diferentes temperaturas ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 4 a 5 días y bajo radiación lumínica constante.

Una vez finalizado el periodo de pre-cultivo, se inocularon los biorreactores con una suspensión de microalgas (preparada en agua destilada estéril) de concentración conocida ($15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), expresado como valor medio de mg biomasa seca/L suspensión. En la **Figura 13** se muestran los diferentes precultivos realizados.

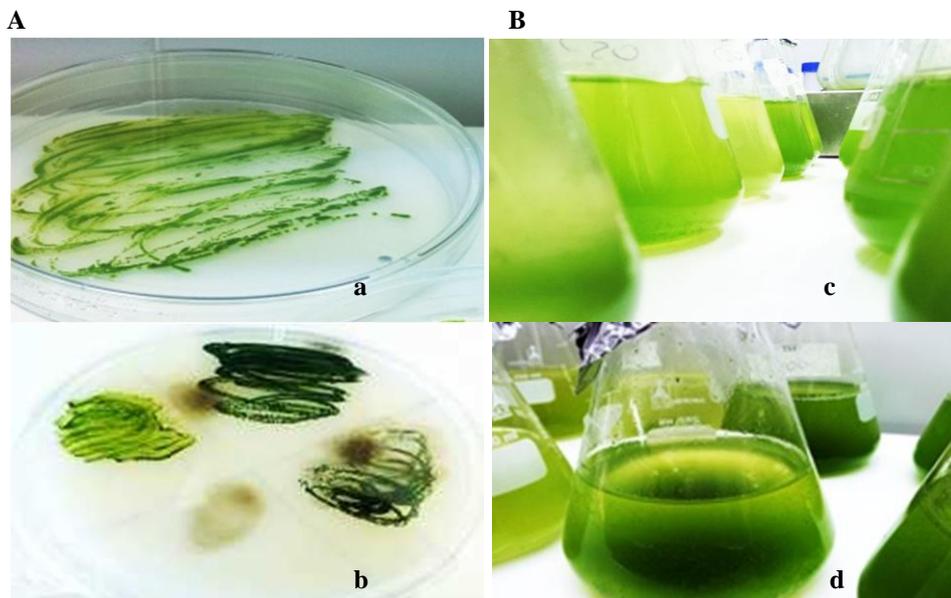


Figura 13: A: Inóculos en medio sólido RL-agar de las microalgas controles SX1 (a) y SO (b). B: Cultivo en medio líquido RL inoculado con la microalga SX1(c) y SO (d).

3.3. Cámaras de cultivo

Cámara de cultivo a 10° C

Los cultivos de masificación a 10 ± 2 °C se realizaron en una cámara fría Luxer2000, sin agitación. A cada matraz de cultivo se le acopló un sistema de aireación, capaz de suministrar la cantidad de $12,56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CO_2 de forma constante; Además, se acopló un sistema de radiación lumínica (80 Wm^2) bajo ciclos de noche/día con intervalos de 12/12 hrs.

Cámara de cultivo 20°C

Los cultivos de masificación a 20 ± 2 °C se realizaron en un laboratorio adaptado para cultivos fotosintéticos acondicionado con un sistema de climatización que mantuvo la temperatura de la zona constante. Se realizaron los cultivos en ausencia de agitación, y a cada matraz se le acopló un sistema de aireación responsable del suministro de CO_2 constante ($12,56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Al igual que en el caso de los cultivos a 10 ± 2 °C, en este caso se acopló un sistema de radiación lumínica (80 Wm^2) bajo ciclos de noche/día con intervalos de 12/12 hrs.

3.4. Medida de Nitrógeno y Fósforo

Con objeto de comprobar que las concentraciones reales de nutrientes de Nitrógeno y Fósforo en los medios de cultivo finales coincidían con las referencias bibliográficas teóricas establecidas, se procedió al análisis de las concentraciones iniciales de cada nutriente antes de iniciar los cultivos con las diferentes microalgas. El espectrofotómetro utilizado para todas las mediciones fue un UNICAM UV/VIS 5625 Crison.

Medida de Fósforo

108

La medida del ión ortofosfato se basó en la reacción en medio ácido de dicho ión con molibdato amónico y tartrato antimonil potásico capaz de formar un heteropoliácido el cual se reduce a azul de molibdeno (de color intenso) debido a la presencia de ácido ascórbico. Este compuesto presenta un máximo de absorción a 880 nm cumpliendo la *Ley de Lambert-Beer* en un amplio intervalo de concentraciones.

La metodología utilizada viene descrita en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1992 (4500-PE. Método del ácido Ascórbico). A las muestras a analizar se les realizaron diluciones apropiada con objeto de que las concentraciones a medir estuvieran en el intervalo de la recta de calibrado, previamente establecida (**Figura 14**).

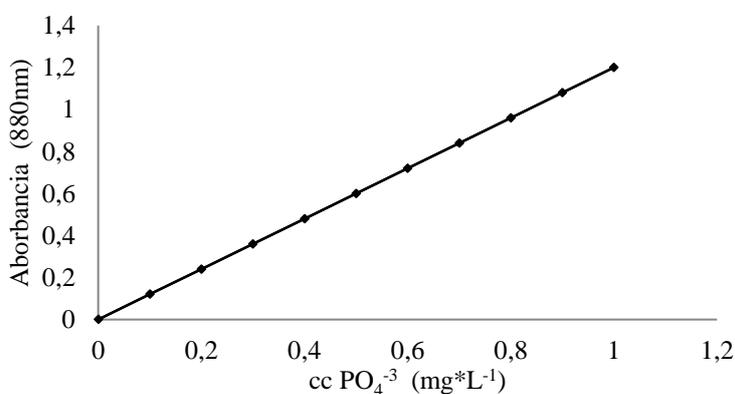


Figura 14: Curva de calibración para la obtención de concentración de PO_4^{-3} $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. $Y = 1,2X + 3-16$; $Y =$ concentración PO_4^{-3} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $X =$ Absorbancia (880nm).

Medida de Amonio

Para llevar a cabo la medida del ión amonio (NH_4^+) se utilizó el método de la *sal de fenol* (4500-NH3 D) descrito en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1992. Esta medida se basa en la reacción del ión amonio con hipoclorito/fenol catalizada por una sal manganosa, formando la sal de fenol, la cual presenta una máxima absorción a 560 nm.

| 109

Se realizaron medidas del ión amonio del medio sin células a diferentes diluciones. Para cada determinación se realizó el contraste con un blanco y una muestra patrón de acuerdo con la siguiente ecuación (*Ecuación 1*).

$$\text{Ecuación 1: } \text{NH}_4^+ (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (A \cdot B) / C \cdot S$$

donde,

A: Absorbancia de la muestra problema
B: Concentración conocida de muestra patrón = 10 mg
C: Absorbancia de la muestra patrón
S: Volumen muestra problema (L)

Medida de Nitrato

Para la medida del ión nitrato se utilizó el método descrito en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1992 (4500-NO3-B. Método Espectrométrico Ultravioleta Selectivo).

Con objeto de eliminar interferencia se realizó una medida del ión nitrato de las diferentes muestras a 220 nm seguida de otra segunda medida a 275 nm. La absorbancia final utilizada fue la obtenida de acuerdo a la *Ecuación 2*. Los resultados se expresaron de acuerdo a una recta de calibración con concentraciones conocidas de ión NO_3^- .

$$\text{Ecuación 2: } \text{Abs corregida} = \text{Abs}_{220} - \text{Abs}_{275}$$

Medida de Nitrito

| 110

Para la medida del ión nitrito se utilizó el método descrito en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1992 (4500-NO₂-B. Método Colorimétrico).

La medida de este ión se basa en la formación de un colorante Azo, púrpura rojizo, producido a pH ácido por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina, y cuya intensidad de color se mide a 543nm. La formación de este compuesto es proporcional a la cantidad de ión nitrito presente en la muestra.

3.5. Crecimiento celular

Calculo de la biomasa celular

Se estimó la concentración celular en los cultivos mediante la relación entre la Absorbancia de las muestras y el peso seco de células, expresando los resultados en mg de biomasa *L⁻¹. Mediante la realización de un espectro de absorción, barriendo las longitudes de onda desde los 380 a 750 nm sobre un cultivo de *Scenedesmus obliquus*, se pudo determinar varias zonas que delimitaban máximos y mínimos de absorbancia.

De acuerdo con los ensayos descritos por El Yousfi (1995) se decidió realizar las medidas a 560 nm correspondiente a la zona verde del espectro de luz. Las medidas a esta longitud de onda generaron un máximo de absorbancia en todas las etapas del cultivo microalgal. En los casos de suspensiones celulares con valores de absorbancias mayores de 0,4 se realizaron diluciones de las muestras con agua destilada.

El peso seco ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) expresado en mg de biomasa seca/L de suspensión, se relacionó con la absorbancia de la suspensión medida mediante una recta de calibrado (**Figura 15**), correspondiente a la relación entre la absorbancia de las diferentes suspensiones de volumen conocido, y el peso seco obtenido por centrifugación, lavado y posterior desecación a 105°C de dichas suspensiones hasta peso constante.

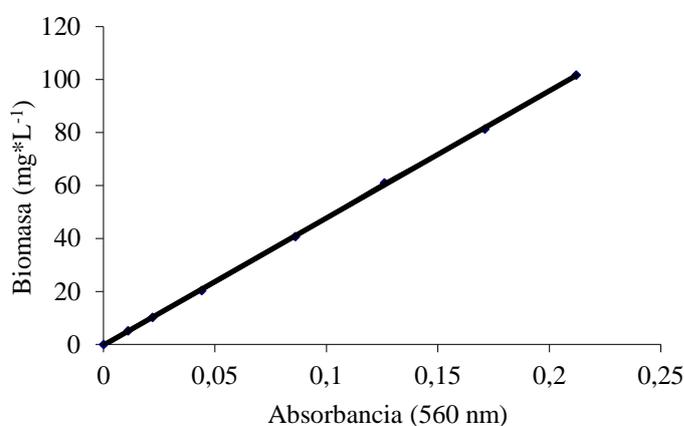


Figura 15: Recta de calibrado para el cálculo de la concentración de biomasa microalgal. $Y = 480,34x - 0,3156$. $Y = \text{Biomasa } (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$; $X = \text{Absorbancia a } 560 \text{ nm}$.

Seguidamente, se determinó la producción de biomasa en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de los cultivos en función del tiempo de acuerdo a la *Ecuación 3*.

$$\text{Ecuación 3: } P = (B_1 - B_0) * F_d$$

Donde,

P = Productividad en función del tiempo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

B₁ = Biomasa producida en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en un tiempo determinado o establecido para evaluar productividad en un litro, (24 hrs, 12 hrs, 2 hrs etc) en el que no se tiene en cuenta la acumulación en el tiempo.

B₀ = Biomasa producida en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en un tiempo anterior a B₁ determinado o establecido para evaluar productividad en un litro, (24 hrs, 12 hrs, 2 hrs etc) en el que no se tiene en cuenta la acumulación en el tiempo.

F_d = Factor de dilución, normalmente llevado a un litro.

Finalmente, mediante la *Ecuación 4* se estableció la velocidad a la que se produce una determinada cantidad de Biomasa por unidad de tiempo y por unidad de volumen, con objeto de estimar la eficacia de duplicación celular en el tiempo (Infante *et al.*, 2012).

| 112

$$\text{Ecuación 4: } \mu_{\max} = \frac{\ln(N_1 - N_0)}{T_1 - T_0}$$

Donde,

μ_{\max} = Velocidad de generación de Biomasa/Unidad de Tiempo
(horas)*Unidad de volumen de cultivo (L)

N_1 y N_0 = Biomasa en el tiempo 1 y 2 respectivamente

T_1 y T_0 = Tiempo de cultivo 1 y 2 respectivamente

4. Medio de cultivo y Estadística de superficie de respuesta (RSM)

La Metodología de Superficies de Respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos.

El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta.

Cuando decimos que el valor real esperado, η , que toma la variable de interés considerada está influido por los niveles de k factores cuantitativos, X_1, X_2, \dots, X_k , esto significa que existe alguna función de X_1, X_2, \dots, X_k (que se supone continua en $X_i, \forall i = 1, \dots, k$) que proporciona el correspondiente valor de η para alguna combinación dada de niveles: $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$ de tal forma que la variable respuesta puede expresarse como:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon$$

Donde ε es el error observado en la respuesta.

La relación $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$ existente entre η y los niveles de los k factores puede representarse a través de una hipersuperficie (subconjunto de un espacio euclídeo $(k+1)$ -dimensional) a la que llamaremos superficie de respuesta.

Una técnica utilizada para ayudar a visualizar la forma que puede tener una superficie de respuesta tridimensional consiste en representar la gráfica de contornos de la superficie, en la que se trazan las denominadas líneas de contorno, que son curvas correspondientes a valores constantes de la respuesta sobre el plano X_1X_2 (plano cuyos ejes coordenados vienen dados por los niveles X_1 y X_2 de los factores). Geométricamente, cada línea de contorno es una proyección sobre el plano X_1X_2 de una sección de la superficie de respuesta al intersecar con un plano paralelo al X_1X_2 .

La gráfica de contornos resulta útil para estudiar los niveles de los factores en los que se da un cambio en la forma o altura de la superficie de respuesta.

La forma de la función f que determina la relación entre los factores y la variable respuesta es, en general, desconocida, por lo que el primer objetivo de la RSM consiste en establecer experimentalmente una aproximación apropiada de la función f . Para ello, se propone un modelo de ecuación, generalmente polinómico, en los k factores X_1, X_2, \dots, X_k y se selecciona un conjunto de tratamientos sobre los que realizar las observaciones

experimentales, que se utilizarán tanto para obtener estimaciones de los coeficientes en el modelo propuesto (por ejemplo, a través del método de mínimos cuadrados) como para obtener una estimación de la variación del error experimental (para lo que es necesario tener al menos 2 observaciones por cada tratamiento).

Se realizan, entonces, contrastes sobre las estimaciones de los parámetros y sobre el ajuste del modelo y si el modelo se considera adecuado, puede utilizarse como función de aproximación. En tal caso, el estudio de la superficie de respuesta se hace en términos de la superficie ajustada, pues su análisis será aproximadamente equivalente al del sistema real.

Los polinomios usados más frecuentemente como funciones de aproximación son los de órdenes uno y dos, que nos proporcionan, respectivamente los siguientes modelos:

4.1. Hipótesis de Modelo de 1º Orden

Cuando no se tiene suficiente información acerca de la forma que presenta la superficie de respuesta, el primer intento de ajuste se hace, generalmente, aproximando a través de un modelo de primer orden.

| 115

La forma general de un modelo de primer orden con k factores, X_1, X_2, \dots, X_k , es:

Donde,

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon$$

Y = Variable de respuesta

$\beta_0 + \sum \beta_i X_i$ = Parámetros desconocidos

ε = error aleatorio

o, equivalentemente, en forma matricial: $Y = X \beta + \varepsilon$

Donde la matriz X puede escribirse alternativamente como $X = [1 : D]$, con D la matriz de combinaciones de niveles de los factores, denominada matriz de diseño.

Si la matriz X es de rango completo, entonces el estimador de β obtenido por el método de mínimos cuadrados es $b = (X' X)^{-1} X' Y$ (que es, de hecho, el mejor estimador lineal insesgado de β) y la matriz de varianzas-covarianzas de b viene dada por $\text{Var}(b) = (X' X)^{-1} \sigma^2$

El modelo de primer orden ajustado es, entonces:

$$\tilde{Y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i$$

Si el modelo está bien ajustado, la parte no aleatoria del modelo representa la respuesta real esperada y ε es el error experimental. Sin embargo, si el modelo no está ajustado a la función respuesta real, lo que ocurre cuando la relación entre la respuesta y

los factores está demasiado simplificada, ε contiene, además del error experimental, una parte de error no aleatorio que se debe a la falta de ajuste.

4.2. Hipótesis de Modelo de 2° Orden

Cuando existe curvatura en la superficie de respuesta, el modelo de primer orden no es una aproximación adecuada y es necesario utilizar un modelo que ajuste mejor. Se emplea entonces un modelo de segundo orden.

La forma general de un modelo de segundo orden con k factores, X_1, X_2, \dots, X_k es:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde,

Y = Variable de respuesta

$\beta_0 ; \sum \beta_i X_i ; \sum \beta_{ii} X_i^2 ; \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$ = Parámetros desconocidos

ε = Error aleatorio

De manera análoga a como se hizo para los modelos de primer orden se obtiene que el modelo ajustado de segundo orden es:

$$\tilde{Y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^k b_{ij} X_i X_j$$

4.3. Diseño experimental de superficie de respuesta

De cada uno de los ensayos realizados (**Tabla 22**) se obtuvo un resultado de biomasa ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) que se adjuntó al diseño experimental.

Tabla 22: Muestra esquema de experimentos a realizar con distintos medios de cultivo con la microalga SX1.

<i>Nº de ensayo</i>	A	B	C
1	7	15	50
2	8	15	50
3	11	20	100
4	6	15	50
5	2	10	20
6	1	10	20
7	9	15	50
8	4	10	50
9	3	20	20
10	10	10	100
11	5	10	50

A: Orden de realización; B: Temperatura del ensayo (°C);
C: Dilución del medio de cultivo (% p/v).

En el diseño de experimentos, se sortearon de forma aleatoria y con una finalidad de validación estadística, distintos experimentos variando factores como dilución y temperatura. Se puede observar que el programa incluyó una serie de ensayos a 15 °C, los cuales tienen como objetivo determinar el valor medio en que los errores y/o sesgos sean lo suficientemente significativos y así establecer una diferencia estadísticamente válida entre los valores de temperatura de 10°C y 20°C. Los resultados posteriormente expresados como biomasa en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ serán incluidos en el programa anteriormente mencionado y así obtener datos para obtener tabla de varianzas ANOVA y así validar estadísticamente los resultados.

5. Cultivo en masa con agua procedente de la laguna de *La Caldera*

Se tomaron 500 ml de agua de laguna a los que se le adicionaron los nutrientes previamente esterilizados por filtración a 0,22 μ ; la concentración final de nutrientes en el agua de la laguna era semejante a la del medio seleccionado (RLMo). Seguidamente se adicionó al biorreactor de acuerdo a las condiciones de dilución de los ensayos. El agua de laguna utilizada fue la recolectada en los diferentes muestreos realizados. Los ensayos de masificación posteriores se realizaron a 10°C y 20°C.

5.1. Verificación de concentración de nutrientes del medio RLMo

Con el fin de que las condiciones de masificación fuesen lo más semejantes posible en todos los ensayos, se realizó un análisis de comprobación de concentración inicial del inoculo nutritivo (de P y N) en cada uno de los cultivos realizados. (Tabla 23).

Tabla 23: Valores de concentración real de nutrientes en el medio de cultivo de masificación utilizando agua de la laguna de los diferentes muestreos. Valores teóricos de N: 40,1 mg*L⁻¹ y P: 17 mg*L⁻¹.

Análisis	Muestreo	Concentración real ^a	
		N	P
1	2-7-20109	43,2±2,1	18,5±0,5
2	30-8-2009	44,7±1,9	18,4±0,4
3	7-7-2010	40,4±2,9	18,2±0,5
4	30-8-2010	43,7±1,2	18,0±0,6
5	3-7-2011	45,2±1,7	18,8±0,6
6	29-8-2011	40,3±2,9	18,2±0,7

a: mg*L⁻¹

5.2. Toma de muestras de cultivos enriquecidos y Aislamiento

Dado el carácter dinámico y competitivo de las microalgas, para el aislamiento del mayor número posible de estos microorganismos se hizo necesario un método de aislamiento mediante dilución seriada a diferentes tiempos de cultivo durante 3 meses en función de la turbidez alcanzada en dichos cultivos (medida de D.O. a 560 nm). (Figura 16). Por cada aumento de 0,05 de Absorbancia se realizaron siembras en medio sólido con objeto de poder seguir la evolución de los cultivos y poder discriminar el número y cantidad de cada especie de microalga. El traspaso a medio sólido se realizó mediante siembra en estrías, incubándose en idénticas condiciones a los medios líquidos. Los medios sólidos utilizados presentaban la misma composición que los medios líquidos de procedencia añadiendo la cantidad necesaria de agar. En casos necesarios, se realizaron diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 con objeto de lograr un mejor aislamiento. Las placas se incubaron sobre una superficie blanca y con irradiación constante (80 W/m²).



Figura 16: Muestra cultivos de masificación en cámara de cultivo a 10°C en medio RLMO.

6. Identificación genética

6.1. Análisis filogenético

Para el análisis filogenético de los aislamientos microalgales obtenidos a lo largo del estudio, se llevó a cabo la amplificación parcial de los genes codificantes de los ARNr 16S y 18S ARNr respectivamente, de cada uno de ellos. Posteriormente, los fragmentos amplificados se secuenciaron, y las secuencias se compararon con las depositadas en las bases de datos EMBL y Genebank, con objeto de determinar su proximidad filogenética con la de especies bacterianas conocidas.

Para el análisis filogenético de las microalgas aisladas de la laguna de La Caldera, se llevó a cabo la amplificación parcial de los genes codificantes ARNr 16S y ARNr 18S. Posteriormente, los fragmentos amplificados se secuenciaron, y las secuencias se compararon con las depositadas en las bases de datos EMBL y Genebank, con objeto de determinar su proximidad filogenética con otras especies de microalgas.

6.2. Extracción de ADN y amplificación del rRNA 16S

Cada uno de las microalgas aisladas se sembraron durante un periodo no superior a 12 h. El método de extracción del DNA se realizó de acuerdo a Pozo *et al.*, 2002.

Para la amplificación parcial del gen codificante del ARNr 16S se utilizaron los cebadores universales para el Dominio Bacteria fD1 y rD1 (Sigma-Genosis, Reino Unido) descritos por Weisburg *et al.*, 1991, y cuya secuencia se indica en la (Tabla 24). Los cebadores amplifican casi la práctica totalidad del gen del ARNr 16S. La amplificación se realizó empleando como molde 4µl de sobrenadante de los lisados, al que se añadieron 46 µl de una mezcla de reacción para PCR, consistente en: AmpliTaq-Gold Buffer de reacción 10x (Applied Biosystems, Alemania), 5 µl; MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystems, Alemania), 3 µl, (concentración final 1,5 µM); mezcla de dNTPs (Mbl, España), 1µl (concentración final 200 µM de cada nucleótido); seroalbúmina bobina (10 mg*ml⁻¹, New England Biolabs, Reino Unido), 1 µl (concentración final, 0,2 µg/µl); Dimetilsulfóxido (Sigma), 2,5 µl (5%); 20 pmol de cada cebador, y 1 U de AmpliTaq-Gold hot-start polimerasa (Applied Biosystems, Alemania). La reacción se llevó a cabo en un termociclador BIOER XP-Cycler. El perfil de temperaturas fue el descrito previamente por Vinuesa *et al.*, 1998, a excepción del paso de desnaturalización inicial, que se aumentó hasta una duración de 7 minutos por requerimiento de la polimerasa empleada.

Tabla 24: Cebadores rRNA 16S

	Secuencia* (5'→3')	Numeración	Referencia
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	Qiu <i>et al.</i> , 2012
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	1541-1525	Gupta <i>et al.</i> , 2012

La extracción de ADN de microalgas se llevo a cabo mediante la técnica de rotura celular (Doyle *and* Doyle, 1990) dejando libre el ADN.

Lavado de las células:

Se seleccionaron colonias puras de microalgas, se resuspendieron en solución salina al 3%, p/v y se centrifugaron a 3.000 rpm. Este procedimiento se repitió 3 veces con la finalidad de disolver en agua y poder retirar todos los exopolisacáridos producidos por las microalgas durante el cultivo.

Extracción de DNA:

Tras el lavado celular, se procedió a la extracción del DNA mediante adición de la solución de lisis (PVPP 10% y proteinasa K $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); seguidamente se incubó a 56°C en una placa calefactora BIOER Mixing MB-102, durante un tiempo aproximado de 4 horas. Una vez realizada la lisis, se procedió a realizar la extracción y purificación mediante la *Técnica del Cloroformo: Fenol* (Nishiguchi *et al.*, 2002) que consiste en:

- a.** Adición de un volumen igual a la muestra lisada de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (proporción 25:24:1) y centrifugación a 14.000 rpm durante 15min.
- b.** Traspaso la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
- c.** Adición de un volumen igual a la muestra lisada de cloroformo-álcool isoamílico (proporción 24:1) y centrifugación a 14.000 rpm durante 15min.
- d.** Traspaso de la fase acuosa superior a un nuevo tubo, adición de 2,5 volúmenes de etanol frío al 95%, p/v y almacenamiento durante 4 hrs a -20°C .
- e.** Centrifugación a 14000 rpm y eliminación del sobrenadante
- d.** Secado del pellet a temperatura ambiente
- f.** Suspensión en buffer Tris HCl 10mM + EDTA 1mM (pH 8,0)

Amplificación gen 18s rDNA

122 El ADN extraído fue utilizado como molde para la amplificación del gen 18S ribosomal con los cebadores universales para eucariotas EukA y EukB (Sigma-Genosis, Reino Unido) (**Tabla 25**). La amplificación se realizó empleando como molde 2 µl de sobrenadante de los lisados al que se añadieron 48 µl de una mezcla de reacción para PCR consistente en: 5 µl Buffer 10x (Applied Biosystems, Alemania); 5 µl de MgCl₂ 25mM (Applied Biosystems, Alemania), 3 µl, (concentración final 1,5 µM); mezcla de dNTPs (Mbl, España), 1µl (concentración final 200 µM de cada nucleótido); 1 µl (concentración final, 0,2 µg/µl) de Dimetilsulfóxido (Sigma), y 0.5 µl Taq polimerasa (MBL España). La reacción se llevó a cabo en un termociclador BIOER XP-Cycler.

Tabla 25: Cebadores rRNA 18S

	Secuencia* (5'→3')	Numeración	Referencia
EukA	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	1-21	Massana <i>et al.</i> , 1997
EukB	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	1795 -1772	Díaz <i>et al.</i> , 2001

El programa de PCR utilizado:

- a) Desnaturalización inicial a 94°C/130 sg
- b) 35 ciclos de 94 °C de 30 sg/cada ciclo
- c) Alineación 56 °C/45sg
- d) Extensión 72 °C/130 sg.

El ciclo se repitió 30 veces.

6.4.- Purificación y secuenciación

Una vez obtenido los genes amplificados estos fueron comprobados en un gel de agarosa al 0.7% (p/v) y las bandas del tamaño esperado (aproximadamente 1,5 Kb) fueron purificadas utilizando el kit Qiaquick II (Quiagen, Germany).

| 123

La secuenciación de ADN de doble cadena fue efectuada por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra (Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada) mediante el método de los terminadores marcados con fluorocromos, usando el kit ABI-PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Alemania) y un secuenciador automático Applied Biosystems 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Alemania).

6.5. Análisis informático de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos

Los datos de secuencia de ADN obtenidos fueron analizados mediante el programa informático de libre distribución Chromas v. 1.51. mediante herramientas de computación disponibles en el servidor web de libre acceso del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>).

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias conocidas archivadas en las base de datos EMBL y GeneBank. Para llevar a cabo los alineamientos de las secuencias, se empleó el programa Clustal X2 (Jeanmougin *et al.*, 1998) empleando los parámetros por defecto. El cálculo de las matrices de distancia entre las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método Neighbour-Joining (Saitou *and* Nei, 1987) se realizó con el software de libre distribución MEGA4 (Kumar *et al.*, 2001). En el árbol filogenético se tomó como criterio la no inclusión de los huecos (gaps) del alineamiento. Los valores de confianza se calcularon mediante el método de muestreo

con reemplazamiento (Método Bootstrap) (Felsenstein, 1985), y los porcentajes superiores al 50% fueron los utilizados para la construcción de los árboles correspondientes.

7. Cultivos individuales de microalgas aisladas

7.1. Preparación de inóculos de microalgas

Se realizaron cultivos individuales de cada microalga aislada con la finalidad de evaluar la cinética de crecimiento de las microalgas de forma individual en diferentes condiciones y medios de cultivo. Las siembras se realizaron en paralelo en idénticas condiciones con objeto de obtener células de mismo tiempo de cultivo.

Procedimiento:

a. Precultivo en medio sólido mediante la técnica de siembra en zigzag de las cepas previamente aisladas a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Las siembras se realizaron en medio RLMo (4-5 placas) y finalmente se incubó a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante una semana bajo radiación lumínica constante.

b. Una vez finalizado el precultivo, las células se recolectaron en agua destilada estéril, obteniendo un concentrado.

La concentración final utilizada para la siembra en los biorreactores fue de $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

7.2. Cultivos de masificación individual

Diseño de cultivos individuales

Para evaluar el crecimiento celular de las cepas aisladas, se realizaron ensayos en el medio RLMO a tres concentraciones diferentes (20%, 50% y 100%, p/v) y a 10°C y 20°C. Las condiciones de cultivo se describen en la **Tabla 26**.

| 125

Tabla 26: Condiciones generales de cultivo para las microalgas de estudio

<i>Factor de cultivo</i>	
Radiación lumínica	80 W*m ⁻²
Ciclo Luz/Oscuridad	12/12
Agitación	Sin agitación
Temperatura	10 y 20°C
Volumen final	500 ml
Inoculo (mg*L ⁻¹)	15-20
Aireación	Constante

Con la finalidad de obtener resultados fiables y concluyentes en función de los nutrientes presentes en el medio de cultivo RLMO se realizó una comparativa de la concentración teórica y real de Nitrógeno y Fósforo de cada uno de los ensayos realizados (**Tabla 27**):

Tabla 27: Valores de concentración real de nutrientes en el medio de cultivo de masificación RLMO (100%, p/v) para las diferentes microalgas. Valores teóricos de N: 40,1 mg*L⁻¹ y P: 17,9 mg*L⁻¹.

<i>Microalgas</i>	<i>Concentración real^a</i>	
	<i>N</i>	<i>P</i>
S3	39,5±0,9	18,6±0,5
S21	39,4±1	17,4±0,5
S121	38,5±0,7	18,2±0,6
S41	40,5±0,8	18,2±0,7
S120	39,3±0,9	18,1±0,7
S91	40,6±1	18,6±1
S117	37,4±1	19,0±0,7
S81	40,2±1,1	18,1±0,9
S62	40,6±1,2	18,4±0,9
S101	42,6±0,9	18,4±0,9
S84	38,9±0,8	16,8±0,8

a: mg*L⁻¹

8. Estudio de lípidos totales de cultivos individuales

Para la extracción de lípidos totales a partir de la biomasa liofilizada obtenida de los cultivos individuales, se utilizó el método del Hexano/Isopropanol descrito por Hara *et al.*, 1978; Burton *et al.*, 1985; LEE *et al.*, 1996. Seguidamente se determinaron los lípidos totales mediante gravimetría. La cantidad de lípidos en porcentaje se obtuvo por diferencia entre el peso de la biomasa liofilizada y los extractos lipídicos secos.



Fig 17: Extracción de lípidos totales, con metodología Hexano/Isopropanol.

Metodología

- A 3g de muestra liofilizada se le adicionó 30 ml de una solución Hexano/Isopropanol en proporción 3:2. (**Figura 17**)
- Agitación a 100 rpm en P- Selecta ROTABIT, durante 24h a 20°C en tubos cerrados herméticamente
- Recolección de la fase apolar y posterior filtración utilizando un cono de tamaño de poro de 1 μ m con objeto de separar completamente la biomasa
- Repetición de la fase a. sobre la biomasa separada
- Recolección de ambos extractos
- Eliminación de los disolventes mediante rotavaporación
- Medida del peso seco

Parámetros generales de cultivo

Para determinar las condiciones de cultivo óptimas para el crecimiento de la microalga seleccionada S21, se realizaron cultivos con el medio RLMo diluido al 20% (p/v), 50% (p/v), y sin diluir (100%, p/v); los ensayos se realizaron en matraces de 500mL a diferentes temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C, bajo ciclo de luz/noche 12/12 y aireación constante. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las descritas en la **Tabla 26**. Exceptuando las temperaturas de cultivo ya mencionadas.

Se realizaron ensayos de cinética de crecimiento y se compararon con los valores máximos de producción de biomasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a cada temperatura y condición de medio de cultivo. Además se realizó una comprobación de las concentraciones teóricas de nitrógeno y fósforo ($41,1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $17,9\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente) con los valores reales en la preparación de los medios de cultivo ($38.2\pm 0.9\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $17\pm 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente).

8.1.2.- Reactores y condiciones de cultivo

Para la realización de los ensayos de masificación individual se utilizaron matraces 500 mL a los que se les adicionó 250 ml de agua destilada estéril y los nutrientes previamente filtrados por $0,22\ \mu\text{m}$. Las condiciones de cultivos fueron similares a las descritas en la **Tabla 26**.

Cinética de cultivos

Para la evaluación de la cinética se utilizaron los procedimientos descritos en el **Apartado 4**; midiéndose la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro Unicam 5625 UV/VIS ATI cada 24 horas de cultivo durante 20 días.

Recolección de biomasa

Tras alcanzar la fase estacionaria de los cultivos individuales a los 15-20 días, se procedió a separar la biomasa del medio líquido mediante centrifugación a $20^\circ\text{C}/4000\text{ rpm}$ (Thermo Scientific SL 16R) en tubos falcon de 50 ml. Posteriormente, se liofilizó (Liofilizador LABCONCO Free Zone 6) y se determinó la cantidad de biomasa por gravimetría.

8.2. Parámetros físico-químicos, Medida de pH y conductividad

Medida de pH

| 128

Con objeto de controlar los posibles cambios de pH a lo largo de los 20 días de cultivo, se midió dicho parámetro a diario utilizando un pHmetro (CRISON Basic 20) acoplado a un electrodo Ag/AgCl.

Medida de Conductividad

Con objeto de asegurar que el agua tenía las condiciones de conductividad idóneas para la preparación de medios de cultivo (<5 mS; FAO), se midió la conductividad del agua cada vez que se preparó medio de cultivo, con un conductivímetro Crison EC-Meter Basic 30+.

9. Estudios fisiológicos de microalgas por Citometría de Flujo

La Citometría de Flujo es un método analítico que permite la medida rápida de determinadas características físico-químicas de células procariontes y eucariontes que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad estructural y, por supuesto, cualquier componente celular o función que pueda ser marcado o estimado con un determinado fluorocromo (Barrera *et al.*, 2004). Cada fluorocromo tiene un espectro de excitación y emisión característico; si se utilizan dos con el mismo espectro de excitación pero distinto espectro de emisión, se pueden medir dos características al mismo tiempo (fluorescencia de dos colores).

Los análisis llevados a cabo en nuestros ensayos se realizaron en un equipo FACS CANTO II (Becton-Dickson) equipado con: a) laser ultravioleta, b) laser a 488 nm, y c) laser a 625 nm. Detector de Forward-Scater; detector de Side-Scater y ocho detectores de fluorescencia. Este equipo se encuentra ubicado en el Servicio de Biología Fundamental del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC).

9.1. Preparación de las muestras

Para evaluar el efecto de la radiación lumínica (luz), temperatura y dilución del medio de cultivo sobre el estado fisiológico de la cepa microalgal S21, aislada de laguna de *La Caldera*, se realizaron cultivos por triplicado con diferentes radiaciones lumínicas ($26,8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ y $80,3 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ y a temperaturas de 10°C y 20°C) en el medio RLMO diluido al 20% y 50%, p/v, durante 15 días. Las medidas de radiación lumínica luz se realizaron con un luxómetro en $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ (Kfm-1100 . Kenko).

Previamente, se realizó el preinoculo de la microalga S21 en medio RLMO sólido sin diluir (100% de cc de nutrientes) durante 7 días con objeto de obtener células jóvenes y viables. Estas células fueron utilizadas para los ensayos de preparación anteriormente descritos en aireación constante y ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Se analizaron 3 réplicas de cada ensayo.

9.2. Viabilidad Celular Total

Utilizando la técnica de conjugación con fluorocromos, las células expuestas a las soluciones de DAF (Diacetato de Fluoresceína) y IP (Ioduro de Propidio) dan información del porcentaje de viabilidad celular; (Xi Xiao *et al.*, 2011). Mediante transporte activo, el fluorocromo DAF se introduce en las células viables; tras ser transformado el fluorocromo por las esterasas de membrana se obtiene una forma fluorescente de fluoresceína capaz de emitir fluorescencia a 530 nm, indicando que las células poseen su capacidad de homeostasis intacta. Por el contrario, en caso de membranas dañadas, el IP

difunde de modo pasivo al interior, uniéndose de modo específico a los ácidos nucleicos (emisión de fluorescencia a 585 nm y 510 nm), Este método nos permitió diferenciar poblaciones de células viables frente a no viables, procedentes de los cultivos celulares.

| 130

Para la realización de nuestros ensayos se ha utilizado la metodología descrita por Juárez-Jiménez *et al.*, 2010 para cultivos bacterianos.

Metodología

La viabilidad se midió utilizando la técnica descrita por Cid *et al.*, 1999 utilizando la mezcla de fluorocromos Ioduro de Propidio (IP) y Acetato de Fluoresceína (DAF). Previo al análisis citométrico se obtuvieron muestras de S21 provenientes de los cultivos con diferentes condiciones de cultivo y se incubaron con 20 nM de DAF y 20 nM de IP a 25°C en oscuridad durante 15 minutos. Por cada muestra se leyeron aleatoriamente 10.000 células. Los ensayos se realizaron en medio RLMo y a 10±2°C y 20±2°C. (**Figura 16**).

9.3. Polarización de membrana mitocondrial

Los estudios de actividad metabólica se realizaron mediante análisis de polarización de membrana mitocondrial.

Las mitocondrias tienen un tamaño variable entre 0,1µm y 0,5µm de diámetro y pueden alcanzar una longitud máxima de 7µm, sin embargo estas dimensiones dependen de la actividad metabólica y del tipo de célula. La energía que se obtiene a través de la transferencia de electrones a lo largo de la cadena transportadora es usada para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio de intermembrana, creando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial). Este gradiente de protones permite a la

ATP sintasa utilizar el flujo de H⁺ generados para producir ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico. (Sanchez *et al.*, 2008).

Se ha demostrado la eficacia de las técnicas de citometría de flujo para evaluar el potencial de membrana utilizando fluorocromos lipofílicos (Shapiro *et al.*, 1979). Si la célula se encuentra activa y fisiológicamente estable, la membrana mitocondrial se encontrará polarizada, permitiendo al fluorocromo ingresar al interior de la célula, produciendo una emisión de fluorescencia a una longitud de onda cercana a los 525 nm, por el contrario, un descenso de la fluorescencia del fluorocromo indica una despolarización de membrana.

Metodología

El potencial de membrana ($\Delta\Psi$) mitocondrial se midió utilizando la técnica descrita por Ortega, 2002. Para las diferentes poblaciones celulares se utilizó el fluorocromo catiónico lipofílico DiOC₆ (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide). Este fluorocromo entra en los sistemas membranosos acumulándose en las mitocondrias, siendo la intensidad de fluorescencia emitida directamente proporcional a la diferencia de potencial entre el interior y exterior de las membranas, y por tanto a la actividad metabólica. (Reis *et al.* 2005; Lopes da Silva *et al.* 2005; Juárez-Jiménez *et al.*, 2010). Los ensayos se realizaron en medio RLMo y a 10±2°C y 20±2°C. (**Figura 18**).

Previo al análisis, se obtuvieron muestras de S21 provenientes de los cultivos con diferentes condiciones de cultivo y se incubaron con 40 mM DiOC₆ a 25°C durante 15 minutos, midiéndose posteriormente la fluorescencia de DiOC₆ a 525 nm.

9.4. Estudio de Lípidos neutros y polares

| 132

El fluorocromo Rojo Nilo (9 dietilamino 5H-benzo a fenoxacin 5-ona), es un colorante hidrofóbico que emite: a) fluorescencia amarilla (560–640nm) cuando se disuelve en lípidos de naturaleza neutra tales como los triglicéridos, y b) fluorescencia roja (>650nm) cuando se disuelve en lípidos de naturaleza anfipática (lípidos de membrana) (Teruel, 1996).

Metodología

En nuestros ensayos, el contenido de lípidos totales se midió, tiñendo las células según la metodología descrita por Jara *et al.*, 2003. Se preparó una solución madre de Rojo Nilo de 15 mM en acetona y se adicionaron 50 µL (0,1 mg*L⁻¹) a 4 ml de muestra de la microalga S21 procedentes de los diferentes cultivos y se incubaron durante 10 minutos a oscuridad. Por cada muestra se leyeron aleatoriamente 10.000 células. Los ensayos se realizaron en medio RLMO y a 10±2°C y 20±2°C. (Figura 18).

10. Análisis cualitativo/cuantitativo del contenido en ácidos grasos mediante GC/MS



Figura 18: Diseño del ensayo para el análisis de la Viabilidad celular, Polarización de membrana y cantidad de lípidos acumulada.

Extracción de ácidos grasos y silanización de las muestras

La extracción de ácidos grasos a partir de las matrices celulares se realizó de acuerdo al **Apartado 8**.

Una vez extraídos los ácidos grasos de las diferentes muestras se silanizaron con BSTFA (N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida) (Fluka), a razón de 75 μ l BSTFA/ 20 μ l muestra. De cada muestra silanizada se analizaron 5 μ l.

Análisis de GC/MS

La GC es una técnica separativa que tiene la característica de conseguir la separación de mezclas complejas, pero que una vez separados e incluso cuantificados todos los componentes de una mezcla, el único dato de que dispondremos para la identificación será el tiempo de retención de las correspondientes señales cromatográficas. Esta técnica es muy utilizada como sistema de introducción de muestra previa a la Espectrometría de Masas. Puede considerarse como casi imprescindible en análisis de mezclas orgánicas relativamente volátiles (Esteban, 1993). Para conseguir una identificación inequívoca de un compuesto presente en una mezcla, se necesitarán más datos que serán los que proporcione la Espectrometría de Masas.

Los primeros estudios que dieron origen a la Espectrometría de Masas se deben a J.J. Thomson, quien en 1912 investigó las propiedades de los "rayos positivos" (citado en Esteban, 1993). Por tanto, la Espectrometría de Masas no es una técnica reciente, aunque sí lo es la aplicación rutinaria que de ella se hace hoy día, gracias a los avances y perfeccionamiento que se han conseguido, así como su combinación con equipos cromatográficos tanto líquidos como de gases. Ventajas de la MS: capacidad de identificación, es cuantitativa y cualitativa, permite analizar mezclas complejas, alta sensibilidad, es universal y específica, proporciona información estructural e isomérica de las moléculas analizadas. Para el acoplamiento entre estas dos técnicas se tiene en cuenta que el efluente que emerge de las columnas capilares, lo hace a presión

atmosférica, y debe ser conducido al interior del espectrómetro de masas donde se trabaja a vacío. Para ello, se utiliza un sistema de acoplamiento basado en la reducción de diámetro del capilar que entra al espectrómetro de masas.

| 134

Equipo de GC/MS utilizado:

A. Cromatógrafo de Gases: Modelo: HEWLETT PACKARD HP 6890 Series GS System. Inyector automático capilar Split/Splitless acoplado al sistema. Columna 007 Methyl 5% Phenyl silicone (30m x 0,25 mm ID)

B. Espectrómetro de Masas: Modelo: HEWLETT PACKARD HP 5973 MassSelective Detector Cuadrupolo recubierto de oro. Rango de Masas 0-800 umas.

C. Interfase acoplado al sistema.

D. Sistema informático acoplado al sistema

Condiciones de trabajo

Las condiciones de trabajo para el estudio de ácidos grasos procedentes de nuestras microalgales fueron similares a las descritas por Juárez *et al.*, 2002 para ácidos grasos procedentes de matrices oleosas (**Tabla 29**).

Tabla 29: Condiciones de trabajo en GC/MS para la identificación de ácidos grasos obtenidos a partir de microalgas.

<u>Cromatógrafo de gases</u>	<u>Parámetro</u>
Columna CG	Flujo 1 ml/min Gas portador: Helio Volumen inyección: 5 µl
Horno del Cromatógrafo	Inicial 80°C
Inyector (modo split)	250°C
Rampa de temperatura	1. Inicial 80°C 2. 5°C/min hasta 220°C 3. 10°C/min hasta 310°C
Tiempo final de cromatografía	47 min
<u>Interfase</u>	
Temperatura	280°C
<u>Espectrómetro de Masas</u>	
Calibración	Por ensayo
Fuente de ionización	0-70eV
Rango de Masas	0-400 uma
Tratamiento de resultados	Espectroteca Wiley275

Identificación de ácidos grasos

La identificación de los ácidos grasos se realizó de acuerdo a patrones comerciales (Fluka). Estos patrones fueron previamente analizados bajo las mismas condiciones que nuestras muestras de estudio (**Tabla 30**) (**Figura 19**).

Tabla 30: Ácidos grasos comerciales utilizados como patrones.

<i>Ácidos grasos</i>	<i>Tr</i>
Mirístico	15,60
Palmitico	19,21
Margarico	20,01
Estearico	22,72
Oleico	22,94
Linoleico	23,55

tR: tiempo de retención (min)

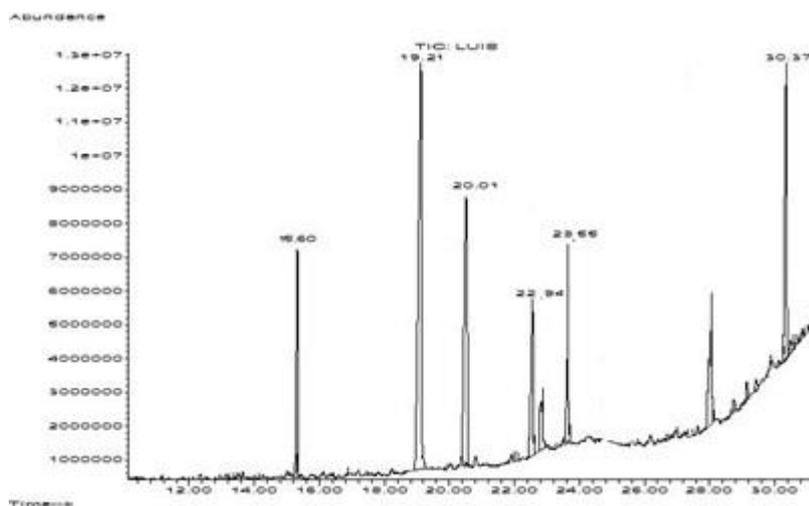


Figura 19.- Cromatograma de los patrones comerciales de ácidos grasos esenciales

IV. RESULTADOS

1.- Selección medio de cultivo.

1.1. Cultivos a 10°C y 20C en medios de cultivos RL, GL y RLMo con microalgas control SX1 y *Scenedesmus Obliquus*

Las **Figura 20A, B y C** representan el efecto de la dilución de los medios de cultivo RL, RLMo y GL sobre el crecimiento de la microalga SX1 a 10° C; esta microalga fue aislada de las aguas de lavado de las aceitunas a 12° C y presenta un 99% de similitud filogenética con *Chlorella vulgaris* de acuerdo con la base de datos EMBL y GeneBank. En todos los casos se observó que la microalga SX1 fue capaz de crecer a las tres diluciones del medio ensayadas; por otro lado, se aprecia que los valores de producción de biomasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) más bajos se obtuvieron en los medios de cultivo al 20% dilución.

Los mejores resultados en relación a la producción de biomasa se obtuvieron en el medio de cultivo RLMo a diferentes diluciones (20%, 50% y sin diluir, 100% p/v), en comparación con los otros dos medios de cultivo ensayados. Cuando los ensayos se realizaron en este medio de cultivo se obtuvieron valores de biomasa de $656,15\pm 30,19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $572,89\pm 14,36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en cultivos al 50 % y sin diluir, respectivamente. En el caso de los cultivos con medio RL, la producción máxima de biomasa fue del $415,98\pm 19,68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (en medio al 50%, p/v) y obteniéndose un 31,8% menos cuando se utilizó el mismo medio sin diluir. Por otro, lado los valores de biomasa obtenidos con el medio ensayado GL, no superaron los $238,73\pm 2,95 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, obteniéndose en este medio el valor de biomasa más bajo ($144,59\pm 5,73 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) es decir cuando se ensayó a 10°C y 20%, p/v. Cabe destacar que para los medios RL y GL, los mejores resultados se obtuvieron cuando se ensayaron al 50% de dilución.

Además, en los ensayos con esta microalga y a esta temperatura se pudo observar una fase lag de crecimiento que se prolongó hasta las 36 horas aproximadamente en todas las diluciones ensayadas para seguidamente dar comienzo a la fase de crecimiento exponencial; Esta fase exponencial se detectó en todos ensayos realizados con el medio RLMo, y de forma más leve

en los ensayos realizados con los medios RL y GL; En estos medios al 20% p/v y sin diluir no se apreció una diferencia significativa entre la fase exponencial de crecimiento y la fase estacionaria.

| 138

Por otro lado, se puede observar que en los ensayos con el medio RLMO, la fase estacionaria de crecimiento comenzó a las 96 horas de ensayo, sin embargo en los ensayos diluidos al 20% Y 50% , fase de crecimiento estacionaria comenzó, a partir de las 120 horas de cultivo

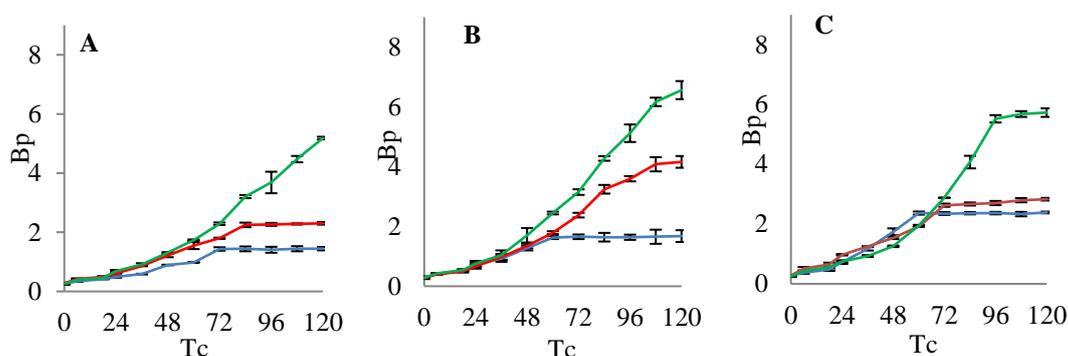


Figura 20: Producción de Biomasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) medida a 560 nm de la microalga SX1 con diferentes medios de cultivo a diferentes concentraciones y a 10°C de incubación. Medio de cultivo GL (línea azul); RL (línea roja); RLMO (línea verde). Las gráficas A, B y C corresponden a los ensayos con medios de cultivo diluido al 20%, 50% (p/v) y sin diluir respectivamente. Donde **Bp** en Eje vertical representa Biomasa producida $\times 100$ en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

1.2. Cultivos a 10°C con medios RL, GL y RLMO de microalga *Scendesmus obliquus*

En las Figura **21A, B y C** se representa el efecto de la dilución de los medios ensayados sobre el crecimiento de la microalga *Scendesmus obliquus* CCAP 276/3A suministrada por “Culture Centre for Algae and Protozoa”, Oban (Reino Unido) cuya T^a óptima de crecimiento es de 23°C . En todos los ensayos se observa que la microalga es capaz de crecer en los tres medios de cultivo y en las tres diluciones ensayadas.

En general se observó que hubo mejores valores de producción de biomasa en los ensayos realizados sin dilución, obteniéndose siempre sobre un 30- 40 % más en los tres medios de cultivos ensayados con esta microalga. El valor máximo de producción de biomasa con el medio RLMo sin diluir fue de $480,02 \pm 9,29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ seguido de $460,81 \pm 4,49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cuando el mismo medio se ensayó al 50% p/v. De igual modo, se aprecia que los valores más bajos de biomasa producida se obtuvieron en los medios GL, RL y RLMo diluidos al 20% p/v ($251,06 \pm 11,77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $310,30 \pm 16,35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $311,91 \pm 0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente).

El comportamiento de crecimiento de la microalga *Scendesmus obliquus* fue muy similar en los medios RL y RLMo, sin embargo con el medio GL la producción de biomasa fue de un 20-30% menor. Se detectó una mayor diferencia en producción de biomasa con los medios de cultivo ensayados al 50 % de dilución, apreciándose una diferencia de hasta un 28 % menos de biomasa con el medio GL, en comparación con la biomasa producida con el medio de cultivo RLMo.

Se puede observar una fase lag solo en las diluciones de 50% y sin diluir, en los tres medios ensayados, sin embargo cuando se ensayó solo con un 20% de los nutrientes de cada medio de cultivo, se pudo detectar una fase lag en las primeras 24 horas.

En las diluciones al 20% y 50% del medio GL, la fase de crecimiento estacionaria comenzó tras 60 horas de cultivo, sin embargo para los dos medios de cultivo restantes, esta fase comenzó a partir de las 100 horas de cultivo.

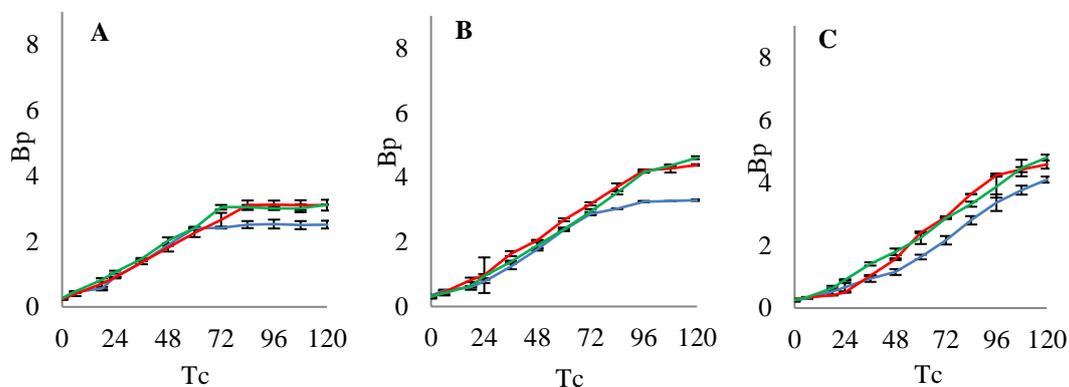


Figura 21: Producción de Biomasa ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) medida a 560 nm de la microalga *Scendesmus obliquus* con diferentes medios de cultivo a diferentes concentraciones y a 10°C de incubación. Medio de cultivo GL (línea azul); RL (línea roja); RLMo (línea verde). Las gráficas A, B y C corresponden a los ensayos con medios de cultivo diluido al 20%, 50% (p/v) y sin diluir respectivamente. Donde **Bp** en Eje vertical representa Biomasa producida $\times 100$ en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

En las **Figura 22A, B y C**, se representa el efecto de la dilución de los medios ensayados RLMo, RL y GL sobre el crecimiento de la microalga SX1 a 20° C. En todos los ensayos, se observa que la microalga SX1 es capaz de crecer a 20°C y que proliferó en los tres medios de cultivo y las tres diluciones ensayadas. En los cultivos realizados en medio RLMo a diferentes diluciones (20%, 50% y sin diluir, 100% p/v) se pudo observar los mayores valores de producción de biomasa, obteniéndose valores de $603,31 \pm 17,87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ sin dilución, seguido de $532,86 \pm 4,49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ al 50% de dilución.

Si bien con este medio se obtuvo la mayor producción de biomasa con el medio sin diluir, no fue así con los demás medios ensayados, es decir, en los medios GL y RL, la mayor producción de biomasa se produjo en los medios al 50% p/v de nutrientes. En el caso del medio RL, tanto al 20% y 50 % se obtuvieron valores más altos que con el medio sin diluir; Así, al 20% p/v se obtuvo un 15% más de biomasa que cuando se realizó el mismo ensayo con el medio sin diluir. A 20°C se obtuvieron valores bajos de producción de biomasa, llegando a obtener valores de $163,80 \pm 8,78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cuando se utilizó el medio GL al 20% y de $179,01 \pm 10,78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con el medio sin diluir.

Se pudo observar una fase lag de crecimiento en las primeras 24 horas de cultivo con los tres medios ensayados a 20°C, sin embargo, cuando se utilizó el medio GL, la fase lag y fase exponencial de crecimiento fueron muy bajas, iniciándose la fase de crecimiento estacionario tras 40 horas de cultivo con el medio GL al 20% de sus nutrientes y sin diluir.

Con el medio RL, se pudo observar que la fase de crecimiento exponencial se prolongó hasta casi las 80 horas de cultivo, dando lugar a la fase de crecimiento estacionario. En el caso de los ensayos realizados con el medio RLMo, la fase exponencial de crecimiento se prolongó hasta pasadas 100 horas de cultivo; en los ensayos con este medio de cultivo sin diluir, la fase de crecimiento exponencial comenzó tras 24 horas de cultivo y la fase estacionaria no comenzó sino hasta pasadas las 120 horas de cultivo.

Si bien, la producción de biomasa fue diferente con cada medio de cultivo ensayado la mayor diferencia se obtuvo cuando los medios de cultivo se ensayaron con el medio de cultivo sin diluir; así por ejemplo con el medio RLMo se obtuvo entre un 50 y 70% más de biomasa que con los medios RL y GL respectivamente.

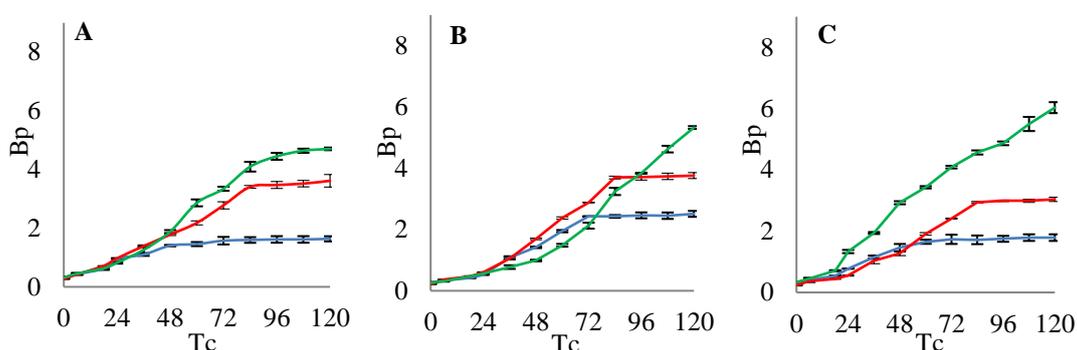


Figura 22: Producción de Biomasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) medida a 560 nm de la microalga SX1 con diferentes medios de cultivo a diferentes concentraciones y a 20°C de incubación. Medio de cultivo GL (línea azul); RL (línea roja); RLMo (línea verde). Las gráficas A, B y C corresponden a los ensayos con medios de cultivo diluido al 20%, 50% (p/v) y sin diluir respectivamente. Donde **Bp** en Eje vertical representa Biomasa producida $\times 100$ en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

1.4.- Cultivos a 20° C con medios RL, GL y RLMo de microalga *Scendesmus obliquus*

En las **Figura 23 A, B y C**, se representa el efecto de la dilución de los medios ensayados sobre el crecimiento de la microalga *Scendesmus obliquus* a 20° C. En todos los casos se observa que la microalga *Scendesmus obliquus* es capaz de crecer en las tres diluciones ensayadas con los medios GL, RL y RLMo. A 10°C, los mayores valores de biomasa se obtuvieron en los medios de cultivo sin diluir, obteniéndose valores de biomasa de $769,83 \pm 14,36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $712,19 \pm 11,70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $595,31 \pm 37,20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con el medio RLMo, RL y GL respectivamente.

De igual modo se pudo observar que la menor cantidad de biomasa producida ($374,35 \pm 12,39 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $374,13 \pm 14,36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se obtuvo con los medios GL y RLMo respectivamente, cuando estos fueron ensayados al 20% de dilución, en contraste a los $472,02 \pm 7,02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa producida con el medio RL a la misma dilución.

Se puede observar también, que el comportamiento de la microalga *Scendesmus obliquus* a 20°C fue muy similar en los tres ensayos realizados con los medios de cultivo GL, RL y RLMO. Fue únicamente en los ensayos con los medios sin diluir donde se apreció una diferencia significativa en la producción de biomasa, obteniéndose un 22% más de biomasa con el medio RLMO que con el medio GL.

En general se puede observar que los medios RL y RLMO, muestran resultados de producción de biomasa muy similares. En los ensayos a 20% de dilución se apreció una diferencia de 20% en el valor de producción de biomasa, siendo el medio RL donde se obtuvo una mayor cantidad de biomasa.

Como en los otros ensayos realizados a 10°C, se observó una fase lag de crecimiento en los tres medios de cultivo ensayados en las primeras 24 horas de cultivo, seguido de la fase de crecimiento exponencial, que se prolongó en todos los casos hasta las pasadas 100 horas de cultivo. Por otro lado, en los ensayos con los medios de cultivo sin diluir la fase estacionaria de crecimiento no apareció hasta pasadas las 120 horas de cultivo.

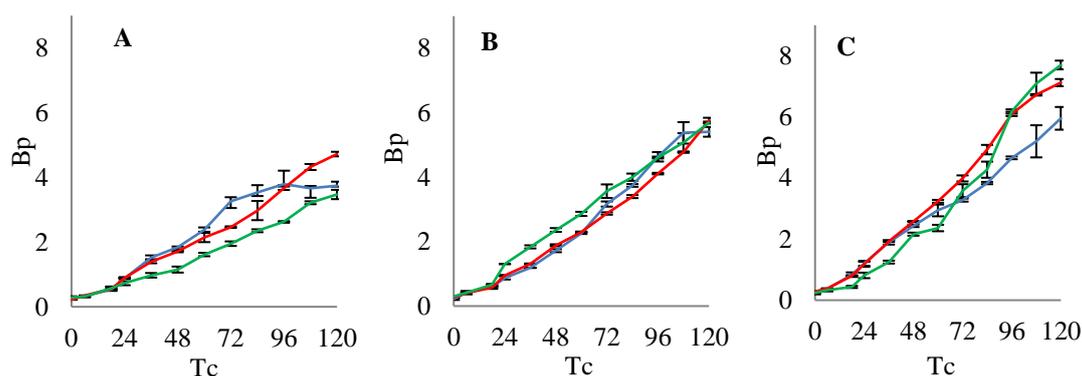


Figura 23: Producción de Biomasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) medida a 560 nm de la microalga *Scendesmus obliquus* con diferentes medios de cultivo a diferentes concentraciones y a 20°C de incubación. Medio de cultivo GL (línea azul); RL (línea roja); RLMO (línea verde). Las gráficas A, B y C corresponden a los ensayos con medios de cultivo diluido al 20%, 50% (p/v) y sin diluir respectivamente. Donde **Bp** en Eje vertical representa Biomasa producida $\times 100$ en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

Tabla 31. Valores máximos de biomasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) producida en los ensayos realizados con los medios GL, RL y RLMo, tanto a 10°C como a 20°C .

Microalga SX1	Medio	Dilución 20%	Dilución 50%	Sin diluir
20°C	GL	163,80±8,78	251,06±10,78	179,01±10,78
	RL	361,54±21,34	375,95±9,68	303,9±7,02
	RLMo	470,42±4,49	532,86±4,49	603,31±17,87
10°C	GL	144,59±5,73	167,80±9,29	238,79±2,95
	RL	230,25±4,49	415,98±19,68	283,09±4,49
	RLMo	518,45±4,49	656,15±30,19	572,89±14,36

Tras los ensayos realizados a 10°C y 20°C con los tres medios de cultivo mencionados, se pudo comprobar que la microalga SX1 fue capaz de proliferar y desarrollarse, llegando a producir hasta $656,15\pm30,19\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 20°C y de $603,31\pm17,87\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 10°C ambos con el medio RLMo, sin embargo con el medio GL, se obtuvieron los valores de producción de biomasa más bajos ($144,59\pm5,73$ y $163,80\pm8,78$) a 10°C y 20°C , respectivamente cuando se ensayó al 20% de sus nutrientes.

Tabla 32. Biomasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) producida de la microalga *Scenedesmus obliquus* en los diferentes ensayos realizados con los medios GL, RL y RLMo, a 10°C y 20°C .

<i>Cultivo a 10°C</i>			
Medio	Dilución 20%	Dilución 50%	Sin diluir
GL	374,35±12,39	540,87±15,13	595,31±37,20
RL	472,02±7,02	576,25±8,23	712,19±11,7
RLMo	374,13±14,36	569,69±3,02	769,83±14,36
<i>Cultivo a 20°C</i>			
GL	251,06±11,77	329,52±2,46	409,57±9,68
RL	310,30±16,35	438,39±2,46	457,61±13,11
RLMo	311,91±0	460,81±4,49	480,02±9,29

Se puede apreciar que *Scenedesmus obliquus* pudo crecer y desarrollarse en todos los medios de cultivo ensayados y a todas las diluciones ensayadas, Esta microalga presento a 10°C un máximo $480,02\pm13,11\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con el medio RLMo sin dilución.

A 20°C el medio con el que se obtuvo mejor resultado de producción de biomasa fue el medio RLM o sin dilución, obteniéndose un máximo de biomasa de $769,83 \pm 14,36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Por otro lado los valores más bajos de producción de biomasa con esta microalga, se obtuvieron a 10°C con el medio GL al 20% de dilución ($251,06 \pm 11,77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). A 20°C con esta microalga se obtuvieron los valores más altos de biomasa en todas las diluciones y medios ensayados.

De igual modo, a 20°C el mejor medio de cultivo en relación a la producción de biomasa fue el medio RL, no así cuando los ensayos se realizaron a 10°C, donde el medio de cultivo fue el RLMo.

De acuerdo con la **Tabla 31** los valores máximos de biomasa se obtuvieron en los cultivos con el medio RLMo al 50% p/v realizados con la microalga SX1, con valores de $656,15 \pm 30,19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $532,86 \pm 4,49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en cultivos a 10°C y 20°C respectivamente.

En relación a la microalga *Scenedesmus obliquus*, a medida que aumenta la concentración de los medios de cultivo ensayados, se aprecia una tendencia positiva de obtención de biomasa, obteniéndose los máximos valores cuando se cultiva la microalga en los medios no diluidos.

Por tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo constatar que el comportamiento microalgal en relación a la producción de biomasa fue diferente para ambas microalgas, siendo la microalga *Scenedesmus obliquus* con la que se obtuvo mayor cantidad de biomasa, en concreto un 15 % más que en las mejores condiciones de cultivo de la microalga SX1.

2.- Modelización matemática

2.1.- Control de medio de cultivo mediante RSM

De acuerdo a los resultados de biomasa obtenidos en el cultivo de las microalgas control, se llevó a cabo la RSM por medio del programa estadístico Desing-Expert v8.0.7.1.

Para obtener una ecuación que avale y prediga estadísticamente la utilización del medio RLMO se diseñaron los diferentes ensayos de acuerdo a los resultados de biomasa obtenidos en la **Tabla 33**. En dicho diseño se representan los datos obtenidos de producción de biomasa con el medio RLMO; con todo ello se obtuvo la respuesta de producción de biomasa (Y) en función de los factores de temperatura (X_1) y dilución (X_2), basada en la siguiente ecuación empírica:

Ecuación 6:

Ecuación 6:

$$Y (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 1327,9 - 142,6 \cdot X_1 \pm 11,6 \cdot X_2 \pm 0,14 \cdot (X_1 \cdot X_2) \pm 3,97 \cdot X_1^2 - 0,1 \cdot X_2^2$$

Tabla 33: Diseño experimental utilizado para análisis de RSM de cultivo de microalga SX1 en medio de cultivo RLMO.

Orden ejecución	Ensayo	Temperatura °C	dilución % p/v	Biomasa (mg*L ⁻¹)
7	1	15	50	510±25,37
8	2	15	50	520±7,02
11	3	20	100	495±18,28
6	4	15	50	509±14,94
2	5	10	20	514±8,18
1	6	10	20	520±7,97
9	7	15	50	519±5,77
4	8	10	50	695±27,28
3	9	20	20	310±8,88
10	10	10	100	580±12,43
5	11	10	50	700±28

Tabla 34: Muestra resultados estadísticos de Análisis de Varianza ANOVA

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F
Model	108357,5	5	21671,5	646,4	< 0.0001
A-Temperature	26187,9	1	26187,9	781,1	< 0.0001
B-Dilution	17269,2	1	17269,2	515,1	< 0.0001
AB	3479,2	1	3479,2	103,8	0.0002
A^2	10212,6	1	10212,6	304,6	< 0.0001
B^2	27545,3	1	27545,3	821,6	< 0.0001
Pure Error	167,6	5	33,5		
Cor Total	108525,2	10			

R²= 0.9985

En la **Tabla 34** se expone el análisis de varianzas (ANOVA) del modelo matemático de la superficie de respuesta de la **Ecuación 6**. La **Figura 24** representa la superficie de respuesta y predice que el medio RL es el idóneo para el cultivo de la microalga SX1, de tal modo que se predice la interacción entre la temperatura y la concentración del medio de cultivo en relación a la producción de biomasa.

De acuerdo con este modelo se puede observar que para obtener concentraciones de biomasa de 600 mg*L⁻¹ (**Figura 24-A,B**) la concentración óptima del medio RL se lograría a partir de 50%, p/v a 10°C. La tendencia de interacción indica que incluso se logran concentraciones de biomasa de 600 mg*L⁻¹ a valores ligeramente inferiores al 50% de concentración del medio de cultivo a 10°C (44,90%, **Figura 24-B**) y que pueden obtenerse dichas cantidades de biomasa a temperaturas superiores, hasta un máximo de 14,23°C para concentraciones del medio de cultivo de 99,80% (**Figura 24-A**). Para la obtención de valores de biomasa ligeramente inferiores (550 mg*L⁻¹), el modelo matemático indica que la concentración óptima del medio de cultivo debería ser inferior al 50% a temperatura entre 10-11°C y que dicha tendencia se repite para concentraciones de biomasa de 500 mg*L⁻¹.

Por último, el modelo también predice que a 20°C puede producirse biomasa (400 mg*L-1) a concentraciones inferiores a 50% de medio de cultivo RL. Se predice, por tanto, que a 20°C la concentración del medio de cultivo debería ser de 46,77% (**Figura 24-C**), y que a valores inferiores de temperatura (17,58°C) la concentración del medio de cultivo para la obtención de 450 mg*L-1 debería ser del 20% (**Figura 24-D**). Estos resultados de predicción se correlacionan con los resultados experimentales obtenidos en los ensayos realizados (**Tabla 33**)

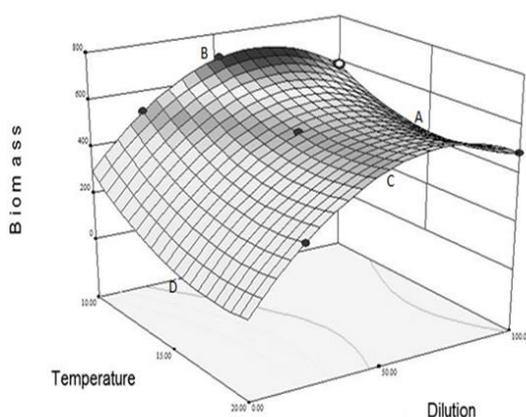


Figura 24: Superficie de Respuesta 3D del crecimiento óptimo para la microalga SX1 en medio RL para la producción de Biomasa en función de la Temperatura y el grado de dilución, **A:** 14,23°C, 99,80%, 600mg*L-1, **B:** 10°C, 44,90%, 600 mg*L-1, **C:** 20°C, 46,77%, 450 mg*L-1, **D:** 17,58°C, 20%, 450mg*L-1

3.- Cultivo de microalgas obtenidas de laguna de La Caldera en parque Sierra Nevada.

3.1.- Selección de la época y zonas de muestreos

Durante 3 años, se muestreó tanto al inicio del verano como al finales del verano (**Tabla 17**): Se obtuvieron 6 muestras, tanto de orilla de la laguna como del centro de la laguna, a fin de obtener una muestra representativa de la zona fótica de la laguna.

Se eligieron estas fechas de estudio con objeto de poder establecer una diferencia significativa de acuerdo a la temperatura de las aguas de la laguna y, de este modo, poder correlacionar este parámetro con la diferencia de biodiversidad de la laguna.

Durante la primera semana de julio cuando se realizaron los primeros muestreos, la laguna presentaba una amplia zona de hielo en proceso de descongelación, en contraste con el segundo muestreo realizado a finales de agosto cuando el deshielo ya había finalizado. Por este motivo, el agua presentó una acusada variación de temperatura (**Tabla 17**).



Figura 25: Laguna de *La Caldera*. Inicio del verano con presencia de hielo procedente de las regulares nevadas durante el invierno.



Figura 26: Imagen de la laguna de *La Caldera*. A finales del verano sin presencia de hielo

3.2.- Temperatura y pH.

Se realizaron un total 6 muestreos durante 3 años, al inicio de la temporada de verano en el mes de Julio y al final del verano a finales de Agosto.

La naturaleza de la roca predominante sobre la que se asientan las lagunas (micasquistos) determina aguas poco mineralizadas (Sánchez Castillo *et al.*, 1989) con valores de conductividad inferiores a 75 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Reboleiro *et al.*, 2014). Durante todos muestreos realizados, el pH se mantuvo próximo a la neutralidad

Se detectó un aumento de 10°C a finales del verano en el mes de agosto, en relación a las primeras muestras tomadas, correlacionándose con la falta de hielo tal y como se observa en la **Figura 26**.

4.- Aislamiento e identificación de microalgas de la laguna de La Caldera

4.1.- Árbol filogenético de las microalgas obtenidas a partir de los aislamientos realizados al inicio de verano de los años 2009, 2010 y 2011.

| 150

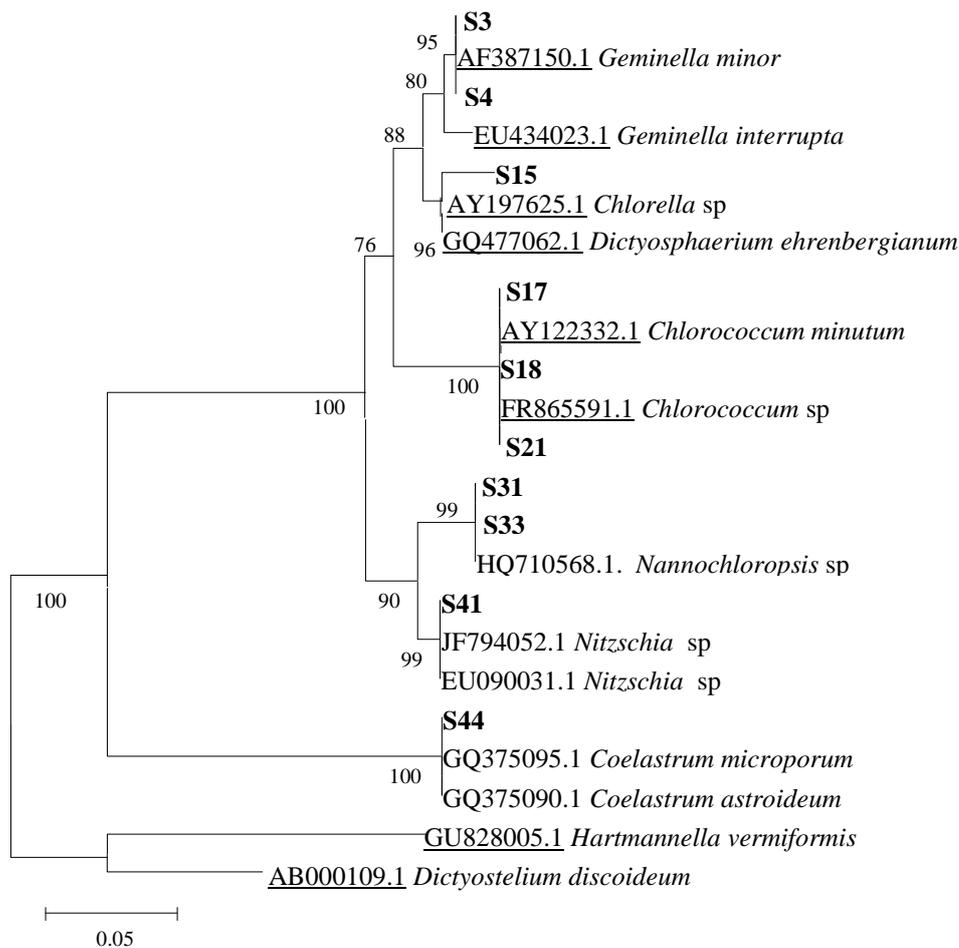


Figura 27(Arbol 1), Árbol filogenético Neighbour-Joining basados en la secuencia parcial del gen codificante del ARNr 18S, mostrando las posiciones de las secuencias de las 10 microalgas de microalgas encontradas en los meses de **Mayo-Junio**, correspondientes a la temporada de inicio de verano, Comparadas en la base de datos EMBL, Ver **Tabla 35**, Los números junto a las ramas indican el valor de bootstrap cuando éste fue superior el 50%, Outgroups included *Hartmannella vermiformis* (GU828005,1) y *Dictyostelium discoideum* (AB000109,14).

4.2. Árbol filogenético de las microalgas obtenidas a partir de los aislamientos realizados a finales de verano de los años 2009, 2010 y 2011

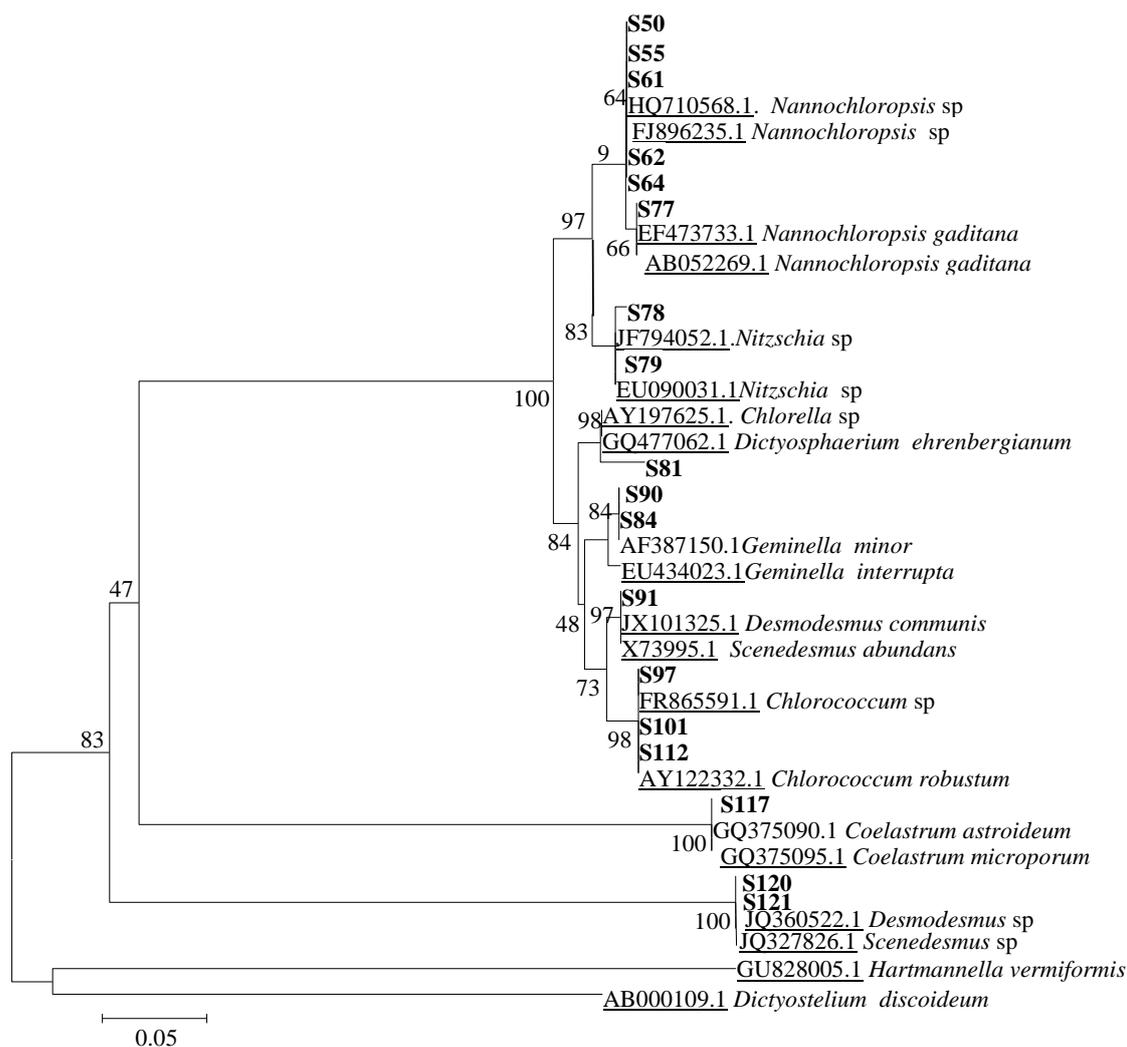


Figura 28 (árbol 2).Árbol filogenético Neighbour-Joining basado en la secuencia parcial del gen codificante del ARNr 18S, mostrando las posiciones de las secuencias de las 17 microalgas encontradas en los meses de Agosto-Septiembre, correspondientes a la temporada de fin de verano, Comparadas en la base de datos EMBL. Ver **Tabla 35**. Los números junto a las ramas indican el valor de bootstrap cuando éste fue superior al 50%. Outgroups included *Hartmannella vermiformis* (GU828005.1) y *Dictyostelium discoideum* (AB000109.14).

En las **Figuras 27 y 28**, se clasificó a las microalgas cultivables aisladas a inicios de verano (Mayo-Junio, **Arbol 1**) como a fines de verano (Agosto-Septiembre, **Arbol 2**), obteniéndose microalgas relacionadas con las clases *Eustigmatophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Trebouxiophyceae* y *Chlorophyceae* en ambos muestreos, sin embargo a fines de verano no se encontraron microalgas cultivables relacionadas con *Bacillariophyceae* (Diatomeas) y *Eustigmatophyceae*.

En los muestreos realizados a lo largo de los 3 años de estudio, tanto a finales como a comienzos del verano, se logró aislar 27 microalgas cultivables. La gran mayoría de ellas, están relacionadas con los filos Clorofita y Ocrofitas. Las clorofitas agruparon a 17 microalgas aisladas cultivables y 10 relacionadas con el filo de las ocrofitas. A inicios del verano, dentro de las clorofitas, se encontraron 3 microalgas cultivables relacionadas con la clase *Trebouxiophyceae* (S3, S4 y S15) y 4 relacionadas con la clase *Chlorophyceae* (S120, S18, S21 y S44). También se evidencio la presencia de 2 microalgas relacionadas con la clase de las *Eustigmatophyceae* (S31 y S33) y solo una microalga relacionada con las *Bacillariophyceae* (S41) estas ultimas, relacionadas con el filo de las *Ocrofitas*.

Cabe destacar que a inicios de verano, de la clase *Eustigmatophyceae*, solo se encontraron 2 microalgas, sin embargo a finales de verano se pudo aislar a 7 de ellas, siendo las microalgas S50, S55, S61, S62, S64, S70 y S77 las únicas relacionadas con esta clase, no evidenciándose la presencia de microalgas cultivables de la clase *Bacillariophyceae*.

De las 17 microalgas aisladas a finales de verano (**Arbol 2**), 10 eran clorofitas, 3 de la clase *Trebouxiophyceae* (S81, S90 y S84) y 7 de las *Chlorophyceae* (S91, S97, S101, S112, S117, S120 y S121).

De acuerdo con estos resultados y a los cultivos realizados con cada microalga aislada, se confeccionó la siguiente **Tabla 35**, donde se detalla que microalga fue seleccionada y la relación filogenética genética según la NCBI, para cada una de ellas, basándose en la amplificación del gen codificante rDNA 18s, (marcados con rojo en arboles filogenéticos, **Arbol 1** y **Arbol2**).

Tabla 35: Microalgas seleccionadas para cultivos individuales, (información proveniente de los arboles filogenéticos)

Microalga Aislada	Similitud Genetica según la NCBI	Similitud (%)
S3	<i>Geminellasp / Chlorophyceae</i>	99
S21	<i>Chlorococcum minutum/ Chlorophyceae</i>	99
S121	<i>Desmodesmus sp. / Chlorophyceae</i>	99
S41	<i>Nitzschia sp / Bacillariophyceae</i>	98
S120	<i>Scenedesmus sp./ Chlorophyceae</i>	99
S91	<i>Desmodesmus communis/ Chlorophyceae</i>	99
S117	<i>coleastrum microporum</i>	99
S81	<i>Chlorella sp.</i>	99
S62	<i>Nanochloropsis sp</i>	99
S101	<i>Chlorococcum sp</i>	99
S84	<i>Geminella minor</i>	99

5.- Cultivos individuales

5.1.- Cultivo individual de Microalga S121 en medio RLMO

| 154

En el cultivo individual de la microalga **S121**, la cual tiene una correspondencia genética con *Desmodesmus sp*, ver **Tabla 35**, se observó que creció y se desarrolló tanto a 10°C como a 20°C, existiendo una fase lag con ambas temperaturas ensayadas, la cual duro 4 días en el cultivo a 10°C y solo 2 días en el cultivo a 20°C, seguido de un aumento en la concentración de biomasa en el tiempo, alcanzando un valor de $161,08 \pm 4,6$ a 10°C y de $192,30 \pm 6,4$ a 20°C. por otro lado, tanto a 10°C como a 20°C, el descenso del valor de velocidad de crecimiento (V_c) comienza a decrecer a los 10 días de cultivo. La fase estacionaria, que es cuando ya no hay producción de biomasa, comenzó a los 13-14 días de cultivo en ambas temperaturas de ensayadas, sin embargo en el cultivo a 10°C se obtuvo un 16,7 % menos de concentración de biomasa en relación al cultivo realizado a 20°C.

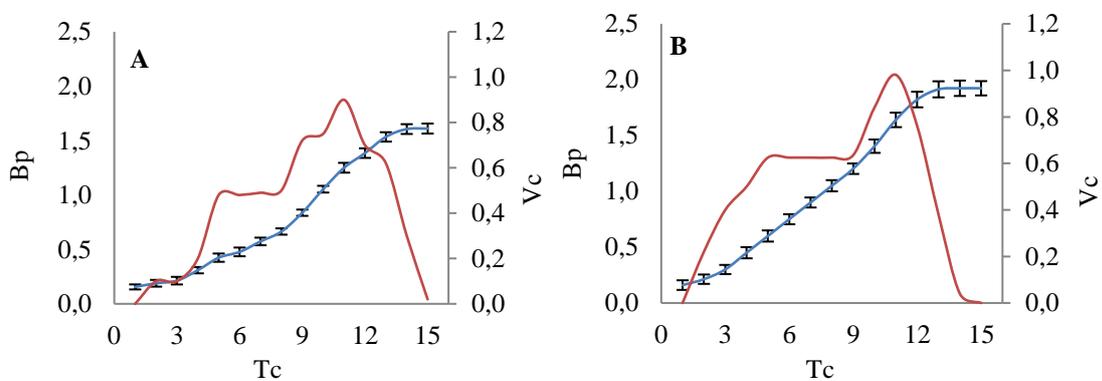


Figura 29: Cultivo de la microalga identificada como **S121** en medio RLMO a diferentes temperaturas: **A:** 10°C; **B:** 20°C; Donde V_c : Velocidad de crecimiento en $\text{mg} \cdot \text{hr} \cdot \text{L}^{-1}$ (Línea Roja) en eje vertical derecho; B_p representa Biomasa $\times 100$ en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y T_c en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

5.2.- Cultivo individual de Microalga S41 en medio RLMO

Cuando se realizó el cultivo de la microalga **S41**, la cual tiene una correspondencia genética de un 99% según la NCBI con la microalga *Nitzschia sp*, ver **Tabla 35**, se observó un efecto notorio de la temperatura sobre el crecimiento de esta microalga, puesto que a 10°C, la microalga S41 no supero la fase lag de crecimiento, obteniéndose una concentración de biomasa total aproximada de $2,76 \pm 1,65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con un valor de crecimiento inicial máximo de $0,13 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$. Sin embargo, a 20°C, si bien, se pudo apreciar inicialmente una fase lag de crecimiento, esta solo duro hasta el día 3 de cultivo, para luego dar comienzo a una fase exponencial de crecimiento, la cuaddl duro hasta el día 11 de cultivo, donde comienza la fase de crecimiento estacionaria y la velocidad de crecimiento comienza a disminuir a valores cercanos a cero, lo que se tradujo en una producción de biomasa $144,49 \pm 5,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y un valor de crecimiento de $1,08 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$.

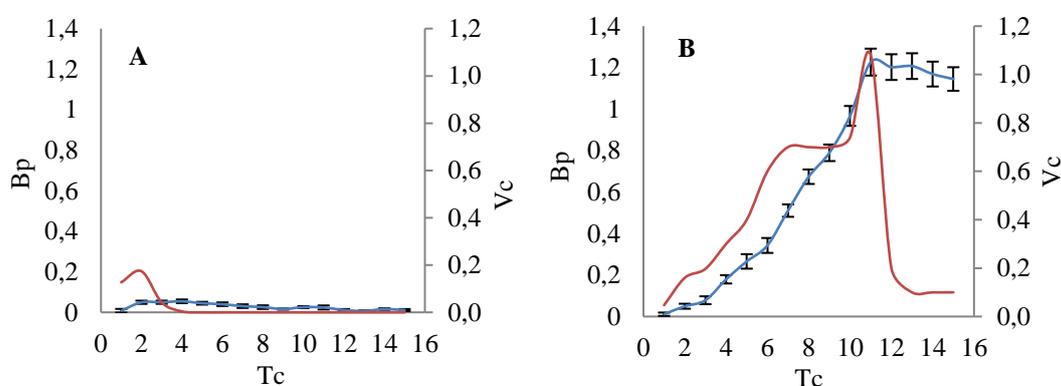


Figura 30: Cultivo de la microalga identificada como **S41** en medio RLMO a diferentes temperaturas: **A:** 10°C; **B:** 20°C; Donde **Vc:** Velocidad de crecimiento en $\text{mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ (Línea Roja) en eje vertical derecho; **Bp** representa Biomasa x100 en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

5.3.- Cultivo individual de Microalga S117 en medio RLMO

156

En el cultivo individual de esta microalga **S117**, que tiene una correspondencia genética de un 99% según la NCBI con la microalga *Coelastrum sp.*, ver **Tabla 35**, se puede apreciar que a 10 °C, el comienzo de la fase estacionaria se observó al día 6 de cultivo, lo que se tradujo en máximo de producción de biomasa de $32,35 \pm 3,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ asociado a un valor de V_c ($0,36 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$), el cual decreció a valor de 0 igualmente al día 6 de cultivo, sin embargo a 20° C, se puede apreciar una fase lag muy poco corta, que duro las primeras horas de cultivo, seguido de un aumento paulatino del valor de velocidad de crecimiento de crecimiento llegando a un máximo de $1,00 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$, lo que dio por resultado un valor de producción de biomasa de $122,81 \pm 17,29$, dando lugar al comienzo de la fase estacionaria a los 11 días de cultivo.

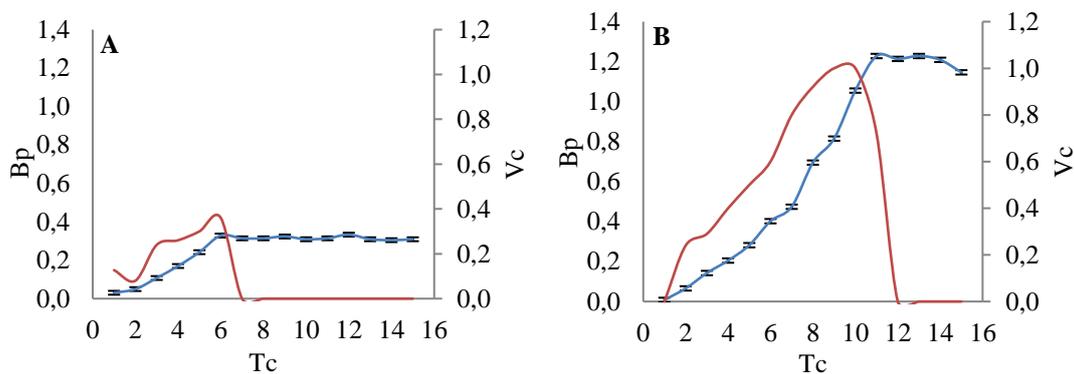


Figura 31: Cultivo de la microalga identificada como **S117** en medio RLMO a diferentes temperaturas: **A:** 10°C; **B:** 20°C; Donde **Vc:** Velocidad de crecimiento en $\text{mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ (Linea Roja) en eje vertical derecho; **Bp** representa Biomasa $\times 100$ en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

5.4.- Cultivo individual de Microalga S81 en medio RLMO

Cuando se realizó el cultivo individual de la **microalga S81**, la cual tiene una correspondencia genética de un 99% según la NCBI con la microalga *Chlorella sp.*, ver **Tabla 35**, se observó un efecto negativo ejercido por temperatura sobre el crecimiento microalgal, viéndose reflejado en concentración de biomasa de $15,00 \pm 4,0$ a 10°C llegando a un valor máximo de V_c de $0,24 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ al 3er día de cultivo. Por otro lado, cuando se llevo a cabo el cultivo de esta microalga a 20°C se observó una fase lag de 3 días, para luego una fase de crecimiento exponencial con una velocidad máxima de producción de biomasa $1,12 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ al 5 día a 20°C , lo que se tradujo en una concentración de biomasa de $83,74 \pm 6,8$. En este mismo ensayo, se pudo apreciar la presencia de una fase de crecimiento estacionario que comenzó al octavo día de cultivo.

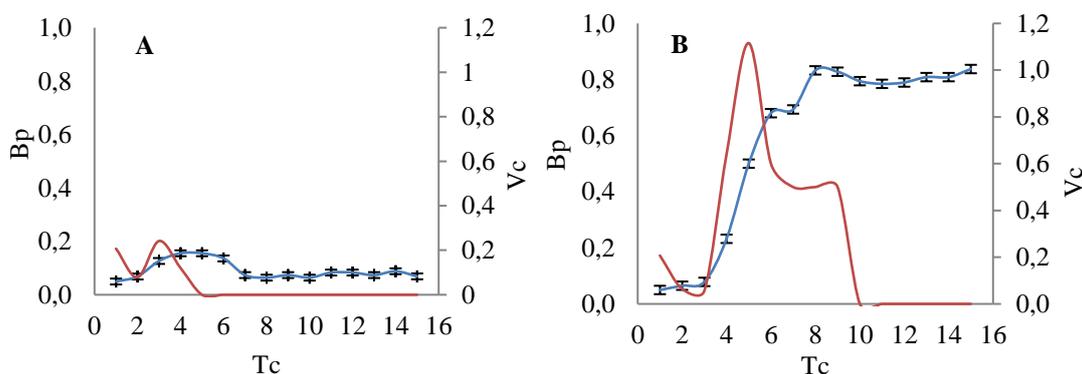


Figura 32: Cultivo de la microalga identificada como **S81** en medio RLMO a diferentes temperaturas: **A:** 10°C ; **B:** 20°C ; Donde **Vc:** Velocidad de crecimiento en $\text{mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ (Linea Roja) en eje vertical derecho; **Bp** representa Biomasa $\times 100$ en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

5.5.- Cultivo individual de Microalga S62 en medio RLMO

Para el cultivo individual de esta microalga **S62** que tiene una correspondencia genética de un 99% según la NCBI con la microalga *Nannochloropsis*, ver **Tabla 35**, al igual que la microalga S81 la temperatura afecta directamente el valor de velocidad de crecimiento llegando a un valor máximo de $0,32 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ y una concentración máxima de biomasa de $15,54 \pm 2,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ al 4 día a 10°C , también se pudo apreciar una ausencia de fase lag de crecimiento en este ensayo. Cuando se cultivó esta microalga a 20°C , tampoco se pudo apreciar una fase lag de crecimiento, sin embargo, a diferencia del cultivo a 10°C , se puede observar un valor máximo de concentración de biomasa al 6to día de cultivo de $41,95 \pm 5,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ seguido de un valor de velocidad de crecimiento de $0,38 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ muy similar a la obtenida a 10°C sin embargo, a 20°C se obtuvo un 100% más de biomasa respecto al cultivo a 10°C .

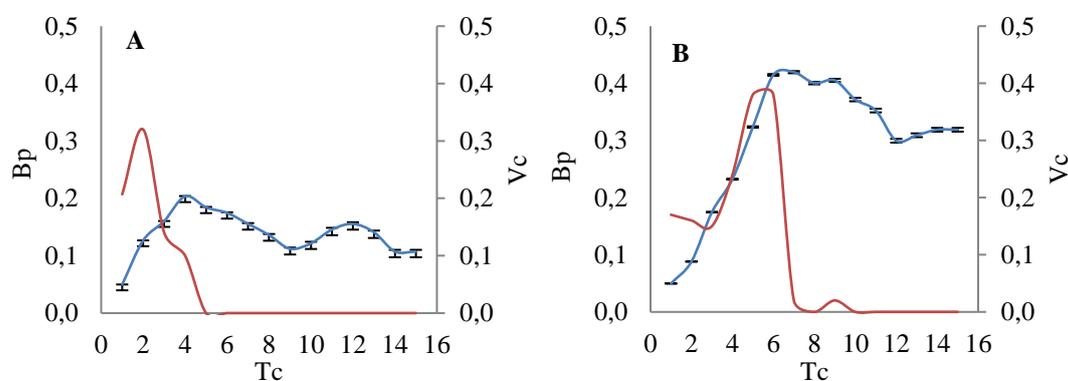


Figura 33: Cultivo de la microalga identificada como **S62** en medio RLMO a diferentes temperaturas: **A:** 10°C ; **B:** 20°C Donde **Vc:** Velocidad de crecimiento en $\text{mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ (Línea Roja) en eje vertical derecho; **Bp** representa Biomasa $\times 100$ en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

5.6.- Cultivo individual de Microalga S21 en medio RLMO

Se puede apreciar que para la microalga **S21** identificada como eucariota, cuya correspondencia genética es de un 99 % con *Chlorococcum minutum*, ver **Tabla 35**, que a 10° C la fase de crecimiento estacionario comienza en el día 10 con una V_c máxima de crecimiento de $0,60 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ al 7mo día de cultivo, la cual decreció un 16 % en los días posteriores al cultivo, manteniéndose hasta el día 10, donde luego decreció a valores mínimos de V_c (cercanos a $0 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$) lo que dio por resultado una concentración máxima de biomasa de $132,05 \pm 12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, por otro lado, un incremento de hasta un 300% en la concentración de biomasa se obtuvo cuando el cultivo se realizó a 20° C, en este ensayo también se aprecia un incremento del 100% de la velocidad de crecimiento con respecto al cultivo a 10 °C al 8 día, llegando a alcanzar un valor de $1,60 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$, la cual disminuyó un 15 % durante los días posteriores, hasta el día 13 de cultivo, donde la velocidad de crecimiento decreció a valores mínimos y que se mantuvo prácticamente constante hasta el día 15 para luego decrecer a valor 0. Si bien existió una fase lag de crecimiento en el ensayo a 10° C, esta no se evidenció cuando el ensayo se realizó a 20° C, cuyo crecimiento se mantuvo constante y en forma progresiva hasta el día 14, que fue cuando comenzó la fase estacionaria, lo que se tradujo en una concentración máxima de biomasa de $396,45 \pm 14,23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,

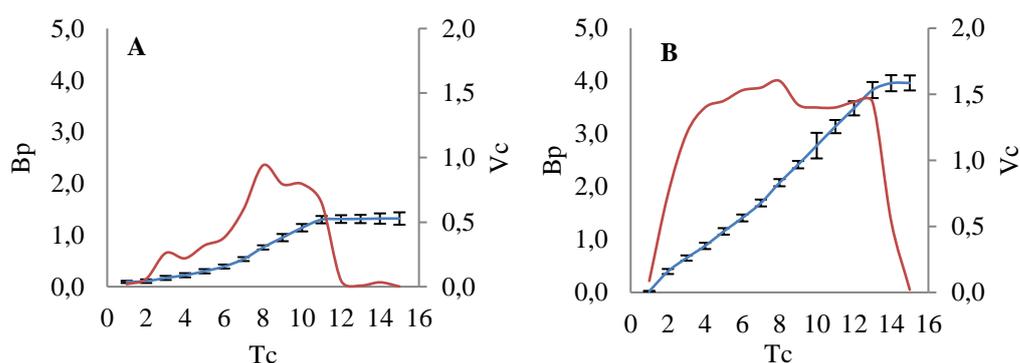


Figura 35: Cultivo de la microalga identificada como **S21** en medio RLMO a diferentes temperaturas: **A:** 10°C; **B:** 20°C; Donde V_c : Velocidad de crecimiento en $\text{mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ (Línea Roja) en eje vertical derecho; B_p representa Biomasa $\times 100$ en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y T_c en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

5.7.- Cultivo individual de Microalga S101 en medio RLMO

Cuando se llevo a cabo el cultivo individual de la microalga **S101**, la cual posee una correspondencia genética de un 99% según la NCBI con la microalga *Chroococcus Minor*, ver **Tabla 35**, se pudo apreciar que no presento un crecimiento apreciable a 10° C con el medio RLMO sin embargo, a 20°C con el mismo medio de cultivo, se puede apreciar en primer lugar, que no hubo fase lag de crecimiento, desarrollando una fase exponencial de crecimiento que se mantuvo en incremento constante hasta el día 11 de cultivo, llegando a obtener un valor de 0,74 mg*hrL⁻¹, seguido comenzó la fase estacionaria, donde la Vc disminuyó a valores cercanos a 0. A 20°C se obtuvo una concentración de biomasa máxima de 104,88±7mg*L⁻¹ a los 12 días de cultivo.

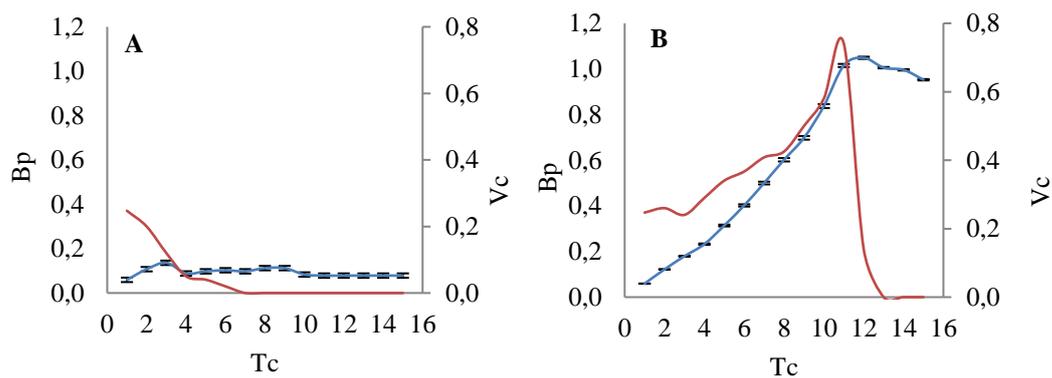


Figura 36: Cultivo de la microalga identificada como **S101** en medio RLMO a diferentes temperaturas: **A:** 10°C; **B:** 20°C. Donde **Vc:** Velocidad de crecimiento en mg*hrL⁻¹(Linea Roja) en eje vertical derecho; **Bp** representa Biomasa x100 en mg*L⁻¹en Eje vertical izquierdo y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

5.8.- Cultivo individual de Microalga S84 en medio RLMO

El cultivo individual de la microalga **S84** la cual tiene una correspondencia genética de un 99% según la NCBI con la microalga *Oocystis Lacustris*, ver **Tabla 35**, demostró la ausencia de la fase lag de crecimiento, cuando el cultivo se realizó a 10° C, obteniéndose una V_c máxima de $0,32 \text{ mg}^* \text{hrL}^{-1}$ al 6to día de cultivo, la cual decreció un 50 % a las 24 horas siguientes, para luego llegar a un valor mínimo de 0, obteniéndose una concentración máxima de biomasa de $51,08 \pm 3,0 \text{ mg}^* \text{L}^{-1}$ al día 12 de cultivo. Por otro lado, cuando el ensayo se realizó a 20° C con el medio RLMO, se obtuvo un valor máximo de $0,62 \text{ mg}^* \text{hrL}^{-1}$ un 100% más que cuando se realizó el ensayo a 10°C, lo que se tradujo en un ligero aumento en la concentración máxima de $81,34 \pm 5,6 \text{ mg}^* \text{L}^{-1}$ un 37,6% más que cuando se realizó el ensayo a 10°C,

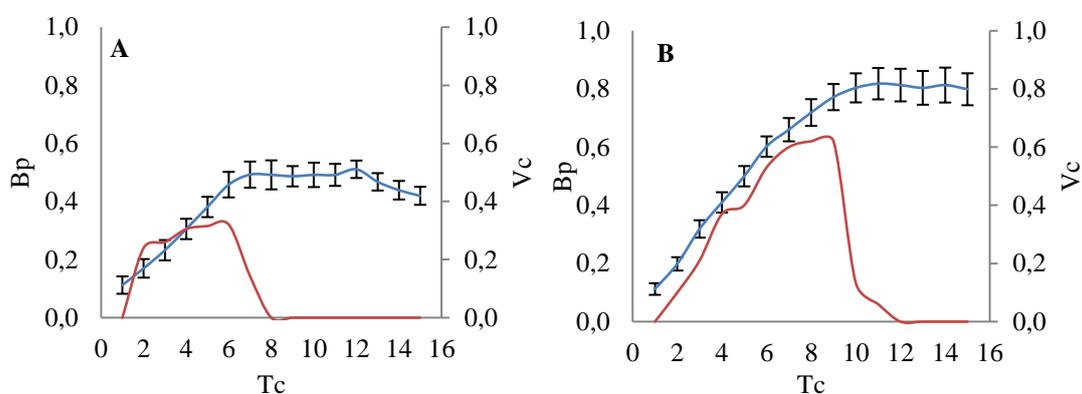


Figura 37: Cultivo de la microalga identificada como **S84** en medio RLMO a diferentes temperaturas: **A:** 10°C; **B:** 20°C. Donde V_c : Velocidad de crecimiento en $\text{mg}^* \text{hrL}^{-1}$ (Linea Roja) en eje vertical derecho; B_p representa Biomasa $\times 100$ en $\text{mg}^* \text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y T_c en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

5.9.- Cultivo individual de Microalga S3 en medio RLMo

| 162

En el cultivo individual de la microalga **S3**, la cual tiene una correspondencia genética de un 99% según la NCBI con la microalga *Geminella sp*, ver **Tabla 35**. Se puede apreciar que cuando el ensayo se realizó a 10°C se obtuvo una V_c de crecimiento de $0,60 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ en el día 6to de cultivo, disminuyendo un 86,2 % pasadas las 24 horas de cultivo, manteniéndose constante en valores cercanos a 0 hasta el final del ensayo, observándose un valor de producción de biomasa máxima de $39,51 \pm 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Por otro lado, se aprecia que a 10°C la fase lag duro hasta el día 4 de cultivo, para luego dar comienzo a la fase de crecimiento. Un 50% más en la concentración de biomasa se obtuvo cuando el ensayo se realizó a 20°C en el día 13 de cultivo, obteniéndose también un valor de V_c de crecimiento de $0,63 \text{ mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ al 9 día de cultivo, lo que se tradujo a una concentración máxima de biomasa el día 13 de cultivo de $84,7 \pm 1,44 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

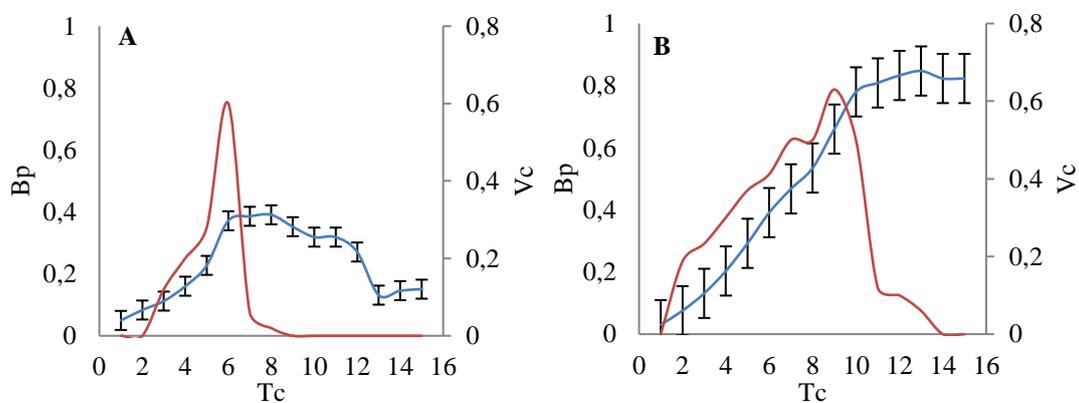


Figura 38: Cultivo de la microalga identificada como **S3** en medio RLMo a diferentes temperaturas: **A:** 10°C; **B:** 20°C; Donde V_c : Velocidad de crecimiento en $\text{mg} \cdot \text{hrL}^{-1}$ (Linea Roja) en eje vertical derecho; B_p representa Biomasa $\times 100$ en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y T_c en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

5.10.- Cultivo individual de Microalga S120 en medio RLMO

En el cultivo individual de la microalga **S120**, identificada como eucariota y con un 99% de similitud con *Desmodesmus sp*, ver **Tabla 35**, se observa breve fase lag a 10°C, la cual dio lugar a un crecimiento exponencial con una velocidad de $0,85 \text{ mg*hrL}^{-1}$ y una concentración de biomasa de $139,46 \pm 7,8 \text{ mg*L}^{-1}$, por otro lado se obtuvo un valor máximo de concentración de biomasa de $153,68 \pm 8,36 \text{ mg*L}^{-1}$ a 20° con una Vc de $1,12 \text{ mg*hrL}^{-1}$, un 13 % mas que cuando se cultivo esta microalga a 10°C. Con ambas temperaturas, la fase de crecimiento estacionario comenzó el día 11 de cultivo.

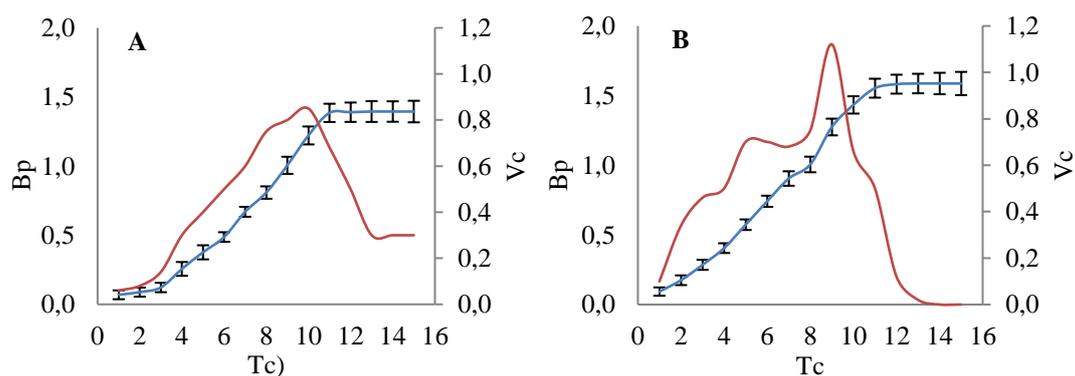


Figura 39: Cultivo de la microalga identificada como **S120** en medio RLMO a diferentes temperaturas: **A:** 10°C; **B:** 20°C; Donde **Vc:** Velocidad de crecimiento en mg*hrL^{-1} (Linea Roja) en eje vertical derecho; **Bp** representa Biomasa $\times 100$ en mg*L^{-1} en Eje vertical izquierdo y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

Tabla 36: Muestra los distintos parámetros bioquímicos y de cultivo obtenidos en los ensayos individuales realizados a 10°C y 20°C con el medio RLMo.

Cepa Aislada	Temperatura							
	10				20			
	%Lípidos totales (%)	Proteínas (%)	μ h ⁻¹	Biomasa Acumulada ²	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Vc ¹	Biomasa Acumulada ²
S3	31.2	18.2	0,60	39,51±4	17.2	32.1	0,63	84,7±1,44
S21	25.6	17.8	0.94	132,05±12	20.1	42	1,6	396,45±14,23
S121	28.7	20.1	0.90	161,08±4,6	25.2	28.1	0.98	192,30±6,4
S41	Nd	Nd	0,17	2,76±1,65	12.5	8.2	1,08	144,49±5,7
S120	29.5	21.8	0,85	139,46±7,8	19.8	18.8	1,12	153,68±8,36
S117	17,2	9,85	0,36	32,35±3,6	25.8	27.9	1	122,81±17,29
S81	Nd	Nd	0,24	15,00±4	18.4	3	1,12	83,74±6,8
S62	Nd	Nd	0,32	15,54±2,4	13.2	18	0,38	41,95±5,8
S101	Nd	Nd	0,20	13,61±3,5	19.7	27	0,74	104,88±7
S84	Nd	Nd	0,32	51,08±3	20.5	26.1	0,62	81,34±5,6

*1: Velocidad de crecimiento en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; 2: Biomasa Acumulada en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

En la producción de biomasa, si se puede apreciar una mayor concentración de biomasa en todos los ensayos cuando estos fueron realizados a 20° C para todas las microalgas ensayadas, obteniéndose incrementos de casi un 300% para el caso del ensayo realizado a 20° C con la microalga **S21**.

5.12.- Comparativa de cultivos individuales a 10° C

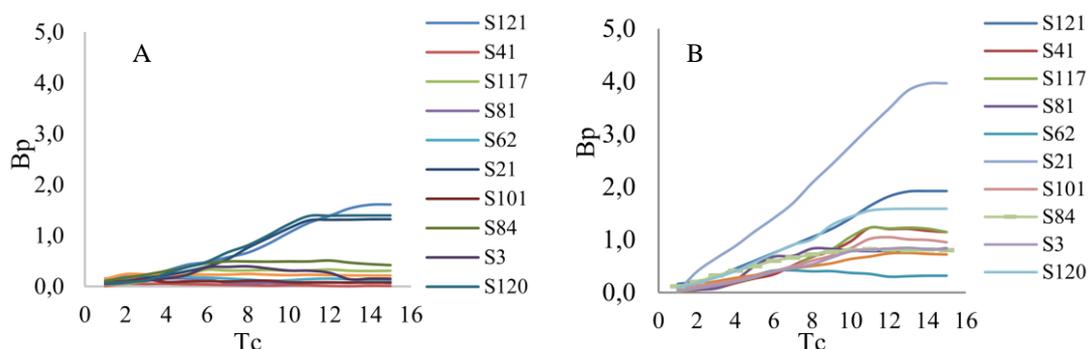


Figura 40 A y B: Producción de biomasa en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de microalgas cultivadas individualmente 10°C en medio RLMo y comparativa producción de biomasa en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de microalgas cultivadas individualmente 20°C en medio RLMo respectivamente. Donde, **Bp** representa Biomasa $\times 100$ en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y **Tc** en eje horizontal representa el tiempo de cultivo en horas.

Se puede apreciar que a 10 °C si bien no existen crecimientos significativos en comparación a los resultados obtenidos a 20°C. , las microalgas S21, S120 y S121 si presentan concentraciones de biomasa superiores a 100 mg*L⁻¹. El resto de las microalgas ensayadas no presentaron valores superiores a 50 mg*L⁻¹, las microalgas anteriormente mencionadas presentaron una fase de crecimiento estacionario al día 11 de cultivo, permaneciendo constante hasta el final del ensayo. Por otro lado en los cultivos realizados a 20°C, si se observo producciones de biomasa sobre los 150 mg*L⁻¹, sin embargo fue la microalga S21 la única que mostro una concentración de biomasa sobre los 350 150 mg*L⁻¹.

En resumen, cuando los ensayos fueron llevados a cabo a 20°C, se pudo apreciar que la mayoría de las microalgas ensayadas si presentaron concentraciones de biomasa significativas, siendo la microalga S21 la que presento los valores más altos de producción de biomasa, se pudo observar además, que hubo crecimientos prácticamente nulos como es el caso de la microalga **S62**. A diferencia de los ensayos realizados a 10°C, en los ensayos a 20°C, si hubo concentraciones mayores a 50 mg*L⁻¹ aunque estos en su mayoría no superaron los 150 mg*L⁻¹, También se puede apreciar que todas las microalgas presentaron una fase de crecimiento estacionario comenzando estas entre los días 9 y 12 de cultivo, para luego permanecer constante hasta el final del ensayo.

6.- Cultivo de microalga S21 y temperatura óptima de crecimiento

Con el fin de determinar la temperatura óptima de crecimiento de la microalga S21, se realizaron ensayos utilizando distintas temperaturas con los medios RL y RLMO con diluciones 20 %, 50 % y sin diluir.

| 166

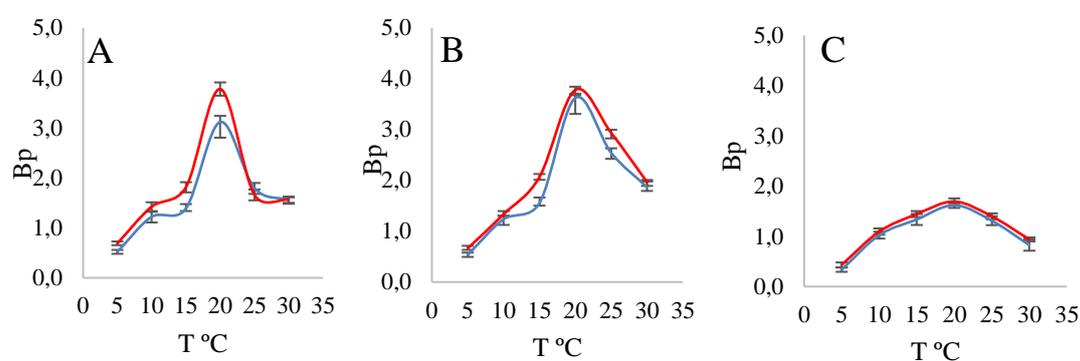


Figura 42: Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la microalga S21 donde la línea representa el medio de cultivo RL y la línea Roja representa el medio RLMO. **A:** con los medios RL y RLMO sin diluir; **B:** Con los medios diluidos al 50%; **C:** Con los medios al 20% de concentración. Donde, **Bp** representa Biomasa $\times 100$ en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en Eje vertical izquierdo y **T°** temperatura en grados Celcius en eje horizontal.

Tabla 37. Efecto de la temperatura y dilución sobre la producción de biomasa de la microalga S21 con el medio RL.

Temperatura°C	Dilución 20% $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Dilución 50% $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Sin diluir $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
5	33,7 \pm 4,27	53,58 \pm 4,12	52,18 \pm 3,7
10	102,38 \pm 6,84	123,67 \pm 11,32	122,06 \pm 9,99
15	133,56 \pm 10,93	155,35 \pm 5,04	138,63 \pm 8,9
20	161,89 \pm 5,36	362,04\pm31,46	311,67\pm12,22
25	131,12 \pm 8,9	254,14 \pm 11,85	179,66 \pm 10,08
30	82,62 \pm 1,19	186,6 \pm 7,45	155,52 \pm 5,45

Tabla 38. Efecto de la temperatura y dilución sobre la producción de biomasa de la microalga S21 con el medio RLMO.

Temperatura°C	Dilución 20% mg*L ⁻¹	Dilución 50% mg*L ⁻¹	Sin diluir mg*L ⁻¹
5	43,2±4,93	63,37±3,07	69,07±3,71
10	109,5±6,28	133,33±3,38	142,33±8,85
15	144,28±5,96	206,53±5,45	181,08±10,21
20	169,22±6,26	377,83±7,61	377,5±13,29
25	139,83±5,96	293,53±11,02	165,53±10,84
30	93,8±4,06	196,7±7,63	156,23±6,24

La microalga **S21**, demostró poder crecer y desarrollarse con los tres medios, a las 6 temperaturas y 3 diluciones ensayadas, si bien pudo proliferar en los 2 medios ensayados y todas las temperaturas ensayadas, se obtuvieron valores sobre 300 mg*L⁻¹ en las temperaturas cercanas a los 20°C. Figura **42**, donde se puede apreciar las curvas de crecimiento obtenidas con los valores máximos de producción de biomasa en cada ensayo.

2. Estudio de Viabilidad celular de microalga S21, mediante tinción con Diacetato de Fluoresceina (DAF) y Ioduro de Propidio (IP)

2.1. Estudio realizado a 10°C a los 8 días de incubación en BIL (Baja intensidad de Iluminación) y AIL (Alta Intensidad de Iluminación), y con medio de cultivo RLMO diluido a 20% (p/v) y 50% (p/v).

| 168

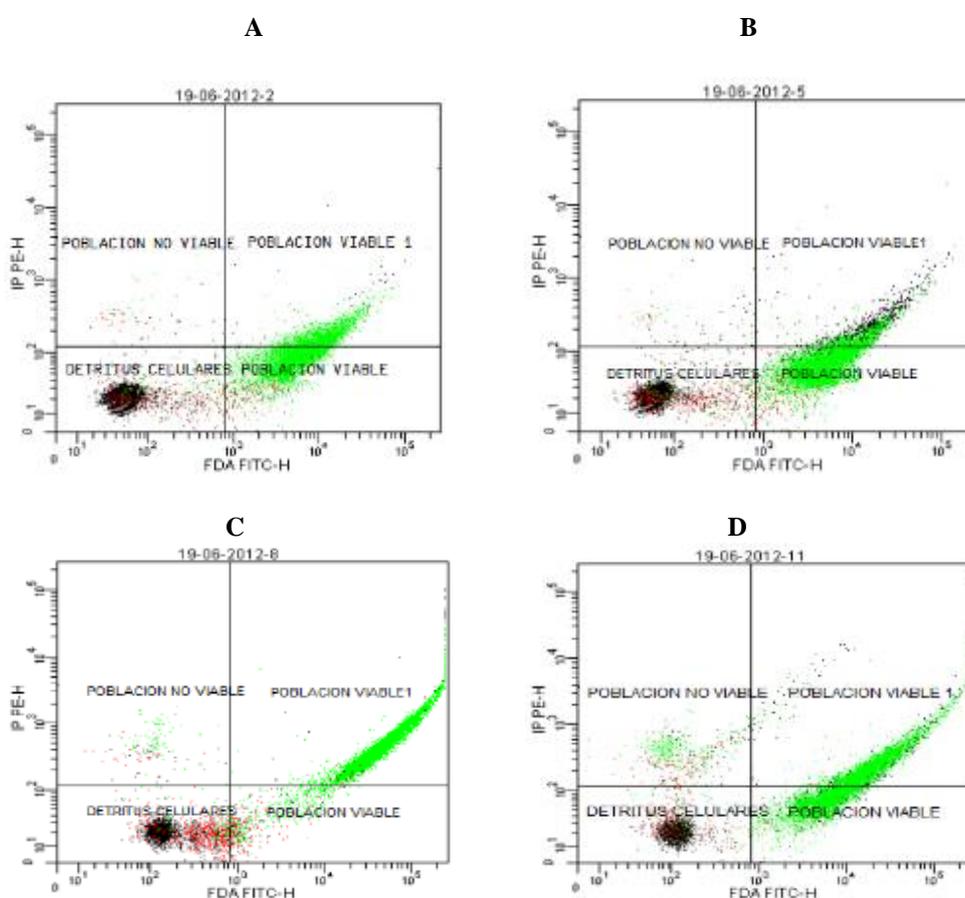


Figura 41 : Medida de Viabilidad celular mediante tinción con Diacetato de Fluoresceina (DAF) y Ioduro de Propidio (IP) de diferentes muestras de microalgas cultivadas a 10°C y tras 8 días de incubación. **A)** Incubación BIL $26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ con medio de cultivo RLMO al 20% (p/v); **B)** Incubación BIL $26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ con medio de cultivo RLMO al 50%; **C)** Incubación AIL $80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y con medio de cultivo RLMO al 20%; **D)** Incubación AIL $80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y con medio de cultivo RLMO al 50% (p/v).

Tabla 39: Porcentajes de células viables y no viables dependiendo de las condiciones de cultivo de microalga S21 a 10°C. **A)** BIL 26,8 W* m⁻² y con medio de cultivo RLMO diluido al 20% (p/v). **B)** Cultivo BIL 26,8 W* m⁻² y con medio de cultivo RLMO diluido al 50% (p/v). **C)** Cultivo AIL 80 W* m⁻² y con medio de cultivo RLMO diluido al 20% (p/v). **D)** Cultivo AIL 80 W* m⁻² y con medio de cultivo RLMO diluido al 50% (p/v).

Tipo de cultivo	a (%)	b (%)	c (%)	d (%)	e (%)
A	61,7±4,2	39,9±3,1	99,9	0,5±0,2	2,9±0,3
B	68,6±0,8	29,6±1,0	98,2	0,3±0,1	1,5±0,2
C	9,2±0,1	85,3±0,9	94,6	1,7±0,2	3,7±0,6
D	39,9±0,6	55,1±0,5	95	3,7±0,6	1,3±0,2

a: DAF+ IP-; b: DAF+ IP+; c: Células Viables Totales (a+b); d: DAF- IP+ (Células no Viables); e: DAF- IP- (Restos Celulares).

En la **Figura 41-A**, es decir, ensayo de cultivos BIL 26,8 W* m⁻² y diluido al 20% (p/v) de dilución, se detecta una baja proporción de células con su capacidad de homeostasis intacta; esto se observa teniendo en cuenta la suma de células teñidas con DAF y no teñidas con IP = Población viable (61,7±4,2%) más las células teñidas con DAF y IP = Población viable-1 (39,9±3,1%) (**Tabla 39**). Las células que tienen su capacidad de homeostasis intacta y además son estables en el tiempo constituyen la población teñida con Diacetato de Fluoresceína (DAF+) y no teñida con Ioduro de Propidio (IP-); en este caso, el fluorocromo DAF ha penetrado en las células mediante transporte activo, siendo transformado por las esterasas de membrana en un compuesto capaz de emitir fluorescencia a 530 nm. Por otro lado, la ausencia de fluorescencia de IP indica que las membranas celulares están intactas; Las células que se han teñido con Diacetato de Fluoresceína (DAF+) pero también con Ioduro de Propidio (IP+) representan la población de células viables (Población viable-1) que comienzan a perder su capacidad de homeostasis. En la **Figura 41-B** y **Tabla 39** se observa que la proporción de células viables ha aumentado, es decir que en condiciones de baja luminosidad pero con mayor cantidad de nutrientes (medio de cultivo RLMO al 50%, p/v), la proporción de células con su capacidad de homeostasis intacta es mayor. Además se observa que el aumento de células viables estables en el tiempo (DAF+, IP-) es ligeramente mayor (68,6±0,8%) que el de células viables que están comenzado a perder su capacidad de homeostasis (DAF+, IP+) (29,6±1,0%). (**Tabla 39**).

Cuando se cultivan las células en presencia de luz la viabilidad aumenta considerablemente en relación a los cultivos realizados BIL 26,8 W* m⁻². En el caso de cultivos con medio diluido al 20% (p/v) (**Figura 41-C**) la proporción de células no estables en el tiempo en relación a su viabilidad (DAF+ IP+) es mayor que el de células con su capacidad de

homeostasis intacta y estables en el tiempo (DAF+ IP-), $85,3\pm 0,9\%$ y $9,2\pm 0,1\%$ respectivamente (**Tabla 39**); Por otro lado, se observa que cuando los cultivos se realizan con medios diluidos al 50% (p/v) la población estable en relación a su viabilidad aumenta en relación a la población no estable (**Figura 41-D** y **Tabla 39**).

| 170

2.2. Estudio realizado a 10°C a los 20 días de incubación con BIL (Baja intensidad de Iluminación) y AIL (Alta Intensidad de Iluminación), y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% (p/v) y 50% (p/v).

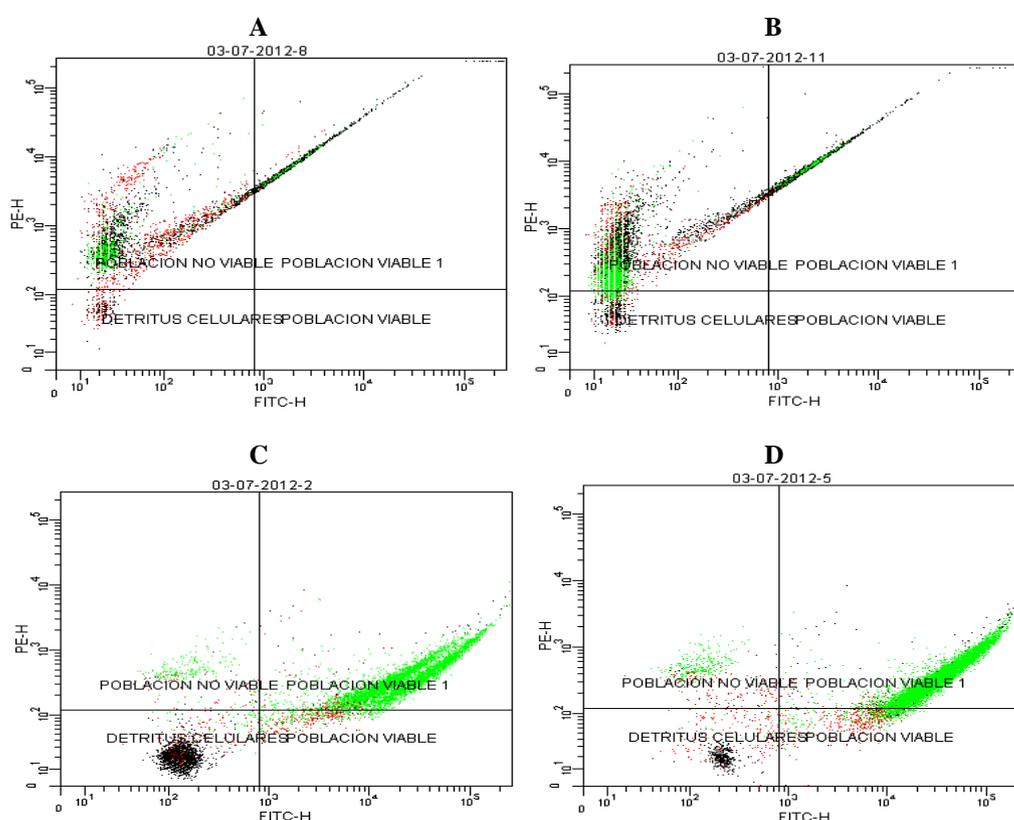


Figura 42 : Medida de Viabilidad celular mediante tinción con Diacetato de Fluoresceina (DAF) y Ioduro de Propidio (IP) de diferentes muestras de microalgas cultivadas a 10°C y tras 20 días de incubación. **A**) Incubación BIL $26,8\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ con medio de cultivo RLMo al 20% (p/v); **B**) Incubación BIL $26,8\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ con medio de cultivo RLMo al 50% (p/v); **C**) Incubación AIL $80\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ y con medio de cultivo RLMo al 20% (p/v); **D**) Incubación AIL $80\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ y con medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).

Tabla 40: Porcentajes de células viables y no viables dependiendo de las condiciones de cultivo de la microalga S21. **A)** Cultivo BIL $26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y con medio RLMO diluido al 20% (p/v). **B)** Cultivo BIL $26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y con medio RLMO diluido al 50% (p/v). **C)** Cultivo AIL $80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y con medio RLMO diluido al 20% (p/v). **D)** Cultivo AIL $80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y con medio RLMO diluido al 50% (p/v).

Tipo de cultivo	<i>a</i> (%)	<i>b</i> (%)	<i>c</i> (%)	<i>d</i> (%)	<i>e</i> (%)
A	0	18,1±1,5	18,1	81,3±1,5	0,6±0
B	0	15,1±3,1	15,1	75,0±2,3	9,9±0,9
C	4,6±0,6	90,2±1,0	98,4	3,8±0,1	1,3±0,2
D	4,5±0,4	92,2±0,4	96,7	2,9±0	0,3±0

a: DAF+ IP-; *b:* DAF+ IP+; *c:* Células Viables Totales (*a*+*b*); *d:* DAF- IP+ (Células no Viables); *e:* DAF- IP- (Restos Celulares).

En la **Figura 42-A y Tabla 40**, es decir cultivos BIL (Baja Intensidad de luminosidad) $26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y diluido al 20% (p/v) de dilución, se detecta una población celular viable que está perdiendo la integridad de sus membranas (DAF+, IP+, 18,1±1,5%). Tras 20 días de cultivo y bajo estas condiciones, no se detecta población celular con capacidad de homeostasis intacta

En la **Figura 42-B y Tabla 40**, es decir con las mismas condiciones de iluminación que en el ensayo anterior, pero en cultivo con mayor concentración de nutrientes (RLMO al 50%, p/v), se puede apreciar que al igual que en caso anterior, no existe una población viable con sus membranas intactas, observándose además un leve decrecimiento (4%) de células viables-1 (DAF+ IP+) respecto al ensayo con medio al 20% , p/v. También se puede apreciar tras 20 días de cultivo un aumento significativo de restos celulares (9,9±0,9%) y un alto porcentaje de células no viables (75,0±2,3%) al igual que en el caso anterior.

Cuando se cultivan las células con mayor AIL, la viabilidad aumenta considerablemente en relación a los cultivos realizados con BIL; En el caso de cultivos con medio diluido al 20% (p/v) (**Figura 42-C**) la proporción celular viable total alcanza valores de 98,4%, existiendo incluso una proporción de células con su capacidad de homeostasis intacta de un 4,6±0,6%. Cuando se realizó el cultivo con alta intensidad de luz (AIL) y el medio diluido al 50% (p/v), se aprecia un resultado similar al anterior ensayo realizado con la misma intensidad de luz y con un mayor grado de dilución del medio, detectándose un 92,2±0,4% de células viables y un 4,5±0,4% de células con su capacidad de homeostasis intacta (DAF+ IP-). Además, se observa una disminución de un 9,9±0,9% a un 0,3±0% de restos celulares en comparación al ensayo realizado con la misma dilución de medio de cultivo RLMO pero con BIL. Por otro lado cuando hay AIL, la proporción de células no viables (DAF- IP+), disminuye considerablemente de un 81,3±1,5%

a un $3,8 \pm 0,1\%$ para los ensayos realizados con el medio al 20% (p/v) y de un $75,0 \pm 2,3\%$ a $2,9 \pm 0\%$ cuando el ensayo fue realizado con el medio al 50% (p/v) de dilución. **Tabla 40.**

| 172

2.3. Estudio realizado a 20°C a los 8 días de incubación en BIL (Baja intensidad de Iluminación) y AIL (Alta Intensidad de Iluminación) y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% (p/v) y 50% (p/v).

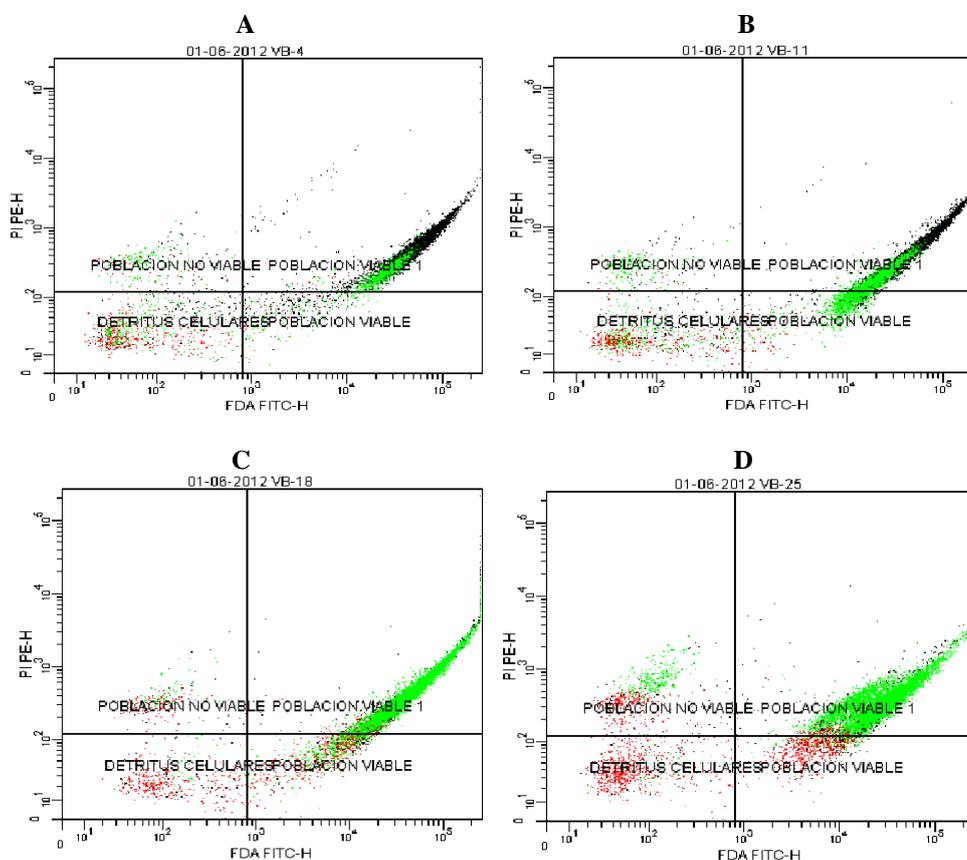


Figura 43 : Medida de Viabilidad celular mediante tinción con Diacetato de Fluoresceina (DAF) y Ioduro de Propidio (IP) de diferentes muestras de microalgas cultivadas a 20°C y tras 8 días de incubación. **A)** Incubación BIL $26,8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ con medio de cultivo RLMo al 20% (p/v); **B)** Incubación BIL $26,8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ con medio de cultivo RLMo al 50% (p/v); **C)** Incubación AIL $80 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ y con medio de cultivo RLMo al 20% (p/v); **D)** Incubación AIL $80 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ y con medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).

Tabla 41: Porcentajes de células viables y no viables dependiendo de las condiciones de cultivo de la microalga S21. **A)** Cultivo BIL 26,8 W*m⁻² y con medio diluido RLMO al 20% (p/v). **B)** Cultivo BIL 26,8 W*m⁻² y con medio RLMO diluido al 50% (p/v). **C)** Cultivo AIL 80 W*m⁻² y con medio RLMO diluido al 20% (p/v). **D)** Cultivo AIL 80 W*m⁻² y con medio RLMO diluido al 50% (p/v).

Tipo de cultivo	<i>a</i> (%)	<i>b</i> (%)	<i>c</i> (%)	<i>d</i> (%)	<i>e</i> (%)
A	9,5±0,5	67,2±3,5	76,7	8,8±0,8	14,5±2,1
B	35,4±0,8	53,9±0,1	89,3	4,2±0	6,4±0,7
C	7,2±0,4	91,2±0,4	98,4	1,0±0,1	0,6±0
D	2,6±0,4	93,1±0,5	95,6	3,8±0,1	0,6±0,1

a: DAF+ IP-; *b*: DAF+ IP+; *c*: Células Viables Totales (*a*+*b*); *d*: DAF- IP+ (Células no Viables); *e*: DAF- IP- (Restos Celulares).

En la **Figura 43-A** y **43-B**, ambos ensayos realizados a BIL, se puede apreciar un considerable aumento de células viables con su capacidad de homeostasis intacta (DAF+, IP-) de 9,5±0,5% a 35,4±0,8%, cuando se incrementa la concentración de nutrientes (medio RLMO al 50%, p/v). Es de destacar que tras 8 días de cultivo y 20°C se incrementa la proporción de restos celulares hasta valores de 14,5±2,1% y 6,4±0,7% en los cultivos realizados a 20 y 50% p/v respectivamente. En los cultivos realizados a AIL y al 20 y 50% p/v de concentración de nutrientes (**Figura 43-C** y **43-D**) se puede apreciar un total de células viables considerablemente alto (98,4 y 95,6%), no obstante se observa que la mayor proporción de la población viable corresponde a las que comienzan a perder su capacidad de homeostasis (91,2±0,4% y 93,1±0,5%), en detrimento de las que aún conservan sus membranas intactas (7,2±0,4% y 2,6±0,4%).

2.4. Estudio realizado a 20°C a los 20 días de incubación en BIL (Baja intensidad de Iluminación) y AIL (Alta Intensidad de Iluminación) y con medio de cultivo RLMO diluido a 20% (p/v) y 50% (p/v).

| 174

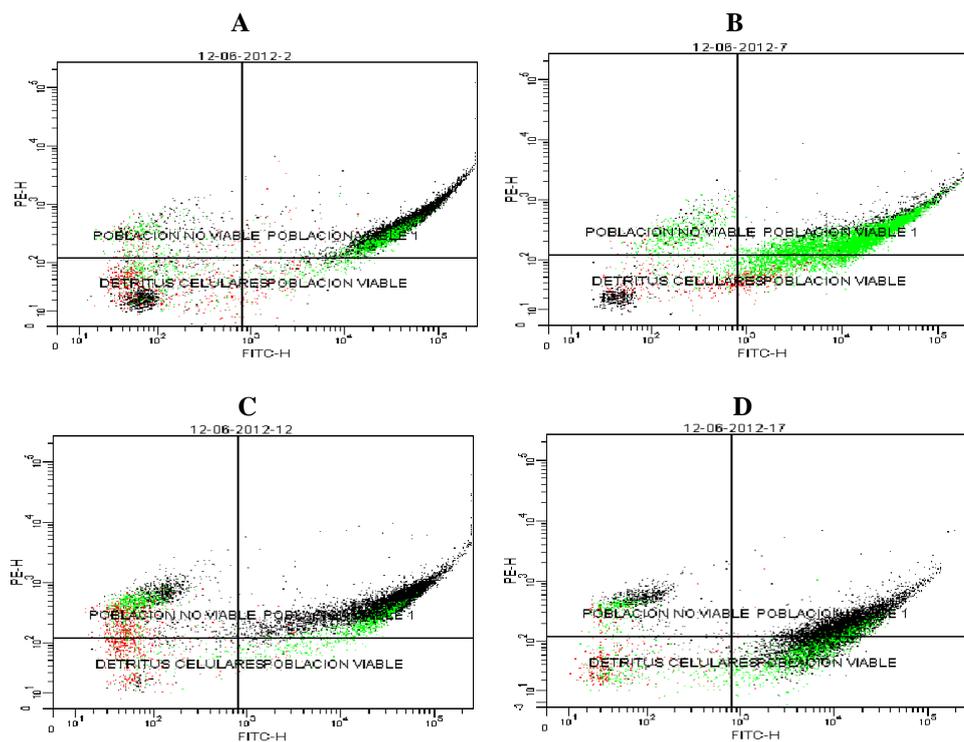


Figura 44: Medida de Viabilidad celular mediante tinción con Diacetato de Fluoresceina (DAF) y Ioduro de Propidio (IP) de diferentes muestras de microalgas cultivadas a 20°C y tras 20 días de incubación. **A)** Incubación BIL $26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ con medio de cultivo RLMO al 20% (p/v); **B)** Incubación BIL $26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ con medio de cultivo RLMO al 50% (p/v); **C)** Incubación AIL $80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y con medio de cultivo RLMO al 20% (p/v); **D)** Incubación AIL $80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y con medio de cultivo RLMO al 50% (p/v).

Tabla 42: Porcentajes de células viables y no viables dependiendo de las condiciones de cultivo de la microalga S21. **A)** Cultivo BIL 26,8 W*m⁻² y con medio diluido RLMO al 20% (p/v). **B)** Cultivo BIL 26,8 W*m⁻² y con medio diluido RLMO al 50% (p/v). **C)** Cultivo AIL 80 W*m⁻² y con medio RLMO diluido al 20% (p/v). **D)** Cultivo AIL 80 W*m⁻² y con medio RLMO diluido al 50% (p/v).

Tipo de cultivo	<i>a</i> (%)	<i>b</i> (%)	<i>c</i> (%)	<i>d</i> (%)	<i>e</i> (%)
A	11,0±0,1	59,3±1,4	70,3	12,3±0,8	17,3±0,6
B	17,9±0,4	73,7±0,4	91,6	6,1±0	2,2±0,1
C	11,4±0,3	41,6±2,0	53,0	39,0±1,1	8,0±0,6
D	54,3±0,5	14,5±1,1	68,8	16,7±0,6	14,5±1,0

a: DAF+ IP-; *b*: DAF+ IP+; *c*: Células Viables Totales (*a*+*b*); *d*: DAF- IP+ (Células no Viables); *e*: DAF- IP- (Restos Celulares).

En la **Figura 44-A** y **44-B** y **Tabla 42**, se detectan valores de 11,0±0,1% y 17,9±0,4% de células viables con sus membranas intactas (DAF+, IP-) en cultivos al 20 y 50%, p/v de dilución de nutrientes. Por otro lado, la proporción de células viables (población viable-1) que comienzan a perder dicha capacidad de homeostasis es considerablemente mayor (59,3±1,4% y 73,7±0,4%, respectivamente). Es de destacar que los mayores porcentajes de células viables totales se observaron en el ensayo realizado con BIL y al 50% de dilución del medio de cultivo RLMO (91,6%), siendo la proporción de restos celulares al finalizar el ensayo mayor en los cultivos a 20% (17,3±0,6%) que al 50% (2,2±0,1%) de concentración de nutrientes. Es de destacar, además, la baja proporción de células no viables DAF- IP+ (del 6,1±0%) en los cultivos con baja intensidad de luz y menor dilución del medio de cultivo (50% p/v).

En los ensayos a mayor intensidad de luz **Figura 44-C**, **44-D** y **Tabla 42**, también se observan una proporción significativa de poblaciones que mantiene sus membranas intactas (11,4±0,3% y 54,3±0,5%), destacándose una relación inversamente proporcional entre los valores de proporciones celulares viables (DAF+ IP-) y viables -1 (DAF+ IP+) en los cultivos realizados al 20% y 50% de dilución de nutrientes (11,4±0,3/41,6±2,0% - 14,5±1,1/54,3±0,5%).

En la **Figura 44-C**, puede observarse una población de células no viables cuyas membranas han perdido su integridad, y por ende su capacidad de homeostasis (DAF- PI+) correspondiente a un 39,0±1,1%. En igualdad de condiciones pero con el medio RLMO diluido al 50% p/v (**Figura 44-D**) la proporción de células no viables (DAF+ IP+) se reduce aproximadamente un 50% (16,7±0,6%) siendo, además, la proporción de restos celulares significativamente mayor (14,5±1,0%).

3. Estudio de Polarización de membrana de la microalga S21, mediante tinción con Yoduro de 3.3.- Dihexilcarbocianina (DiOC₆) y Ioduro de Propidio (IP).

3.1. Ensayo realizado a 10°C durante 8 días de incubación en presencia de alta y baja intensidad de luz y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% y 50% (p/v).

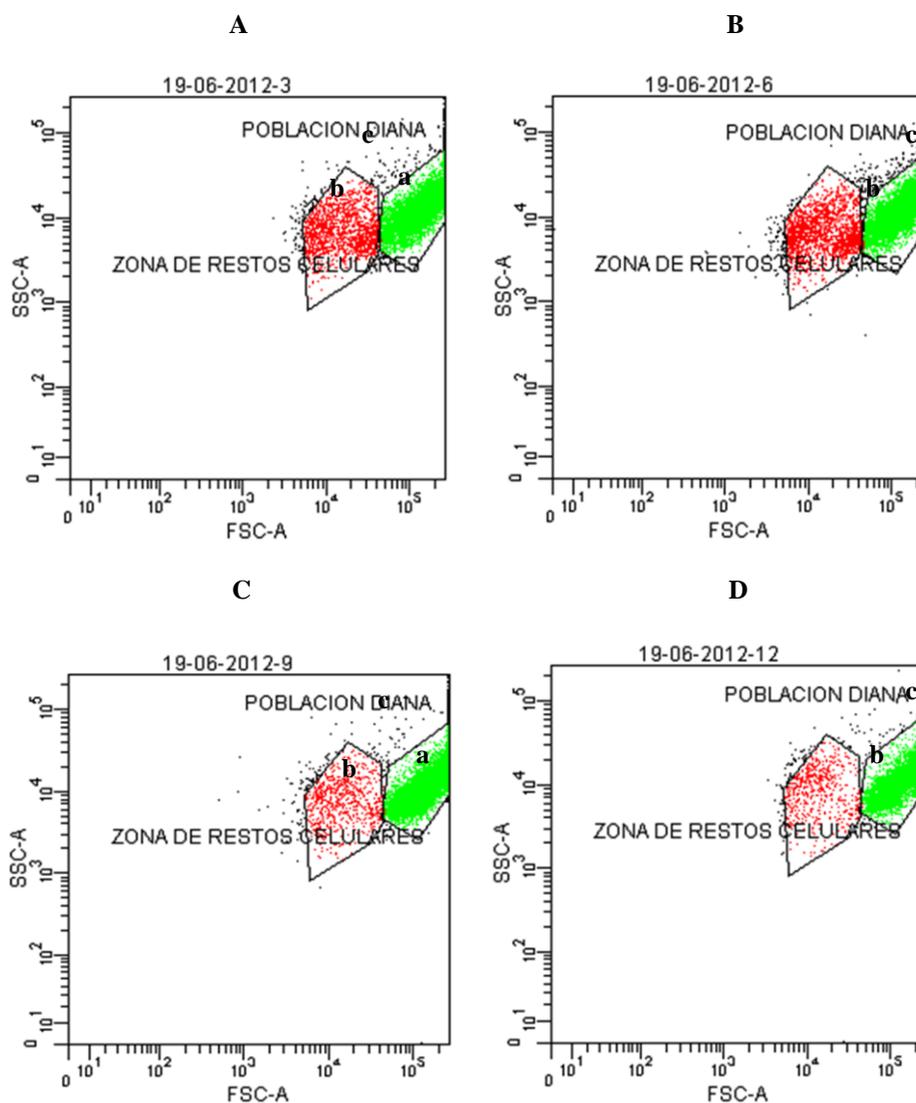


Figura 46: Citograma de Poblaciones Diana y Restos Celulares (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y) de la microalga S21 cultivada durante 8 días a 10°C en medio de cultivo RLMo y a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. **BIL:** Baja intensidad lumínica (26,8 w*m²). **AIL:** Alta intensidad lumínica (80 w*m²). **a:** Zona de Población Diana (verde) de tamaño aparentemente mayor. **b:** Zona de Restos celulares (rojo) de tamaño aparentemente menor. **c:** Zona de no Lectura.

Tabla 43: Porcentaje de poblaciones diana y de restos celulares de la microalga S21 cultivada durante 8 días a 10°C en medio de cultivo RLMO y a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. Lectura Total: 10,000 células/ensayo.

Tipo de cultivo	a (%)	b (%)	c = 100 - [a+b] (%)
A	36,6±0,2	15,9±0,2	38,1
B	26,3±2,2	17,7±0,3	7,2
C	55,1±2,5	6,8±0,1	47,5
D	87,3±5,5	5,5±0,2	56

a: Población Diana, b: Restos celulares, c: Restos celulares no leídos

En la **Figura 46** se observan dos subpoblaciones de diferente tamaño (verde y rojo) correspondiente a la población diana y restos celulares, en el estudio de polarización de membranas.

En la **Figura 46-A**, correspondiente a cultivos (20%, p/v) con baja intensidad lumínica (BIL), de 10.000 células analizadas 36,6±0,2% corresponden a la población DIANA y un 15,9±0,2% a los restos celulares; porcentajes similares se obtuvieron en la **Figura 46-B** (cultivo BIL al 50%, p/v) con resultados de 26,3±2,2% y 17,7±0,3% respectivamente. (**Tabla 43**).

En el caso de los análisis representados en los citogramas de las **Figuras 46-C** y **45-6**, correspondiente a los cultivos con mayor intensidad de iluminación (AIL), se pudo observar que con el medio al 50% de dilución, la población DIANA representó un 55,1±2,5% de las 10,000 células leídas y que un 6,8±0,1% fueron restos celulares (**Tabla 43**). Por otro lado, cuando el ensayo se realizó con la misma intensidad de iluminación pero con mayor dilución (20%, p/v) el porcentaje de población DIANA estudiada fue algo menor (87,3±5,5%) siendo el porcentaje de restos celulares de un 5,5±0,2% (**Tabla 43**).

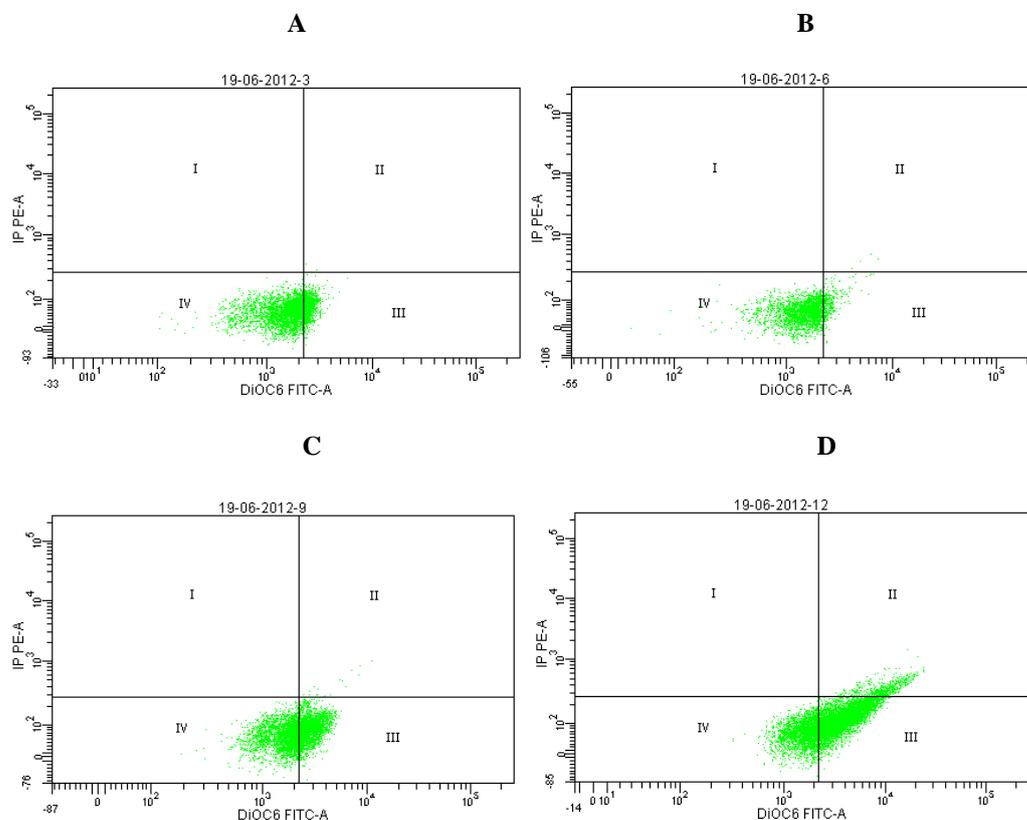


Figura 47: Citograma de Polarización de Membrana. Fluorescencia emitida tras la tinción con DiOC₆ e IP de las poblaciones DIANA (verde) de diferentes cultivos de la microalga S21 cultivadas a 10°C durante 8 días en el medio de cultivo RLMO a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. **BIL:** Baja intensidad lumínica (26,8 w*m²). **AIL:** Alta intensidad lumínica (80 w*m²). **I:** Células no Viables. **II:** Células No Viables polarizadas. **III:** Células Viables altamente polarizadas. **IV:** Células Viables polarizadas.

Tabla 44: Porcentaje de población DIANA con sus sistemas membranosos polarizados tras la tinción con DiOC₆ e IP de la microalga S21 cultivadas a 10°C durante 8 días en el medio de cultivo RLMO a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v) y condiciones de iluminación. **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%.

Tipo de cultivo	Células no Viables (%)		Células Viables (%)	
	I	II	III	IV
A	0	0,1±0	16,3±0.3	83,6±0.3
B	0	0	11,7±2.7	88,3±2.7
C	0	0,3±	46,8±2.3	52,9±2.3
D	0	2,8±1.8	66,2±0.3	31,0±2.1

I: DiOC₆ (-) IP (+) cls no viables. **II:** DiOC₆ (+) IP (+); cls no viables polarizadas. **III:** DiOC₆ (++) IP(-) cls viables altamente polarizadas. **IV:** DiOC₆ (+) IP(-) cls viables polarizadas.

En la **Figura 47**, se describe la fluorescencia emitida por la Población DIANA, y donde pueden apreciarse diferentes niveles de polarización de los sistemas membranosos celulares.

En la **Figura 47-A** y **Tabla 44**, correspondiente a un cultivo con 20% de nutrientes y baja intensidad de iluminación se observa que un $83,6\pm 0,3\%$ de población DIANA presentaba sus sistemas membranosos polarizados y que un $16,3\pm 0,3\%$ tenía sus membranas altamente polarizadas; además se puede observar que bajo estas condiciones de cultivo prácticamente la totalidad de las células de la población Diana eran viables. Resultados muy similares se obtuvieron cuando se realizó el ensayo en las mismas condiciones de luminosidad ($26,8\text{w}\cdot\text{m}^2$) pero con mayor cantidad de nutrientes (**Figura 47-B**), detectándose un $88,3\pm 2,7\%$ de la población DIANA viable y sus membranas polarizadas (DiOC_6+ IP-), y un $11,7\pm 2,7\%$ de población viable y membranas altamente polarizada. **Tabla 44**.

En los ensayos realizados a mayor intensidad de iluminación (**Figura 47-C** y **47-D**) se pudo apreciar que, en relación a los ensayos con menor intensidad lumínica, la población DIANA con membranas altamente polarizadas aumentó significativamente alcanzando porcentajes de $52,9\pm 2,3\%$ y $31,0\pm 2,1\%$ en los cultivos con 20% y 50% (p/v) del medio RLMO respectivamente.

Se puede apreciar que en el caso de cultivos con elevada iluminación y altos contenidos nutricionales el porcentaje de células altamente polarizadas [DiOC_6 (++) IP(-)] superaba al de células polarizadas [DiOC_6 (+) IP(-)], detectándose dicha población en la **Figura 47-D** en el cuadrante inferior derecho.

3.2.- Ensayo realizado a 10°C durante 20 días de incubación en presencia de alta y baja intensidad de luz y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% y 50% (p/v).

| 180

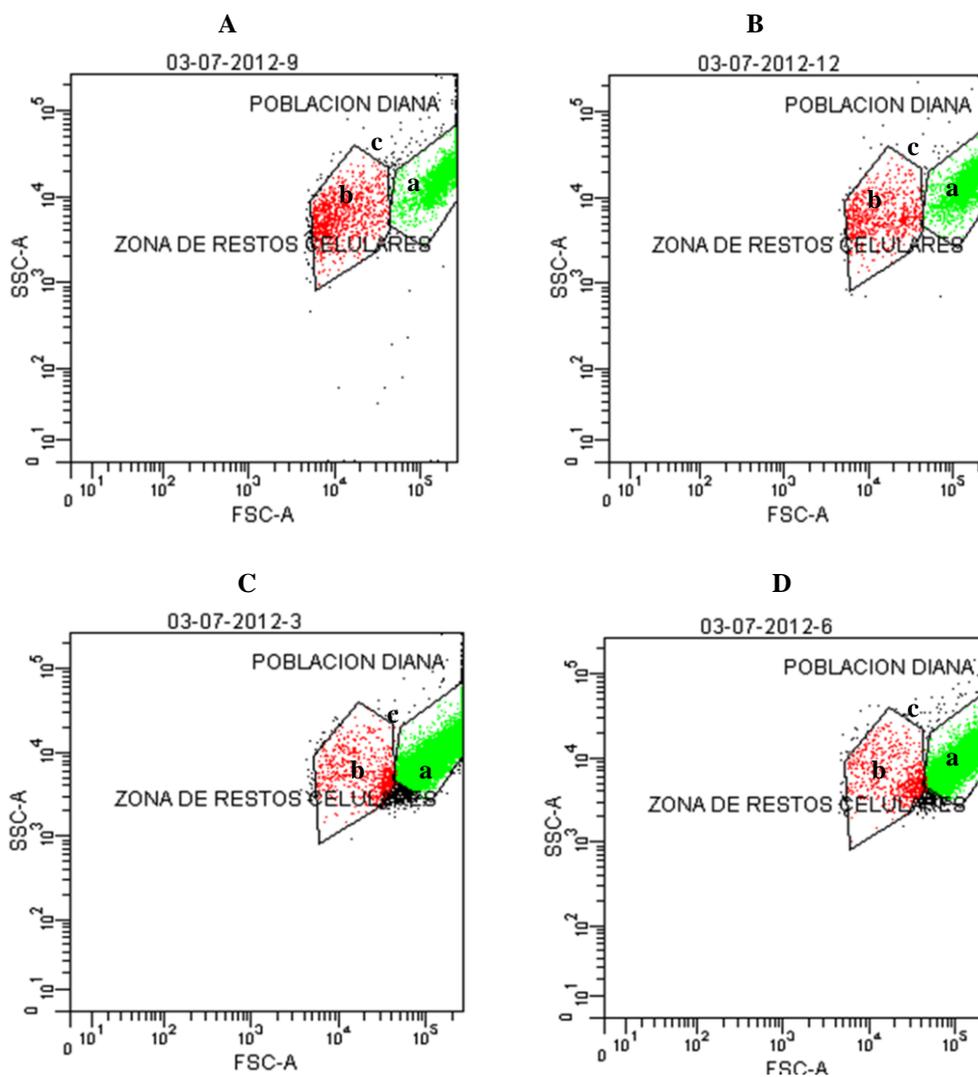


Figura 48: Citograma de poblaciones diana y restos celulares (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y) de la microalga S21 cultivada durante 20 días a 10°C en medio de cultivo RLMo y a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A**) Incubación BIL, 20%; **B**) Incubación BIL, 50%; **C**) Incubación AIL, 20%; **D**) Incubación AIL, 50%. **BIL:** Baja intensidad lumínica (26,8 w*m²). **AIL:** Alta intensidad lumínica (80 w*m²). **a:** Zona de Población Diana (verde) correspondiente a fluorescencia de DiOC₆. **b:** Zona de Restos celulares (rojo) correspondiente a fluorescencia de IP. **c:** Zona de no Lectura.

Tabla 45: Porcentaje de poblaciones diana y de restos celulares de la microalga S21 cultivada durante 20 días a 10°C en medio de cultivo RLMo y a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. Lectura Total: 10,000 células/ensayo.

Tipo de cultivo	a (%)	b (%)	c = 100 - [a+b] (%)
A	62,8±1.2	28,2±1.0	9,0
B	77,7±1.5	17,6±0.7	4,7
C	88,1±1.4	8,4±0.5	3,5
D	88,5±0.4	7,7±1.1	3,8

a: Población Diana. b: Restos celulares. c: Restos celulares no leídos

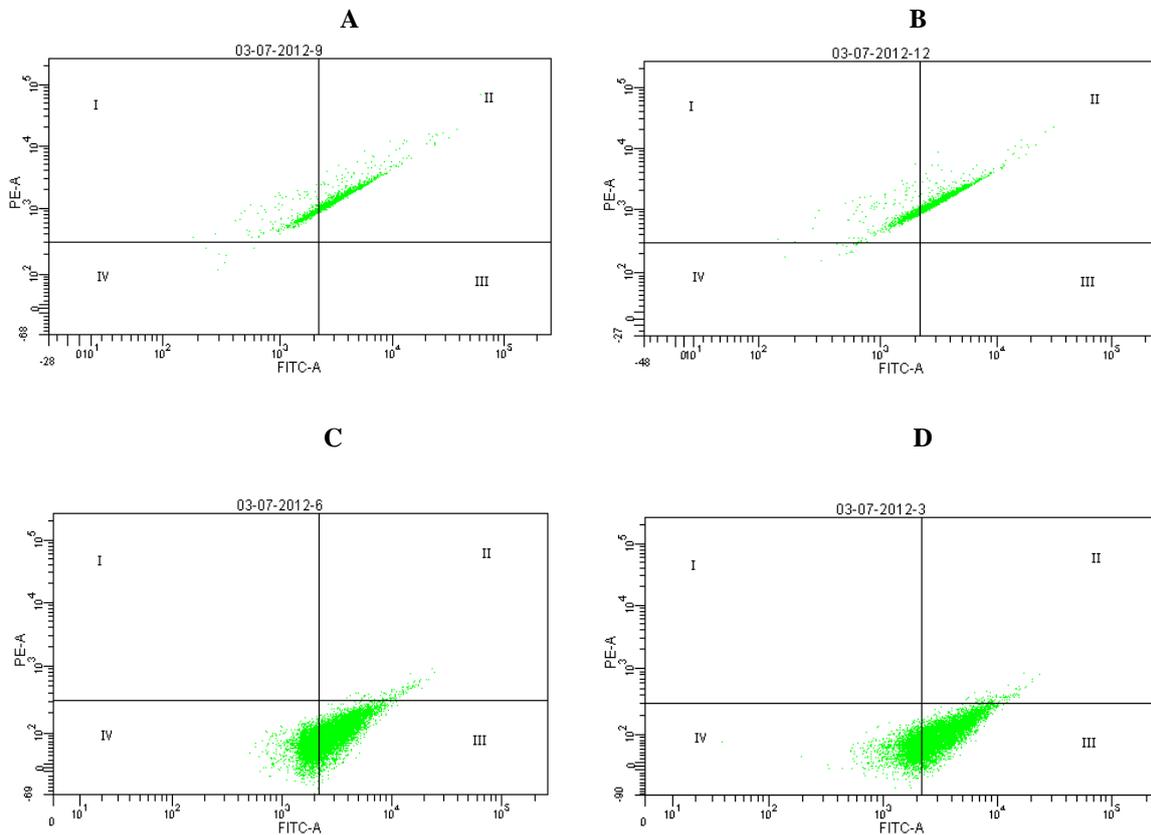


Figura 49: Citograma de Polarización de Membrana. Fluorescencia emitida tras la tinción con DiOC₆ y PI de las poblaciones DIANA de diferentes cultivos de la microalga S21 cultivadas a 10°C durante 20 días en el medio de cultivo RLMo a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. **BIL:** Baja intensidad lumínica (26,8 w*m²). **AIL:** Alta intensidad lumínica (80 w*m²). **I:** Células no Viables. **II:** Células No Viables polarizadas. **III:** Células Viables altamente polarizadas. **IV:** Células Viables polarizadas.

Tabla 46: Porcentaje de población DIANA con sus sistemas membranosos polarizados tras la tinción con DiOC₆ y IP de la microalga S21 cultivadas a 10° C durante 20 días en el medio de cultivo RLMO a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v). **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%.

| 182

Tipo de cultivo	Células no Viabiles (%)		Células Viabiles (%)	
	I	II	III	IV
A	20,6±0,8	79,2±0,9	0,0	1,1±1,6
B	22,2±0,6	77,1±0,7	0,0	0,7±0,1
C	88,1±1,4	0,8±0,5	67,8±1,5	31,4±2,0
D	0,0	0,4±0,2	63,8±1,4	35,8±1,5

I: DiOC₆ (-) IP (+) cls no viabiles. **II:** DiOC₆ (+) IP (+); cls no viabiles polarizadas. **III:** DiOC₆ (++) IP(-) cls viabiles altamente polarizadas. **IV:** DiOC₆ (+) IP(-) cls viabiles polarizadas.

En la **Figura 48**, se observa en color verde la fluorescencia emitida por la población DIANA y por otro lado en rojo, los restos celulares, en el estudio de polarización de membranas mitocondriales. En la **Figura 48-A**, de un total de 10.000 células analizadas, un 62,8±1.2% corresponde a la población DIANA y un 28,2±1.0% corresponde a los restos celulares, existiendo un 9 % de células no leídas. (**Tabla 45**).

Por otro lado, en la **Figura 48-B**, la población DIANA comprende un 77,7±1.5% y los restos celulares un 17,6±0.7 %. Tanto la **Figura 48-A** como **47-B** representan los ensayos realizados a baja intensidad de iluminación pero como distintas diluciones, al 20% y al 50%.

Por otro lado las **Figuras 48-C** y **48-D**, corresponden a los cultivos realizados con mayor intensidad de iluminación, se observa que con el medio al 20% de dilución, **Figura 48-C**, la población DIANA es de un 88,1±1.4%, y que solo un 8,4±0.5% corresponde a restos celulares, por otro lado, cuando el ensayo se realizó con la misma intensidad de iluminación pero con mayor concentración de nutrientes (50% de dilución, **Figura 48-D**) se observa que la población DIANA es de un 88,5±0.4% y un 7,7±1.1% corresponde a restos celulares. **Tabla 45**.

En la **Figura 49**, se describe las diferentes fluorescencias emitidas por las subpoblaciones presentes en la Población DIANA, observándose diferentes niveles de polarización de membrana mitocondrial así como la viabilidad celular en todos los ensayos. En la **Figura 49-A** y **49-B**, se observa que, en ambos casos no existen células viabiles altamente polarizadas, sin embargo, aquellas células que están perdiendo la capacidad de homeóstasis (DiOC₆+ IP+), si presentan una alta polaridad de membrana mitocondrial, observándose un 79,2±0,9% de células con esta condición fisiológica, cuando el ensayo se realizó al con el medio de cultivo al 20% de dilución,

y un $77,1\pm 0,7\%$ cuando el ensayo se realizó bajo las mismas condiciones de luminosidad pero esta vez con mayor concentración de nutrientes (50% dilución) **Tabla 46**. Por otro lado, se observa que bajo estas condiciones de iluminación, en ambos ensayos, es decir con el medio de cultivo al 20% y 50% de dilución, se observa un porcentaje de células no viables (DiOC6- IP +) correspondiente a un $20,6\pm 0,8\%$ y un $22,2\pm 0,6\%$ respectivamente.

En los ensayos realizados a mayor intensidad de iluminación (**Figura 49-C y 49-D**) se puede apreciar que, en relación a los ensayos a menor intensidad de iluminación, si existe una subpoblación altamente viable cuyas membranas mitocondriales se encuentran altamente polarizadas (DiOC6+ IP-), representando un $67,8\pm 1,5\%$ de la población DIANA cuando el ensayo se realizó con el medio de cultivo al 20% de dilución, y que cuando se realizó el mismo ensayo pero esta vez con mayor concentración de nutrientes (50% de dilución) las células altamente viables y con las membranas mitocondriales altamente polarizadas, estas representaban un $63,8\pm 1,4\%$ del total de la población DIANA. Bajo estas condiciones, y por el contrario del ensayo anterior, en ambas diluciones ensayadas (20% y 50% de dilución), no se detecta una subpoblación no viable.

3.3.- Ensayo realizado a 20°C durante 8 días de incubación en presencia de alta y baja intensidad de luz y con medio de cultivo RLMO diluido a 20% y 50% (p/v)

| 184

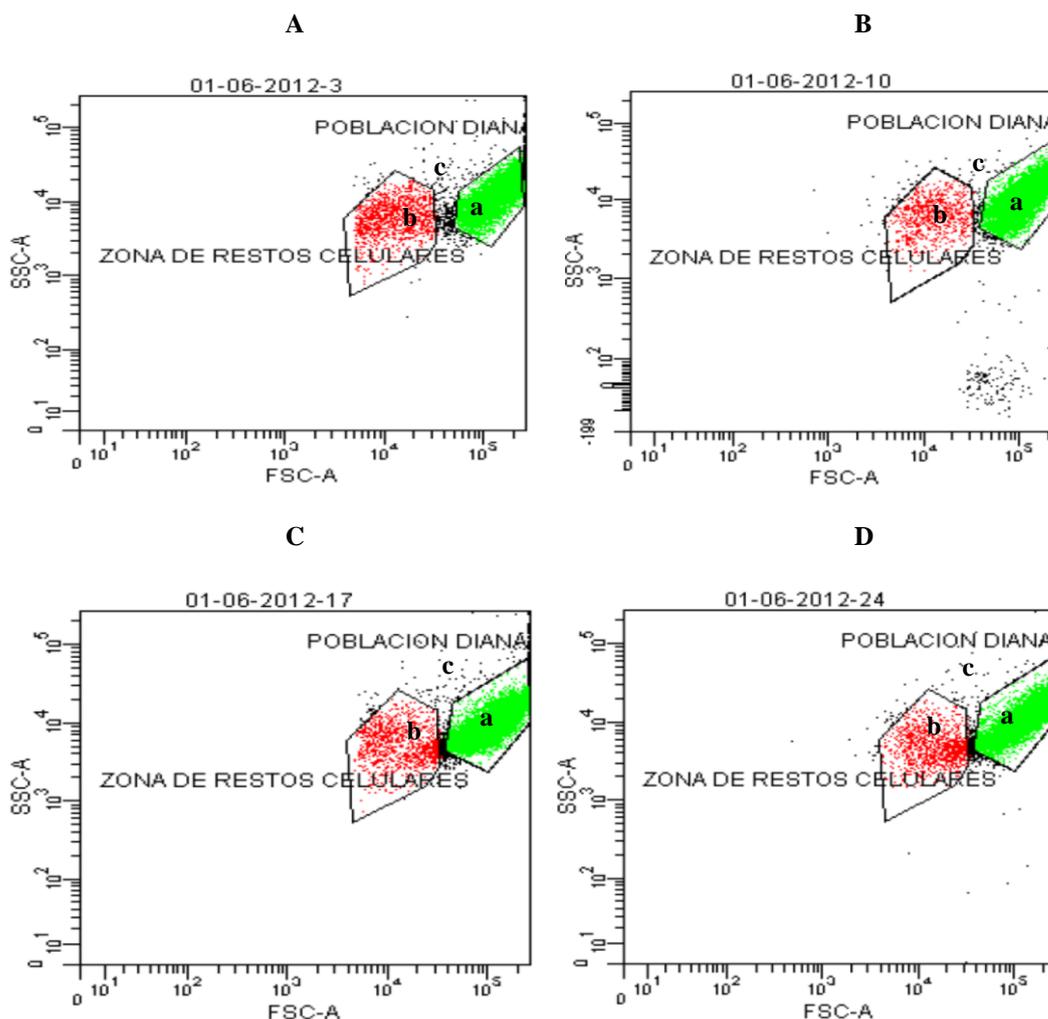


Figura 50: Citograma de poblaciones diana y restos celulares (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y) de la microalga S21 cultivada durante 8 días a 20°C en medio de cultivo RLMO y a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. **BIL:** Baja intensidad lumínica (26,8 w*m²). **AIL:** Alta intensidad lumínica (80 w*m²). **a:** Zona de Población Diana (verde) correspondiente a fluorescencia de DiOC₆. **b:** Zona de Restos celulares (rojo) correspondiente a fluorescencia de IP. **c:** Zona de no Lectura.

Tabla 47: Porcentaje de poblaciones diana y de restos celulares de la microalga S21 cultivada durante 8 días a 20°C en medio de cultivo RLMO y a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. Lectura Total: 10,000 células/ensayo.

Tipo de cultivo	a (%)	b (%)	c = 100 - [a+b] (%)
A	79,9±0.3	11,4±0.4	8,7
B	82,4±2.8	10,3±0.3	7,3
C	85,7±0.2	10,9±0.7	3,4
D	85,5±0.4	10,8±0.6	3,7

a: Población Diana. b: Restos celulares. c: Restos celulares no leídos

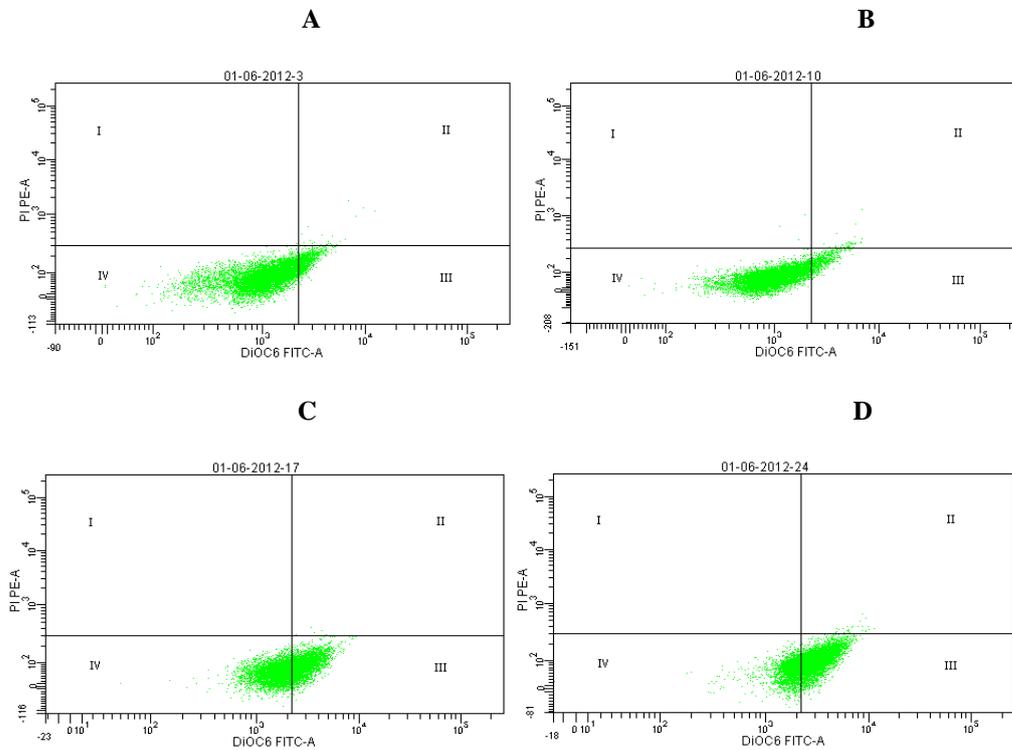


Figura 51: Citograma de Polarización de Membrana. Fluorescencia emitida tras la tinción con DiOC₆ y PI de las poblaciones DIANA de diferentes cultivos de la microalga S21 cultivadas a 20°C durante 8 días en el medio de cultivo RLMO a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. **BIL:** Baja intensidad lumínica (26,8 w*m²). **AIL:** Alta intensidad lumínica (80 w*m²). **I:** Células no Viables. **II:** Células No Viables polarizadas. **III:** Células Viables altamente polarizadas. **IV:** Células Viables polarizadas.

Tabla 48: Porcentaje de población DIANA con sus sistemas membranosos polarizados tras la tinción con DiOC₆ y IP de la microalga S21 cultivadas a 20° C durante 8 días en el medio de cultivo RLMO a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v). **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%.

Tipo de cultivo	Células no Viables (%)		Células Viables (%)	
	I	II	III	IV
A	0,0	0,1±0	6,1±0,2	93,8±0,3
B	0,0	0,2±0,1	6,3±0,5	93,5±0,6
C	0,0	0,1±0,1	45,5±0,8	54,4±0,9
D	0,0	0,5±0,1	71,5±0,6	28,1±0,6

I: DiOC₆ (-) IP (+) cls no viables. **II:** DiOC₆ (+) IP (+); cls no viables polarizadas. **III:** DiOC₆ (++) IP(-) cls viables altamente polarizadas. **IV:** DiOC₆ (+) IP(-) cls viables polarizadas.

En la **Figura 50** se observa la fluorescencia emitida la población DIANA estudiada (en verde) y por otro lado los restos celulares (en rojo), en el estudio de polarización de membranas. En la **Figura 50A**, de 10.000 células analizadas, un 79,9±0.3% corresponde a la población diana y un 11,4±0.4% a los restos celulares cuando las células de la microalga S21 se incubó en condiciones de baja luminosidad y con el medio de cultivo RL diluido al 20%. Y en la **Figura 50B**, se puede observar que la población DIANA es de un 82,4±2.8% y que un 10,3±0.3% corresponde a restos celulares.

En el caso de las **Figuras 50-C y 50-D**, correspondiente a los cultivos mayor intensidad de luz y al 20% y 50% de dilución, se observa que el porcentaje de que la población DIANA estudiada es significativamente mayor que en los ensayos a baja intensidad de luz (85,7±0.2% y 85,5±0.4%), respectivamente. Es de destacar que de las proporciones obtenidas y representadas en la **Tabla 47** se han referenciado a 10.000 células medidas, y se aprecia entre un 3-9% de células no leídas.

En la **Figura 51** se describe la fluorescencia emitida por diferentes subpoblaciones de la Población Diana con diferentes niveles de polarización de membrana mitocondrial así como su viabilidad celular. En la **Figura 51-A** se observa una población poco viable y poco polarizada, representada por un 93,8±0,3% del total de células analizadas y solo un 6,1±0,2% de células corresponden a la proporción altamente viable cuyas membranas mitocondriales están altamente polarizadas **tabla 48**.

En la Figura **51-B**, con la misma intensidad de iluminación pero con mayor concentración de nutrientes (50% de dilución) se detecta un comportamiento celular similar, es decir la población poco viable y con membranas poco polarizadas (DiOC₆- IP+) es la mayoritaria, representando un 93,5±0,6%, y la población viable altamente polarizada (DiOC₆+ IP-), un 6,3±0,5%.

Por otro lado, cuando los estudios se realizaron con mayor intensidad de luz la proporción de células altamente viables y altamente polarizadas (DiOC₆++ IP-) aumentó significativamente en los cultivos realizados con medio RL tanto al 20% como al 50%, (**Figuras 51-C y 51-D**) en relación a los cultivos realizados en ausencia de luz (45,5±0,8% y 71,5±0,6% respectivamente). También se puede apreciar que bajo estas mismas condiciones, la población de células poco viables cuyas membranas no se encuentran altamente polarizadas disminuye en relación a los ensayos anteriores, pasando de 93,8±0,3% en condiciones de baja luminosidad, a un 54,4±0,9% con el medio de cultivo al 20% de dilución, y que cuando se realizó el ensayo con mayor concentración de nutrientes (50% de dilución) disminuyó de un 93,5±0,6% en condiciones de baja luminosidad, a un 28,1±0,6%. **Tabla 48.**

3.4.- Ensayo realizado a 20°C durante 20 días de incubación en presencia de alta y baja intensidad de luz y con medio de cultivo RLMo diluido a 20% y 50% (p/v).

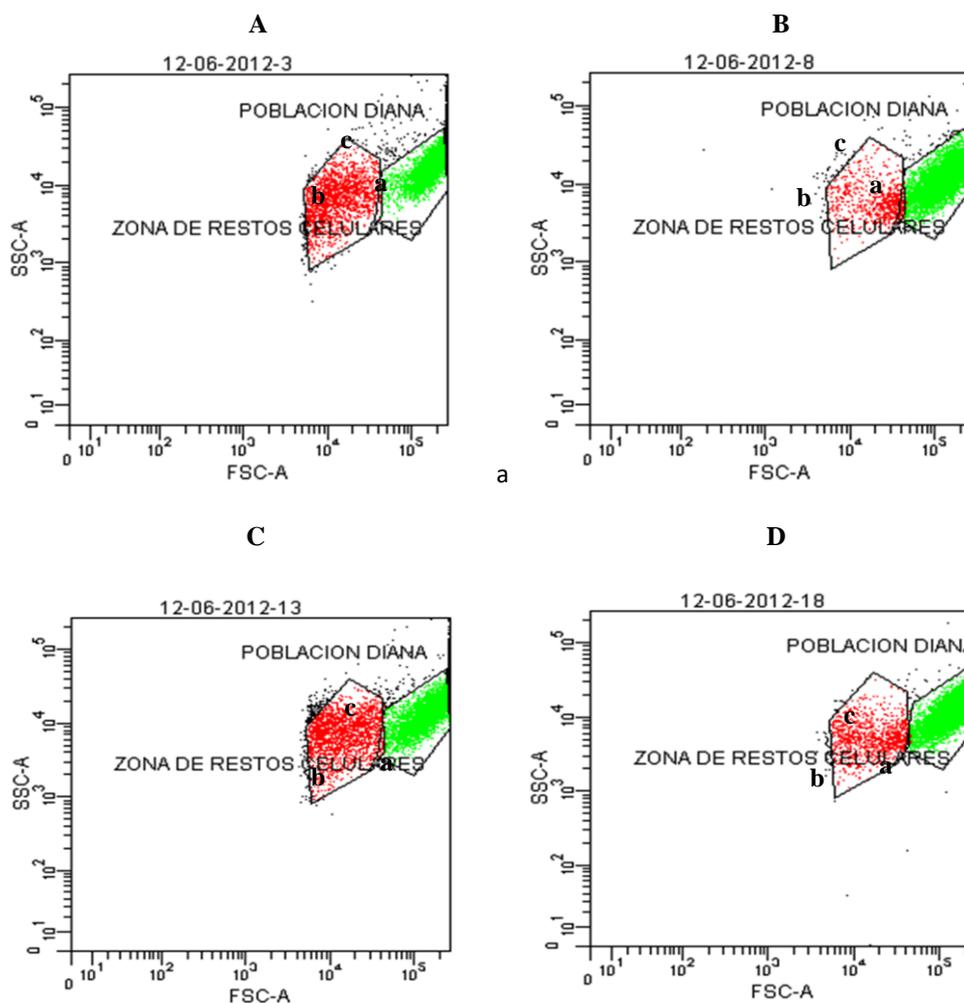


Figura 52: Citograma de poblaciones diana y restos celulares (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y) de la microalga S21 cultivada durante 20 días a 20°C en medio de cultivo RLMo y a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A**) Incubación BIL, 20%; **B**) Incubación BIL, 50%; **C**) Incubación AIL, 20%; **D**) Incubación AIL, 50%. **BIL**: Baja intensidad lumínica (26,8 $w \cdot m^{-2}$). **AIL**: Alta intensidad lumínica (80 $w \cdot m^{-2}$). **a**: Zona de Población Diana (verde) correspondiente a fluorescencia de DiOC₆. **b**: Zona de Restos celulares (rojo) correspondiente a fluorescencia de IP. **c**: Zona de no Lectura.

Resultados

Tabla 49: Porcentaje de poblaciones diana y de restos celulares de la microalga S21 cultivada durante 20 días a 20°C en medio de cultivo RLMO y a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. Lectura Total: 10,000 células/ensayo.

Tipo de cultivo	a (%)	b (%)	c = 100 - [a+b] (%)
A	21,0±1.0	17,2±0.4	61,8
B	52,6±2.7	8,7±1.6	38,7
C	17,4±0.5	19,3±0.8	63,3
D	17,7±1.1	11,0±0.2	71,3

a: Población Diana. b: Restos celulares. c: Restos celulares no leídos

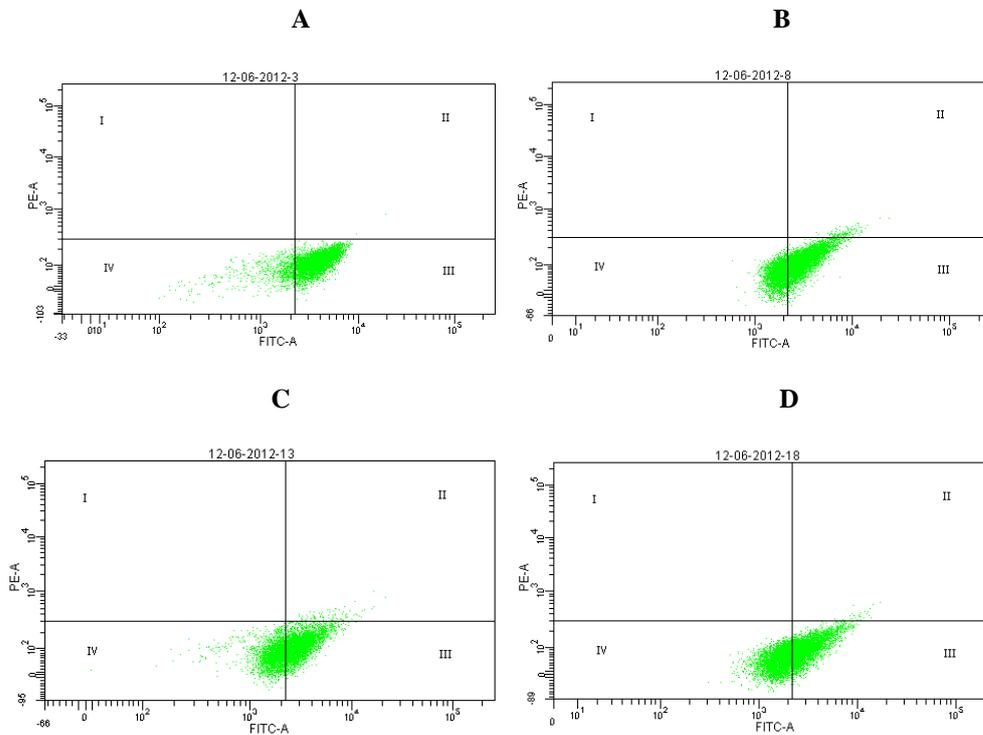


Figura 53: Citograma de Polarización de Membrana. Fluorescencia emitida tras la tinción con DiOC₆ y PI de las poblaciones DIANA de diferentes cultivos de la microalga S21 cultivadas a 20°C durante 20 días en el medio de cultivo RLMO a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v): **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%. **BIL:** Baja intensidad lumínica (26,8 w*m²). **AIL:** Alta intensidad lumínica (80 w*m²). **I:** Células no Viables. **II:** Células No Viables polarizadas. **III:** Células Viables altamente polarizadas. **IV:** Células Viables polarizadas.

Tabla 50: Porcentaje de población DIANA con sus sistemas membranosos polarizados tras la tinción con DiOC₆ y IP de la microalga S21 cultivadas a 20° C durante 20 días en el medio de cultivo RLMO a diferentes concentraciones de nutrientes (p/v). **A)** Incubación BIL, 20%; **B)** Incubación BIL, 50%; **C)** Incubación AIL, 20%; **D)** Incubación AIL, 50%.

Tipo de cultivo	Células no Viables (%)		Células Viables (%)	
	I	II	III	IV
A	0,0	0,0	49,4±1,3	50,6±1,3
B	0,0	0,4±0,1	43,4±2,2	56,1±2,3
C	0,1±0	0,2±0	7,0±0,5	92,7±0,5
D	0,0	0,0	7,7±1,4	92,3±1,4

I: DiOC₆ (-) IP (+) cls no viables. **II:** DiOC₆ (+) IP (+); cls no viables polarizadas. **III:** DiOC₆ (++) IP(-) cls viables altamente polarizadas. **IV:** DiOC₆ (+) IP(-) cls viables polarizadas.

En la **Figura 52**, En el estudio de polarización de membranas, se observa una población DIANA que emite fluorescencia (en verde) y por otro lado los restos celulares (en rojo), En la **Figura 52-A**, de un total de 10.000 células analizadas, un 21,0±1.0% corresponde a la población DIANA y un 17,2±0.4 % a los restos celulares cuando las células de la microalga S21 cuando se incubó en condiciones de baja luminosidad y con el medio de cultivo RL diluido al 20%. Y en la **Figura 52-B**, se puede observar que la población DIANA es mayor cuando se cultivó con mayor concentración de nutrientes (50% de dilución), representando el 52,6±2.7% y que solo un 8,7±1.6% corresponde a restos celulares.

Resultados similares se obtuvieron cuando se realizaron los ensayos con mayor intensidad de iluminación. Las **Figuras 52-C** y **52-D**, correspondiente a los cultivos mayor intensidad de luz y al 20% y 50% de dilución respectivamente, se observa que el porcentaje a 10,000 células mediadas que representa la población DIANA es de un 17,4±0.5%, mientras que en este mismo ensayo un 19,3±0.8% corresponde a restos celulares. **Tabla 49.**

En la **Figura 53** se observa la fluorescencia emitida por diferentes subpoblaciones existentes en la Población DIANA con diferentes niveles de polarización de membrana mitocondrial así como su viabilidad celular. En la **Figura 53-A**, se aprecia existen dos subpoblaciones viables mayoritarias, una de ellas corresponde a la proporción de células que se encuentra altamente viable cuyas mitocondrias están altamente polarizadas (DiOC₆+ IP-), representando un 49,4±1,3% del total de células estudiadas, mientras que la otra proporción corresponde a células poco viables cuyas membranas mitocondriales se encuentran en un estado

de baja polarización (DiOC₆- IP+), representando un 0 % del total. Resultados similares se observan, cuando se realizó el mismo ensayo con la misma baja intensidad de iluminación pero con mayor concentración de medio de cultivo (50% de dilución), obteniendo una proporción de células (DiOC₆+ IP-) de un 0 % y de células (DiOC₆- IP+) de un 56,1±2,3%. **Tabla 50.**

En las Figuras **53-C** y **53-D**, que representan los ensayos realizados con alta intensidad de iluminación, se observa que la población altamente viable y altamente polarizada (DiOC₆+ IP) disminuye en ambas diluciones ensayadas, en relación a los ensayos realizados con menor intensidad, obteniéndose también dos poblaciones de células viables mayoritarias.

Por un lado, en los ensayos realizados con el medio de cultivo al 20% de dilución, representados en la **Figura 53-C** se observa que, la población altamente viable y altamente polarizada (DiOC₆++ IP-), representan solo un 7,0±0,5% del total de células, mientras que la otra proporción de células poco viables y bajamente polarizadas representan un 92,7±0,5% del total de células estudiadas. Por otro lado, resultados muy similares se observaron en los ensayos realizados bajo las mismas condiciones de luminosidad, pero con mayor concentración de nutrientes del medio de cultivo (50% de dilución), observándose solo un 7,7±1,4% de células (DiOC₆+ IP-) y un 92,3±1,4% de células (DiOC₆- IP+). En ambas diluciones ensayadas, se observa que en los ensayos realizados con mayor intensidad de iluminación, aumenta la proporción de células que son poco viables cuyas membranas mitocondriales están bajamente polarizadas (DiOC₆- IP+). **Tabla 50.**

4.- Estudio de la producción de lípidos polares y neutros de la microalga S21 en medio de cultivo RLMo mediante tinción con Rojo Nilo

4.1.- Ensayos realizados a 10°C durante 8 días de cultivo

| 192

4.1.1. Cultivo a 10°C durante 8 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).

En la **Figura 54-A**, de las 10.000 células analizadas se observan dos subpoblaciones "P1" de la microalga S21 teñidas con Rojo Nilo, indicativo de la presencia de lípidos en su interior. Tras analizar la población P1 del Grupo 1 correspondiente al $84,5 \pm 4,5$ % del total de 10.000 células (**Figura 54-B**), se detectó un $13,6 \pm 1,0$ % de población con lípidos neutros (P2) y un $2,6 \pm 0,7$ % de lípidos polares (P3) respecto a P1.

Por otro lado, y tras analizar la subpoblación P1 del Grupo 2, ésta supuso el $3,6 \pm 0,3$ % del total celular; la población P2 con lípidos neutros supuso el 100% de la población P1 del Grupo 2, no detectándose ningún porcentaje de población con lípidos polares.

Esto nos indica que bajo condiciones de cultivo con baja intensidad lumínica y baja concentración de nutrientes del medio de cultivo RLMo la proporción de población celular con lípidos neutros y polares en los dos análisis realizados es significativamente baja. (**Tabla 51**).

Tabla 51. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 10°C/8d, BIL, RLMo (20%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	$84,5 \pm 4,5$	$3,6 \pm 0,3$
P2	$13,6 \pm 1,0$	$99,6 \pm 0,5$
P3	$2,6 \pm 0,7$	0

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

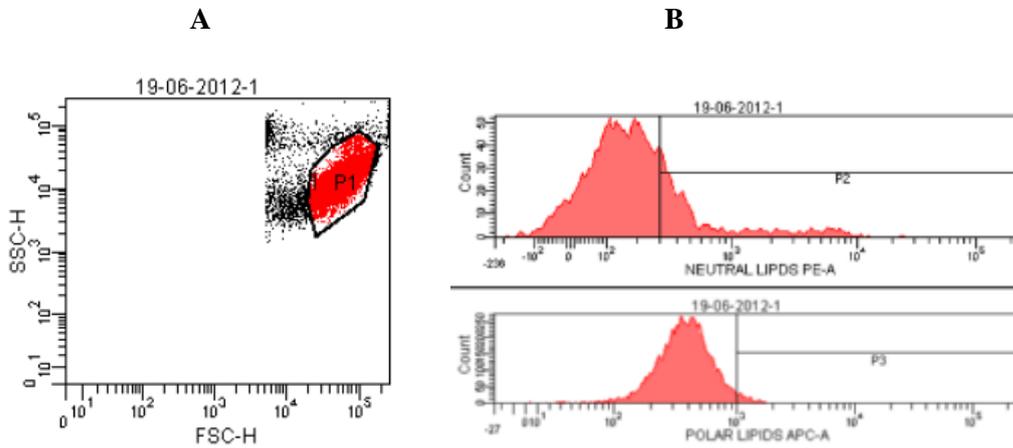
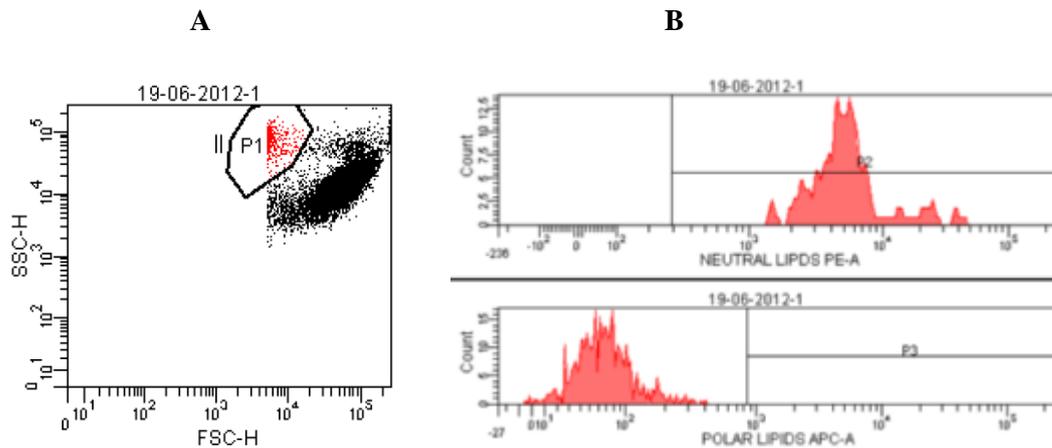
Grupo 1**Grupo 2**

Figura 54: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 8 días de cultivo a 10°C de la microalga S21 con baja intensidad de iluminación (BIL) y con medio de cultivo RLMo al 20% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.1.2.- Cultivo a 10°C durante 8 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v)

Al igual que en el caso anterior, se analizaron 10.000 células de las cuales la población P1 del Grupo 1 supuso el $56\pm 0,5$ % del total celular.

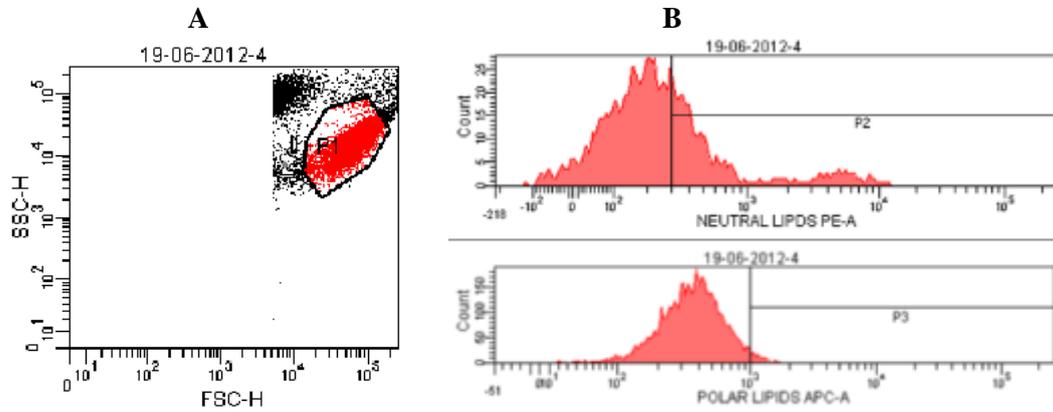
En la **Figura 55-B** para el caso de la población P1 (Grupo 1) estudiada, la subpoblación con lípidos neutros (P2) representó un $6,1\pm 0,9$ % del total de P1, relativamente similar ($3,7\pm 0,4$ %) a la subpoblación P3. En el caso del análisis de la población P1 (Grupo 2), cuya diferencia con la población P1 del Grupo 1 es morfológica, el porcentaje analizado respecto al total de 10.000 células fue del $32,2\pm 0,9$ (P1), siendo la población con lípidos neutros de un $99,8\pm 0,2$ % respecto a ésta. Se puede observar además que no se detecta subpoblación P3 en este último caso, es decir células con lípidos polares. (**Tabla 52**).

Tabla 52. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 10°C/8d, BIL, RLMo (50%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	$56,5\pm 0,5$	$32,2\pm 0,9$
P2	$6,1\pm 0,9$	$99,8\pm 0,2$
P3	$3,7\pm 0,4$	0

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

Grupo 1



Grupo 2

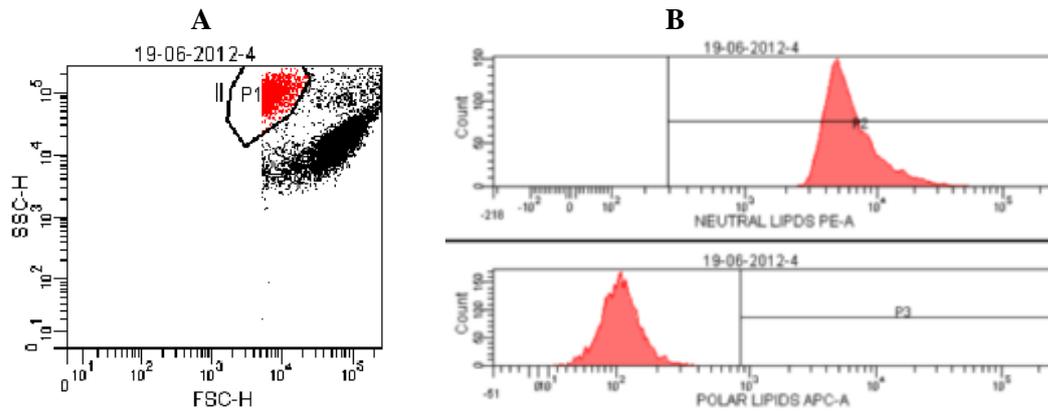
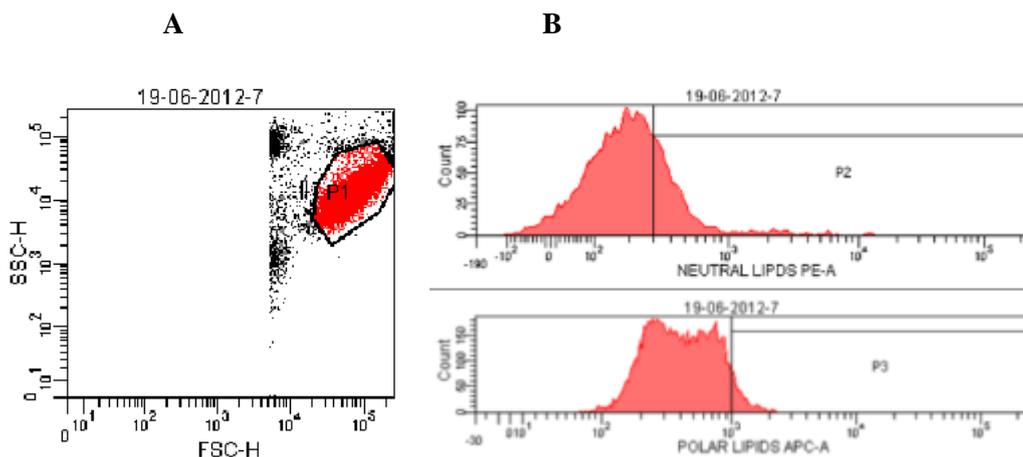


Figura 55: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 8 días de cultivo a 10°C de la microalga S21 con baja intensidad de iluminación (BIL) y con medio de cultivo RLMo al 50% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana P1 y P1-II (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: P2 y P3: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.1.3.- Cultivo a 10°C durante 8 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).

Grupo 1

| 196



Grupo 2

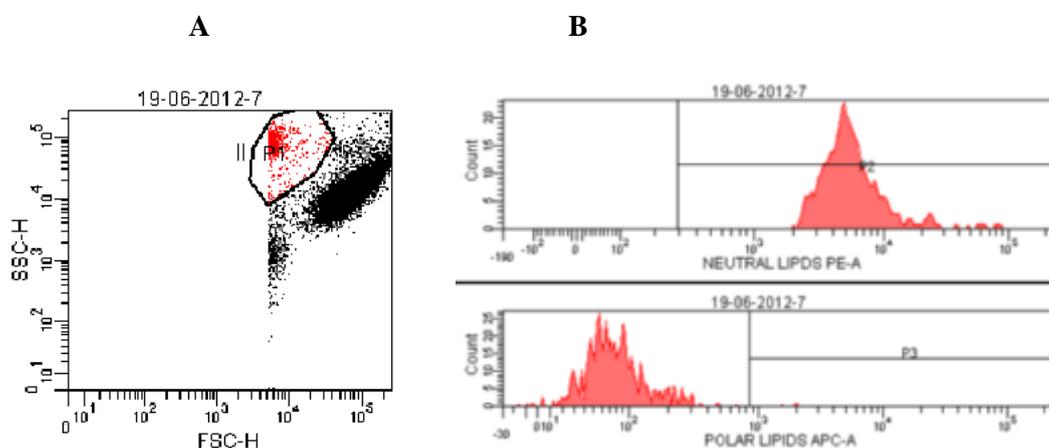


Figura 56: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 8 días de cultivo a 10°C de la microalga S21 con alta intensidad de iluminación (AIL) y con medio de cultivo RLMo al 20% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

En el caso representado en los citogramas de la **Figura 56**, de las 10.000 células analizadas un 84,2±2,3% y 5,7±0,3% correspondieron a las poblaciones P1 de los Grupos 1 y 2 respectivamente.

En el Grupo 1 se pudo observar un mayor porcentaje (13,3±1,1%) de población con lípidos polares (P3) que de células con lípidos neutros P2 (5,6±1,0%). Sin embargo en el grupo poblacional 2 esta relación se invierte siendo más numerosa la población de células con lípidos neutros P2 (98,1±1,4%) que la población celular con lípidos polares, está último fue prácticamente nula. (**Tabla 53**).

Tabla 53. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 10°C/8d, AIL, RLMo (20%).

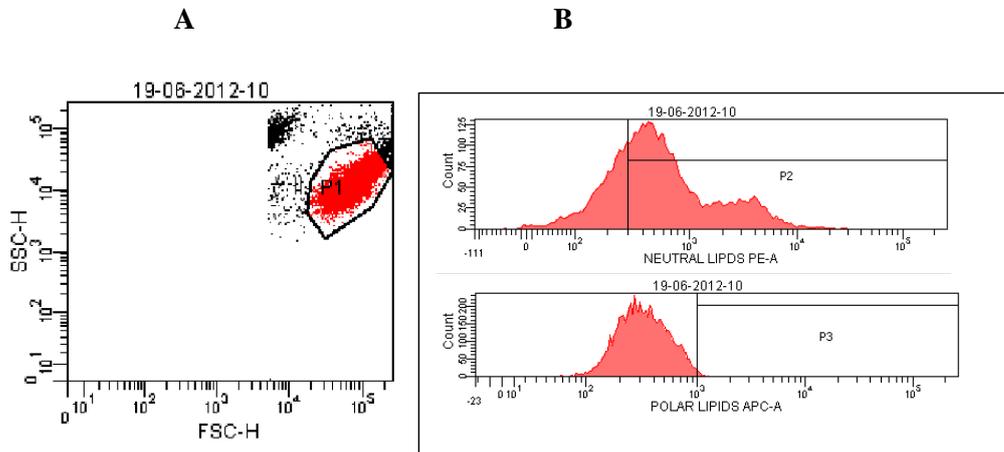
(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	84,2±2,3	5,7±0,3
P2	5,6±1,0	98,1±1,4
P3	13,3±1,1	0,3±0,2

P1: % Población estudiada a partir de 10,000 células, P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1, P3: % Población con lípidos polares a partir de P1, **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes,

4.1.4. Cultivo a 10°C durante 8 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).

En la **Figura 57** se muestran los resultados del análisis de poblaciones P1 bajo condiciones de iluminación altas y medio de cultivo con 50% de dilución de sus nutrientes. Las poblaciones P1 estudiadas supusieron un 87,0±1,7% y un 7,4±0,7 % respecto del total de 10.000 células tomadas como referencia inicial. Se aprecia un aumento significativo de las subpoblaciones P2 (73,1±2,3% y 99,2±0,4%) respecto a las subpoblaciones P3 (9,2±1,2% y 0.1±0,2%) tanto en el Grupo 1 como en el Grupo 2 de poblaciones diana. (**Tabla 54**)

Grupo 1



Grupo 2

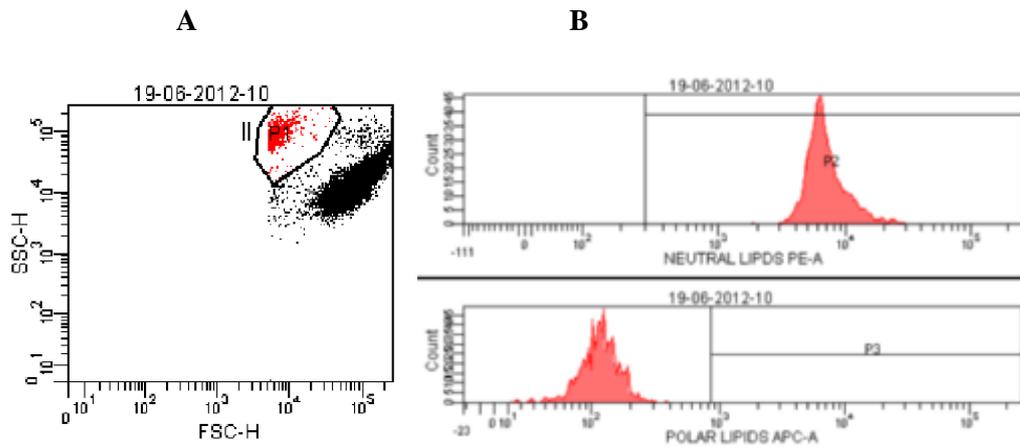


Figura 57: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 8 días de cultivo a 10°C de la microalga S21 con alta intensidad de iluminación (AIL) y con medio de cultivo RLMo al 50% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

Tabla 54. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 10°C/8d, AIL, RLMo (50%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	87,0±1,7	7,4±0,7
P2	73,1±2,3	99,2±0,4
P3	9,2±1,2	0,1±0,2

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.2. Ensayos realizados a 10°C durante 20 días de cultivo

4.2.1.- Cultivo a 10°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v)

Grupo 1

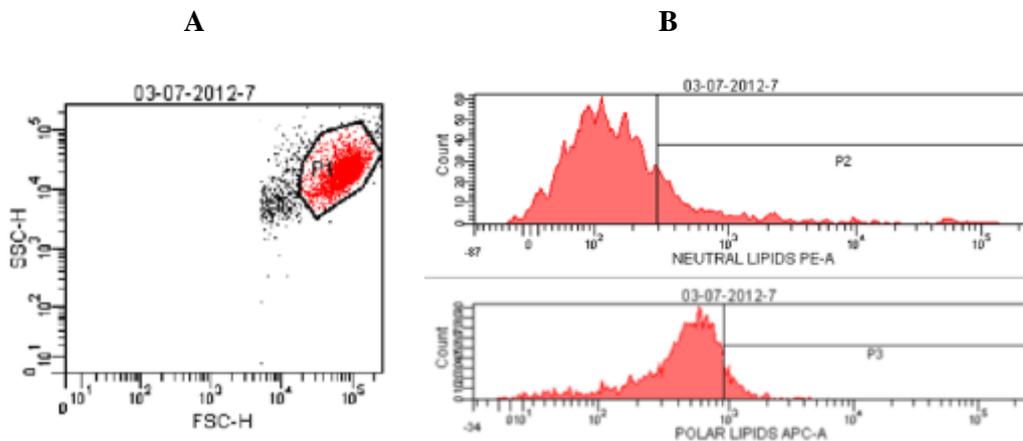


Figura 58: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 20 días de cultivo a 10°C de la microalga S21 con baja intensidad de iluminación (BIL) y con medio de cultivo RLMo al 20% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3:** Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1:** Población Diana P1.

Tabla 55. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 10°C/20d, BIL, RLMo (20%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	79,5±0,9	Nd
P2	20,7±0,7	Nd
P3	8,4±1,7	Nd

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. Nd: población no detectada. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

En la **Figura 58** y **Tabla 55** se observa que solamente se detectó una población morfológicamente homogénea denominada Grupo 1 y cuya población P1 fue del 79,5±0,9 % del total de las 10.000 células analizadas.

Se puede apreciar que el porcentaje de la subpoblación P2 fue aproximadamente el doble que la subpoblación P3, siendo del 20,7±0,7% y 8,4±1,7% respectivamente. Este resultado indica que bajo las condiciones de ensayo descritas, se produce una mayor acumulación de lípidos neutros que de polares en la microalga identificada como S21.

4.2.2.- Cultivo a 10°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).

Tabla 56. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 10°C/20d, BIL, RLMo (50%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	71,4±3,5	15,9±2,4
P2	21,6±1,6	98,7±0,4
P3	10,6±2,6	0,1±0,1

P1: % Población estudiada a partir de 10,000 células, P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1, P3: % Población con lípidos polares a partir de P1, **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes,

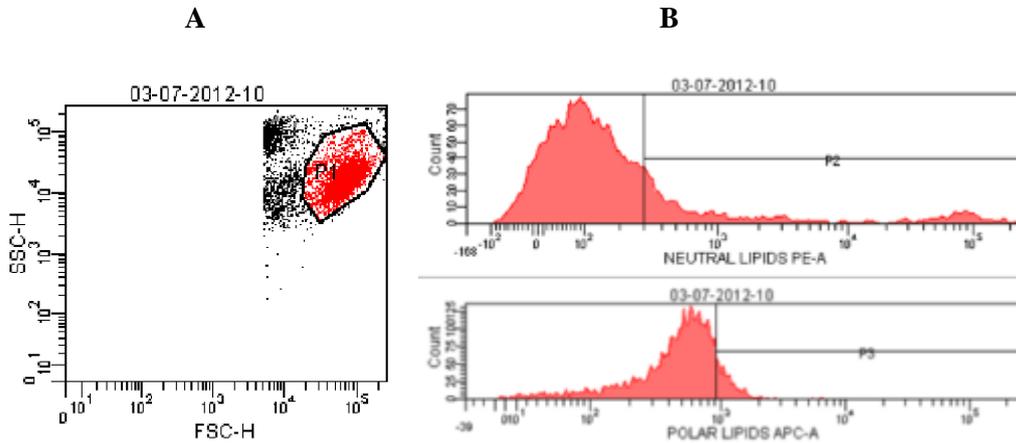
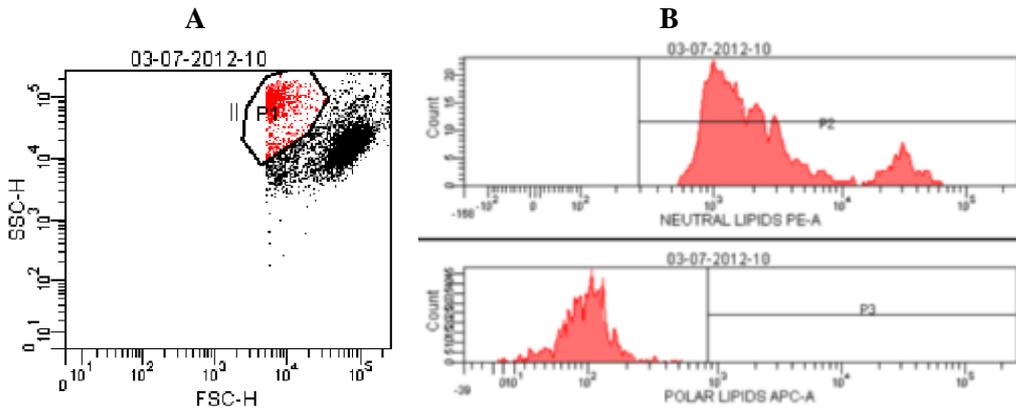
Grupo1**Grupo 2**

Figura 59: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 20 días de cultivo a 10°C de la microalga S21 con baja intensidad de iluminación (BIL) y con medio de cultivo RLMO al 50% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

En el ensayo realizado bajo con las mismas condiciones de luminosidad pero mayor concentración de nutrientes (50%), de las 10.000 células analizadas, el porcentaje de población P1 caracterizado por idénticas propiedades morfológicas en cada uno de los Grupos representados fue del $71,4\pm 3,5\%$ y del $15,9\pm 2,4\%$. (**Figura 59, Tabla 56**)

| 202

Se observa que la subpoblación P2 del Grupo 1 fue mayor (casi el doble) que la subpoblación P3, lo cual indica una mayor presencia de lípidos neutros que de polares en la población P1. De igual modo, en el caso de la población P1 del Grupo 2 se puede apreciar un alto porcentaje de población P2 ($98,7\pm 0,4\%$) lo cual indica que casi la totalidad de células de la población P1 se correspondía con una población que presentaba acumulación de lípidos neutros.

4.2.3.- Cultivo a 10°C durante 20 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).

En los citogramas de la **Figura 60 y Tabla 57**, al igual que en el ensayo BIL (RLMo-20%), solamente se detectó una población morfológicamente homogénea a la que se le ha llamado Grupo 1, y cuya población P1 fue del $92,8\pm 3,4\%$ del total de las 10.000 células analizadas.

Se puede apreciar que el porcentaje de la subpoblación P2 con características morfológicas uniformes fue relativamente baja ($5,4\pm 0,7\%$) y que no se aprecia prácticamente población P3. Esto indica que bajo estas condiciones de cultivo la presencia tanto de lípidos neutros como polares en las subpoblaciones estudiadas fue escasa en la microalga S21.

Tabla 57. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 10°C/20d, AIL, RLMo (20%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	$92,8\pm 3,4$	Nd
P2	$5,4\pm 0,7$	Nd
P3	0	Nd

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. Nd: población no detectada. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

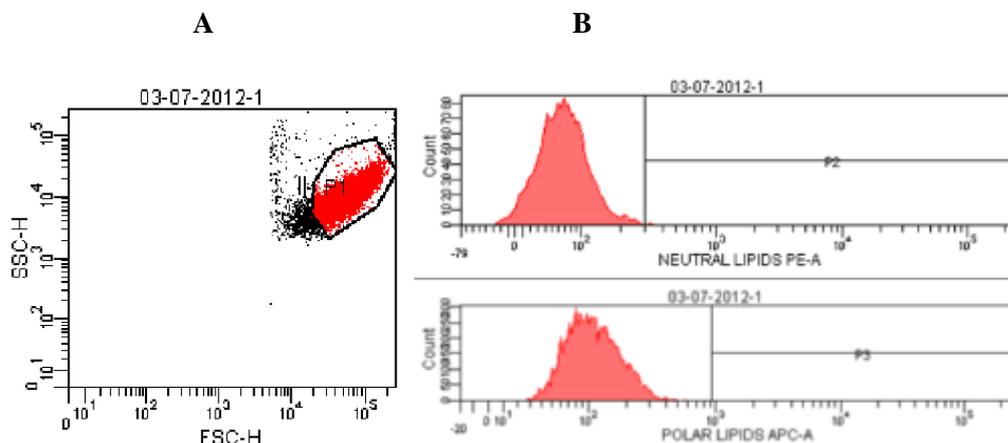
Grupo 1

Figura 60: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 20 días de cultivo a 10°C de la microalga S21 con alta intensidad de iluminación (AIL) y con medio de cultivo RLMO al 20% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1:** Población Diana P1.

4.2.4.- Cultivo a 10°C durante 20 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMO al 50% (p/v)

En los citogramas de la **Figura 61** y **Tabla 58** se muestra el ensayo con idénticas condiciones que en el caso anterior pero con mayor concentración de nutrientes (RLMO-50%). Se observa que los porcentajes de población P1 a partir de 10.000 células tomadas como referencia fueron del $83,1 \pm 4,3\%$ y del $7,4 \pm 0,1\%$ en los Grupos 1 y 2 respectivamente.

Puede apreciarse que los porcentajes de las dos subpoblaciones P2 fueron similares y significativamente bajos, e igualmente se observa que no se detectó población P3 en ninguna de las poblaciones P1. Esto indica que la acumulación lipídica en ambos casos tanto de lípidos neutros como polares y bajo estas condiciones de cultivo fue escasa.

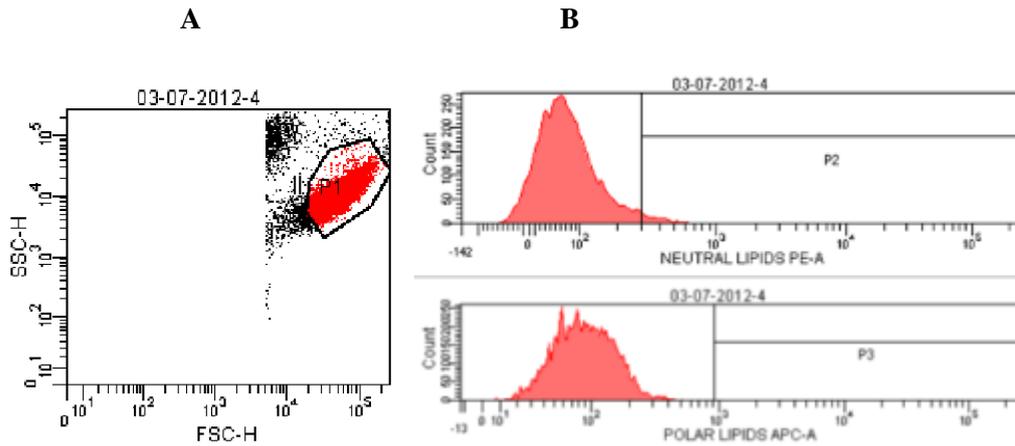
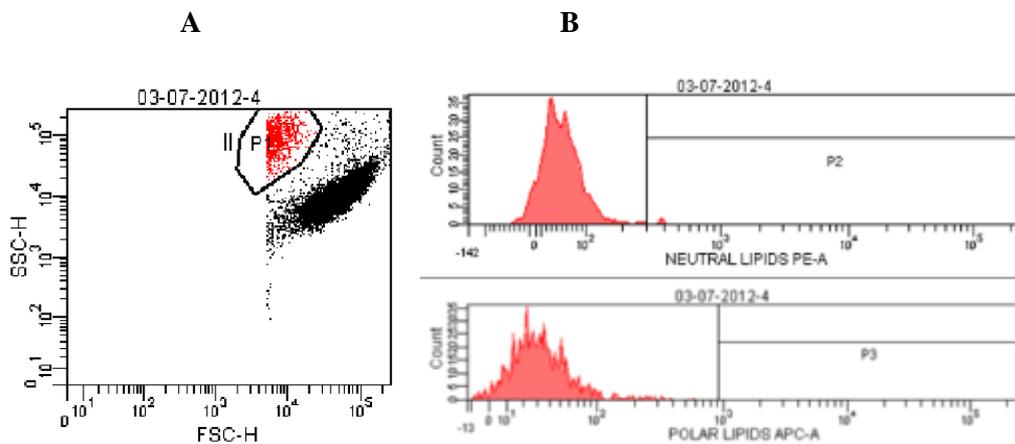
Grupo 1**Grupo 2**

Figura 61: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 20 días de cultivo a 10°C de la microalga S21 con alta intensidad de iluminación (AIL) y con medio de cultivo RLMo al 50% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

Tabla 58. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 10°C/20d, AIL, RLMo (50%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	83,1±4,3	7,4±0,1
P2	3,8±0,8	3,3±0,9
P3	0	0

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.3. Ensayos realizados a 20°C durante 8 días de cultivo

4.3.1.-Cultivo a 20°C durante 8 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).

Grupo 1

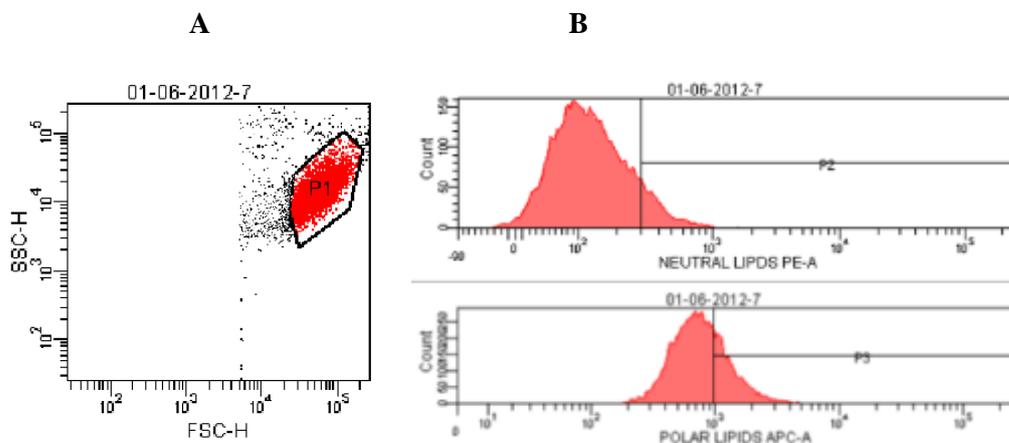


Figura 62: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 8 días de cultivo a 20°C de la microalga S21 con baja intensidad de iluminación (BIL) y con medio de cultivo RLMo al 20% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3:** Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1:** Poblaciones Diana P1.

Tabla 59. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 20°C/8d, BIL, RLMo (20%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	60,9±1,2	Nd
P2	19,8±1,0	Nd
P3	13,2±0,4	Nd

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. Nd: población no detectada. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

| 206

En la **Figura 62** y **Tabla 59** únicamente se observa una población morfológicamente homogénea denominada Grupo 1 y cuya población P1 fue del 60,9±1,2% del total de las 10.000 células analizadas. En esta población se apreció un porcentaje del 19,8±1,0% de células con emisión positiva de Rojo Nilo a 578 nm lo cual indica presencia de una población con acumulación de lípidos neutros.

De igual modo, se observó un porcentaje de población del 13,2±0,4% como consecuencia de la emisión positiva del Rojo Nilo a 660 nm correspondiéndose con la subpoblación P3 indicativo de una acumulación de lípidos polares.

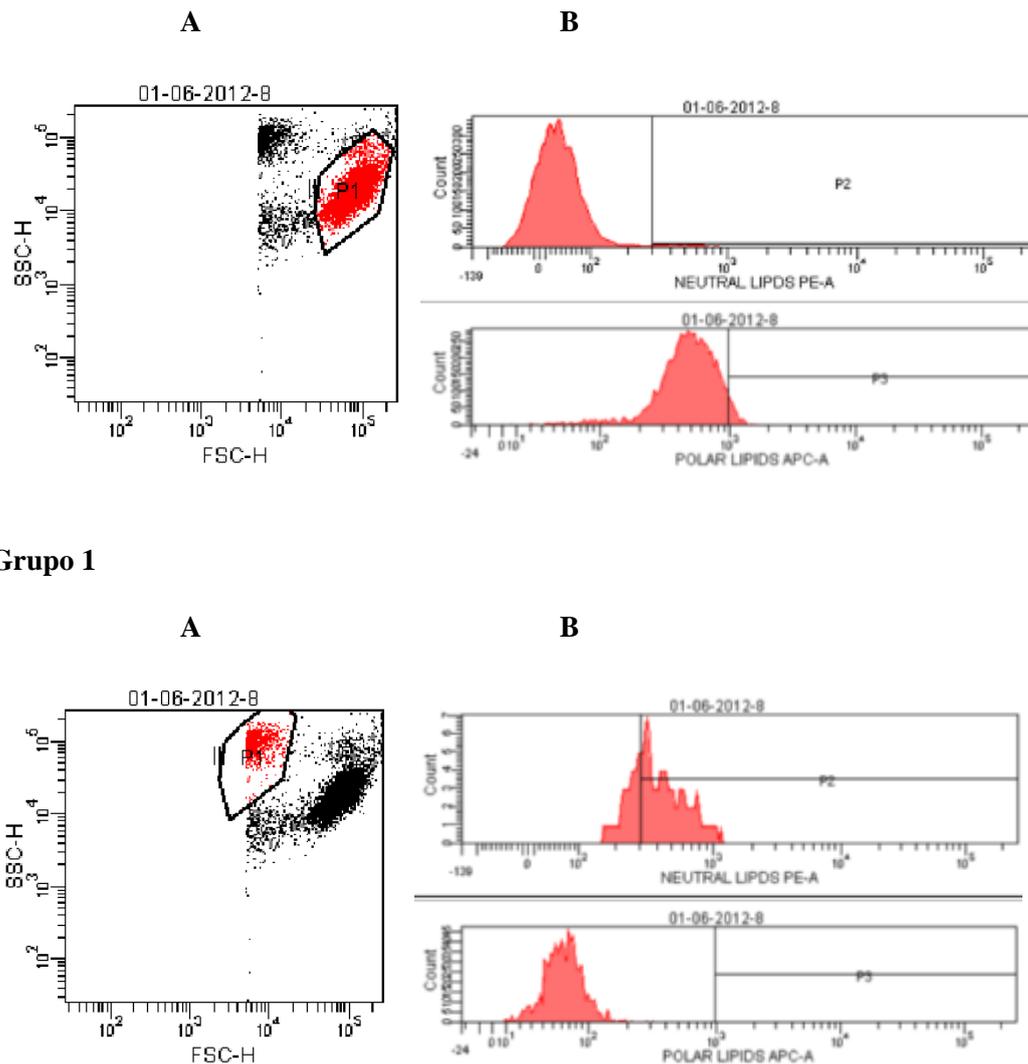
4.3.2.- Cultivo a 20°C durante 8 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).

En la **Figura 63** y **Tabla 60** se muestra el ensayo realizado con las mismas condiciones de luminosidad pero mayor concentración de nutrientes (50%). A diferencia que en el caso anterior, tras el análisis de 10.000 células, se observan dos poblaciones diferentes morfológicamente que corresponden a las poblaciones P1 de los Grupos 1 y 2, siendo del 83,8±2,7% y 8,7±0,2% respectivamente.

En relación al Grupo 1, el porcentaje de población con lípidos neutros y polares (P2 y P3) fue relativamente similar, del 6,2±0,5% y 4,4±1,0% respectivamente.

No obstante en el caso de la población P1 del Grupo 2 un porcentaje significativamente elevado (del $79.6 \pm 1,1\%$) correspondió a la población P2, es decir la población con acumulación de lípidos neutros.

Grupo 1



Grupo 1

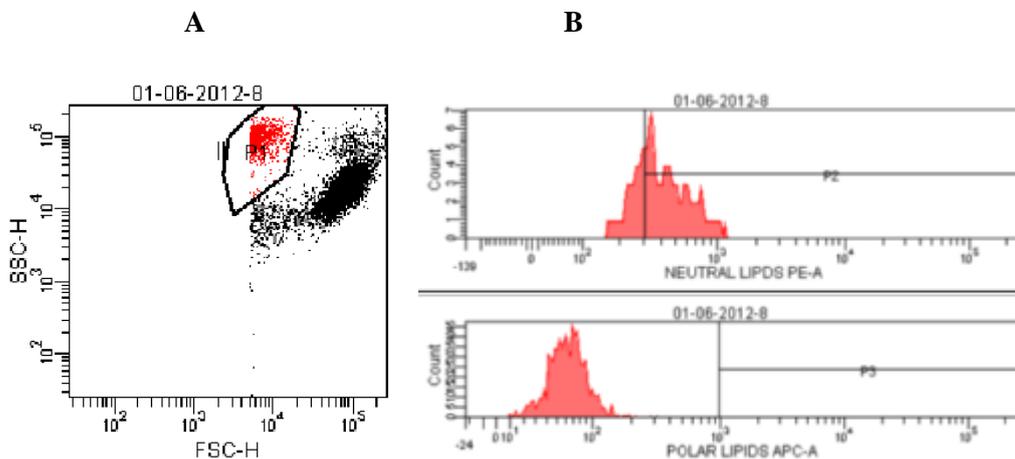


Figura 63: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 8 días de cultivo a 20°C de la microalga S21 con baja intensidad de iluminación (BIL) y con medio de cultivo RLMO al 50% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

Tabla 60. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 20°C/8d, BIL, RLMo (50%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	83,8±2,7	8,7±0,2
P2	6,2±0,5	79,6±1,1
P3	4,4±1,0	0

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.3.3.- Cultivo a 20°C durante 8 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).

El ensayo bajo condiciones lumínicas mayores y dilución del medio RLMo al 20% muestra que los porcentajes de poblaciones P1 en los Grupos 1 y 2 a partir de 10.000 células tomadas como estándar de medida fueron relativamente similares a los del caso anterior, alcanzando valores de 85,4±1,4% y 6,1±0,1% respectivamente. En el caso del Grupo 1 analizado, los porcentajes de poblaciones P2 y P3 fueron de 25,1±0,2% y 15,5±3,1% lo cual indica un contenido en lípidos neutros y polares relativamente similar y considerable. (**Figura 64**)

En relación a los porcentajes poblaciones del Grupo 2 se aprecia un valor relativamente alto de población P2 (66,5±1,1%) en detrimento de la población P3 prácticamente inapreciable (0,1±0,1%) lo cual indica que existe una alta proporción de población con lípidos neutros. (**Tabla 61**).

Tabla 61. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 20°C/8d, AIL, RLMo (20%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	85,4±1,4	6,1±0,1
P2	25,1±0,2	66,5±1,1
P3	15,5±3,1	0,1±0,1

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

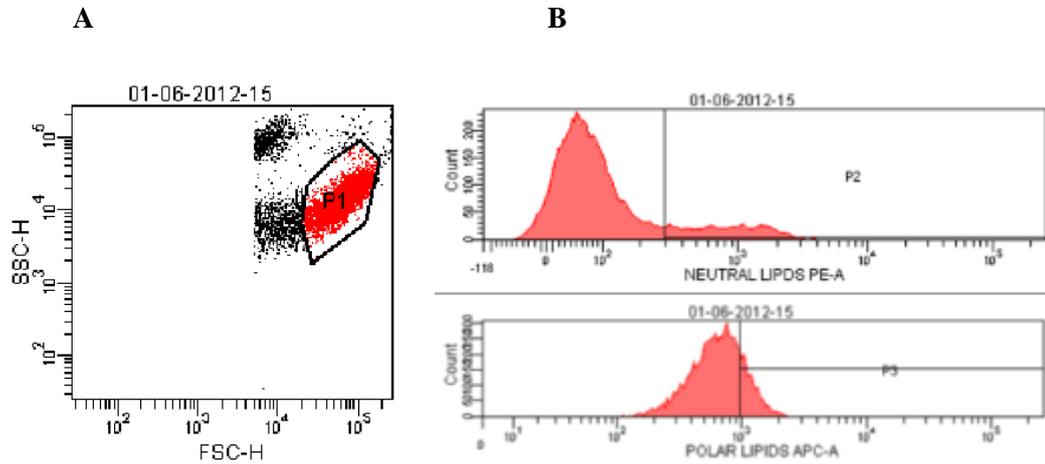
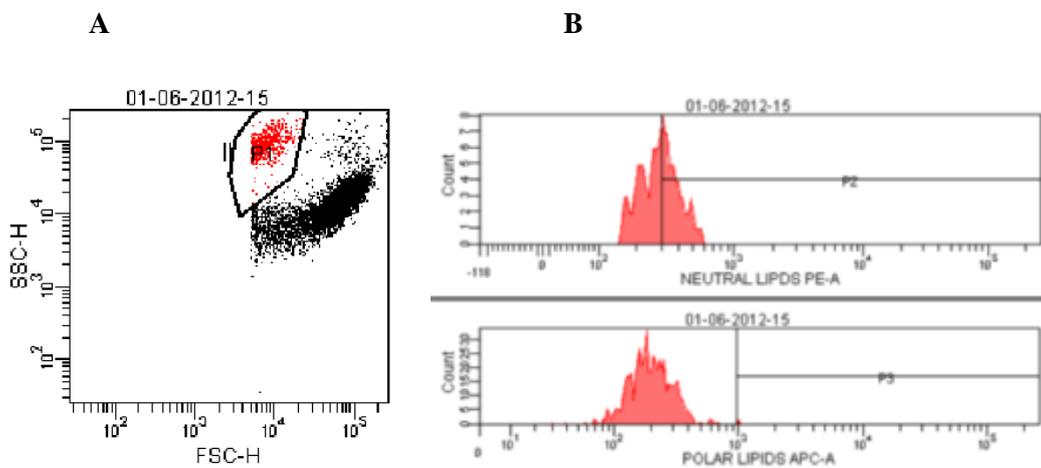
Grupo 1**Grupo 1**

Figura 64: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 8 días de cultivo a 20°C de la microalga S21 con alta intensidad de iluminación (AIL) y con medio de cultivo RLMo al 20% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.3.4.- Cultivo a 20°C durante 8 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v)

En los citogramas de la **Figura 65** y **Tabla 62** los resultados del ensayo realizado con las mismas condiciones de luminosidad pero mayor concentración de nutrientes (50% p/v) muestran que de 10,000 células analizadas la población P1 supuso un 82,4±2,2% y 5,2±0,1% en los Grupos 1 y 2 analizados respectivamente.

En el caso del Grupo 1 se observa que los porcentajes de las poblaciones P2 y P3 fueron significativamente altos en relación a los ensayos anteriores, es decir, del 35,8±0,4% y 45,5±2,2% respectivamente, indicando que bajo estas condiciones de cultivo se produce una acumulación considerable de lípidos polares y neutros en el caso de la población P1 del Grupo 1.

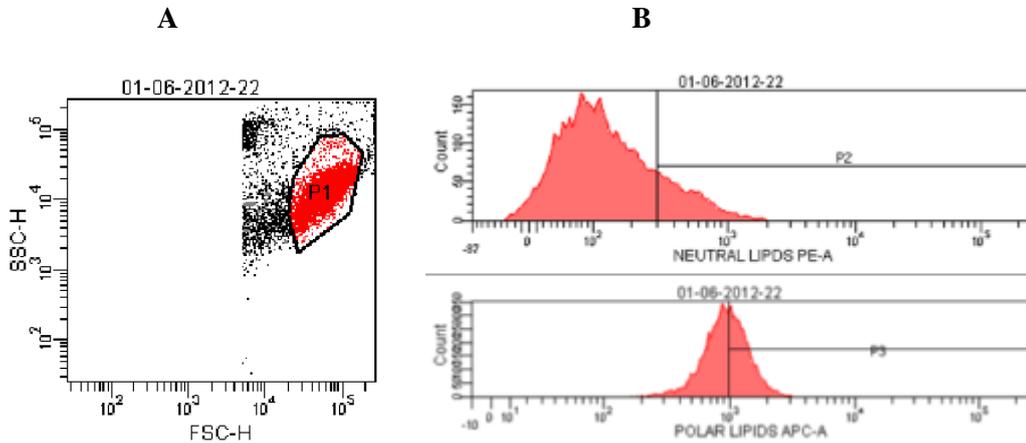
En relación a las poblaciones del Grupo 2, se observa que más del 50% de los lípidos presentes en la población P1 se correspondió con P2, es decir con una población que acumula lípidos neutros, y que el porcentaje de población P3 fue significativamente bajo (2,1±0,2%).

Tabla 62. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 20°C/8d, AIL, RLMo (50%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	82,4±2,2	5,2±0,1
P2	35,8±0,4	56,3±1,5
P3	45,5±2,2	2,1±0,2

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

Grupo 1



Grupo 1

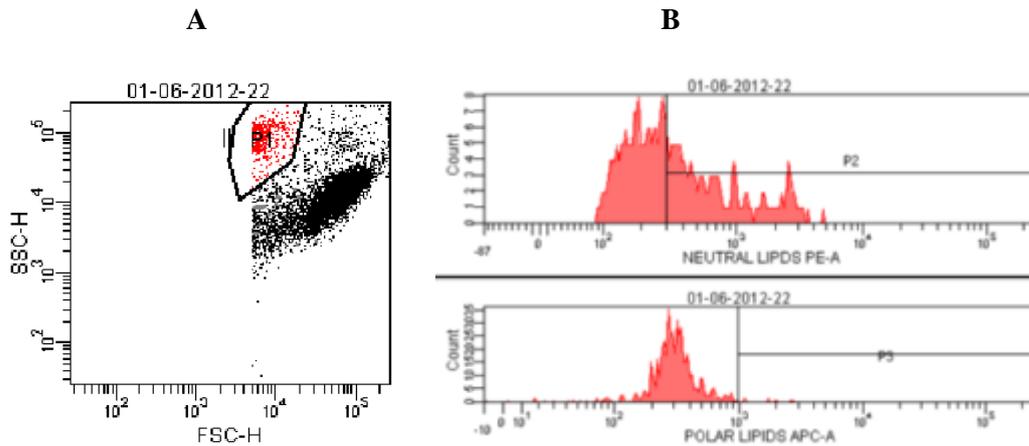


Figura 65: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 8 días de cultivo a 20°C de la microalga S21 con alta intensidad de iluminación (AIL) y con medio de cultivo RLMO al 50% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.4. Ensayos realizados a 20°C durante 20 días de cultivo

4.4.1.-Cultivo a 20°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v)

| 212

En la **Figura 66** se observa que tras el análisis del total de 10.000 células, el porcentaje de población P1 analizado de los Grupos 1 y 2 fue del 85,5±2,0% y 8,0±0,6% respectivamente.

En el caso de la población del Grupo 1 el porcentaje de subpoblación P2 fue del 39,9±0,1%, lo cual indica que un alto porcentaje de la población P1 de este grupo presentaba lípidos neutros y que un porcentaje ligeramente menor (20,5±1,7%) de esta población presentaba lípidos polares (subpoblación P3).

En el caso de la población diana P1 del Grupo 2, se puede observar que el porcentaje de dicha población es significativamente menor que en el caso del Grupo 1, al igual que todos los ensayos realizados, pero que prácticamente la totalidad de dicha población (un 98,0±1,8%) presentaba lípidos neutros. (**Tabla 63**).

Tabla 63. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 20°C/20d, BIL, RLMo (20%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	85,5±2,0	8,0±0,6
P2	39,9±0,1	98,0±1,8
P3	20,5±1,7	0

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

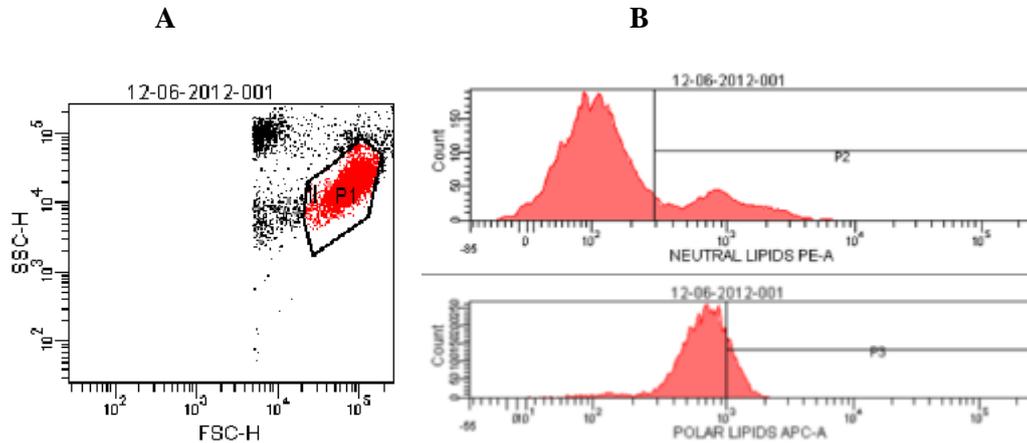
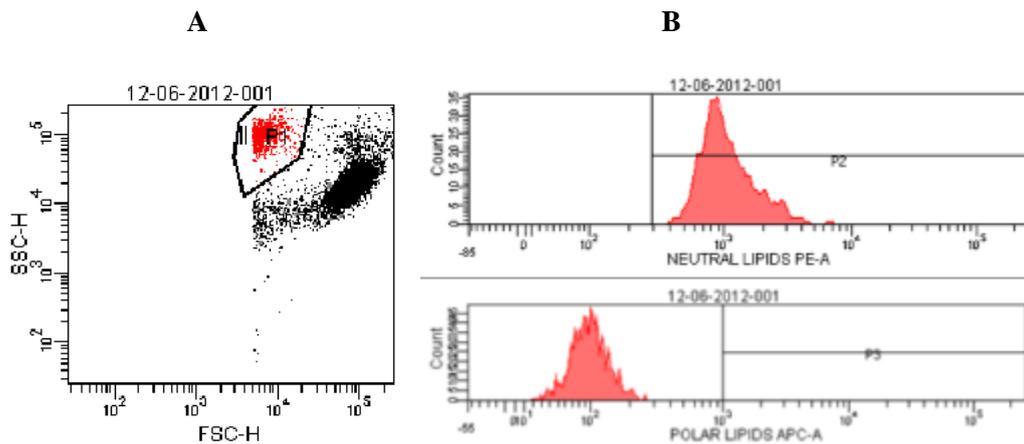
Grupo 1**Grupo 1**

Figura 66: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 20 días de cultivo a 20°C de la microalga S21 con baja intensidad de iluminación (BIL) y con medio de cultivo RLMO al 20% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.4.2.- Cultivo a 20°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (BIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v).

En el caso del ensayo a 20°C con baja intensidad lumínica y concentración de nutriente del medio RLMo al 50%, tras 20 días de cultivo se aprecian dos poblaciones P1 en los Grupos 1 y 2 con porcentajes poblacionales similares al caso anterior, es decir del 87,8±4,4% y 4,5±0,2% respectivamente. (**Figura 67**)

En el caso del Grupo 1, el porcentaje de población P1 con presencia de lípidos neutros (P2) fue mayor que la que presentaba lípidos polares (P3) siendo del 29,1±0,9 y 5,9±0,2% respectivamente, lo cual indica que en este ensayo existe una mayor acumulación de lípidos neutros que de polares en la población P1 estudiada. (**Tabla 64**)

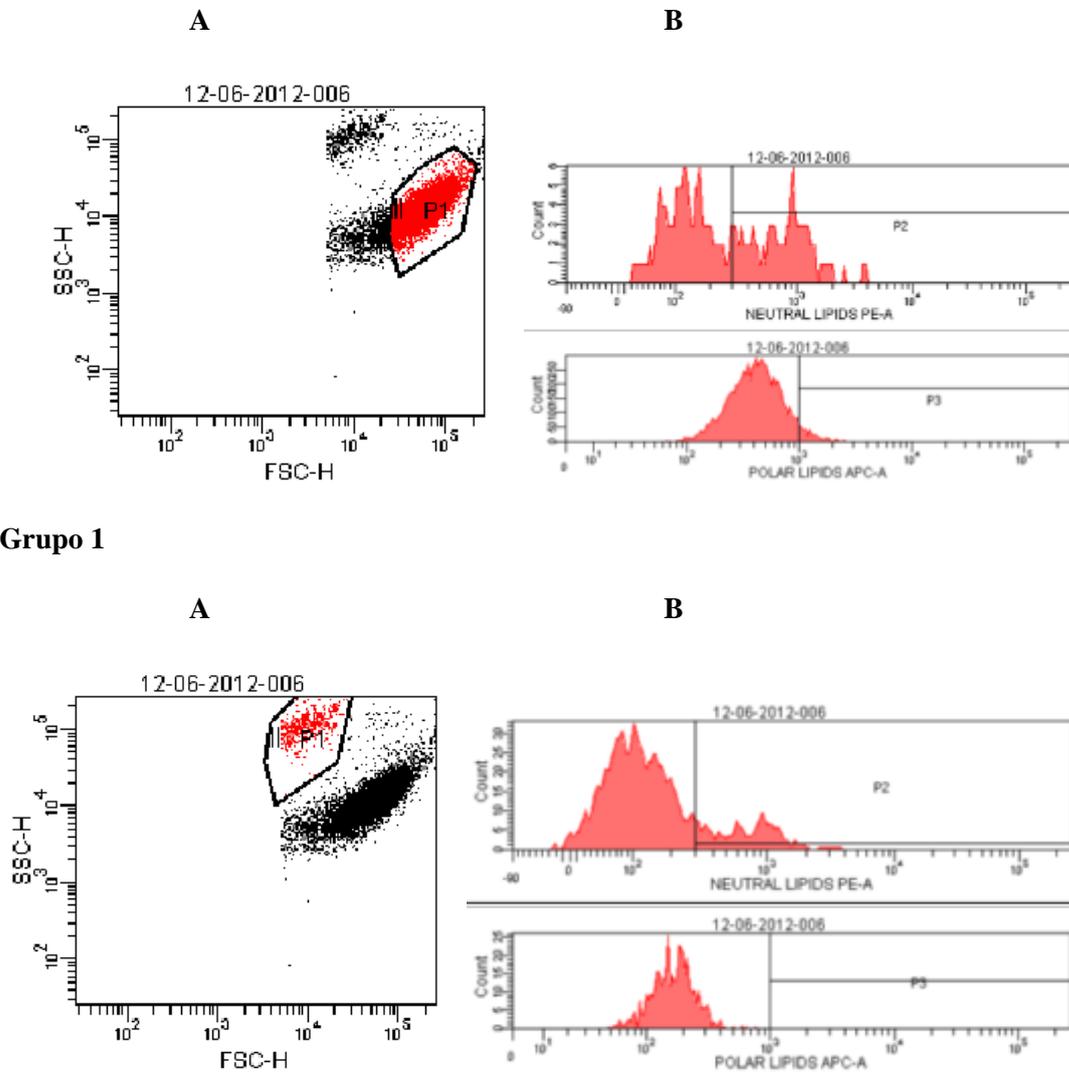
En el Grupo 2 puede apreciarse que prácticamente la mitad de la población P1 se correspondió con P2 (42,0±0,4%), es decir casi el 50% de dicha población presentaba acumulación de lípidos neutros, no detectándose en este caso la subpoblación P3.

Tabla 64. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 20°C/20d, BIL, RLMo (50%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	87,8±4,4	4,5±0,2
P2	29,1±0,9	42,0±0,4
P3	5,9±0,2	0,5±0,6

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

Grupo 1



Grupo 1

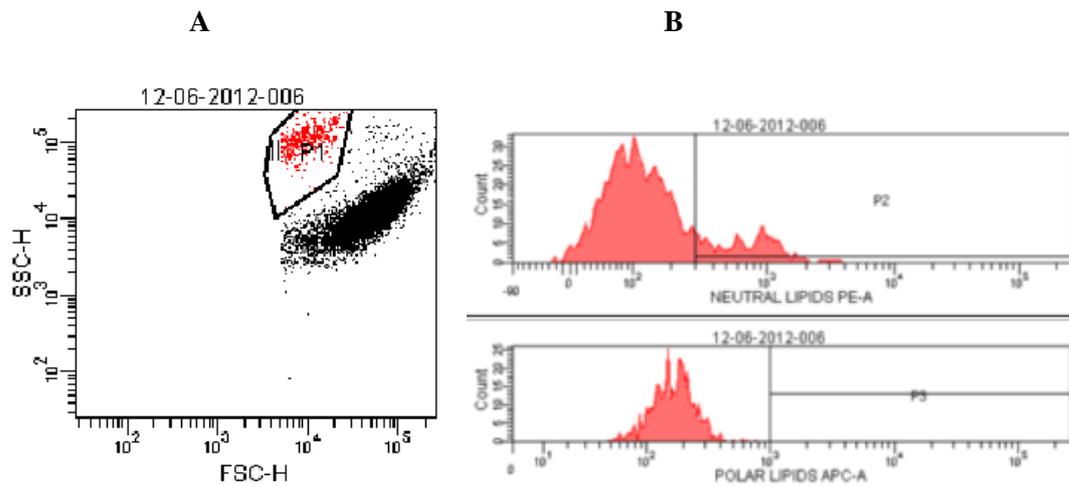


Figura 67: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 20 días de cultivo a 20°C de la microalga S21 con baja intensidad de iluminación (BIL) y con medio de cultivo RLMO al 50% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.4.3.- Cultivo a 20°C durante 20 días de incubación con alta intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 20% (p/v).

| 216

En el caso del ensayo a 20°C con mayor intensidad lumínica y menor concentración de nutrientes del medio RLMo que en el caso anterior, tras 20 días de cultivo se observa que en el Grupo 1 el porcentaje poblacional P1 es del 86,4±2,6% y en el caso del Grupo 2, dicha población es del 5,8±0,1%, respecto de las 10.000 células tomadas como referencia. (**Figura 68 y Tabla 65**).

En el caso del Grupo 1, se aprecia un porcentaje similar de las poblaciones P2 y P3 lo cual indica que bajo estas condiciones de cultivo la proporción de subpoblación con lípidos neutros es relativamente similar a a subpoblación con lípidos polares.

No obstante, este resultado no coincide con la población P1 del Grupo 2, morfológicamente diferente a la del Grupo 1, donde se observa que casi la totalidad de dicha población (93,8±1,0%) presenta lípidos neutros.

Tabla 65. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 20°C/20d, AIL, RLMo (20%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	86,4±2,6	5,8±0,1
P2	24,3±0,5	93,8±1,0
P3	21,1±0,4	0,2±0,1

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

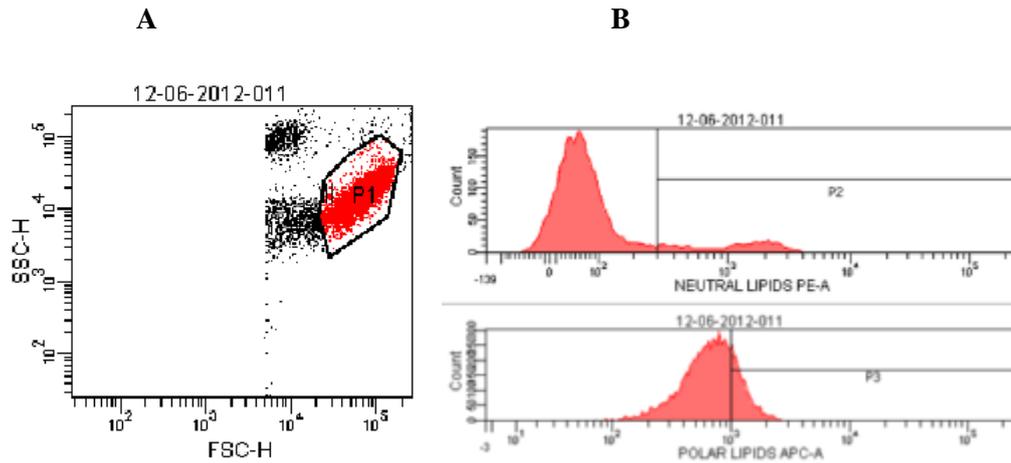
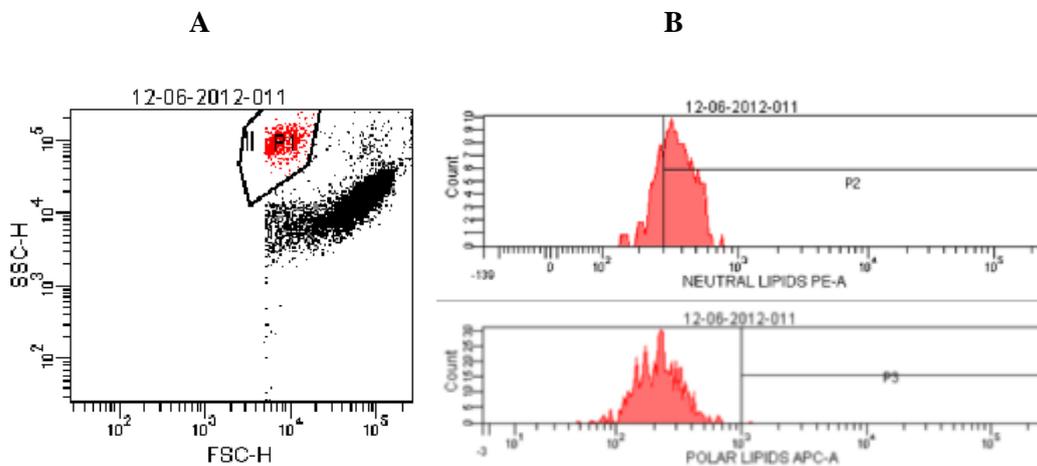
Grupo 1**Grupo 1**

Figura 68: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 20 días de cultivo a 20°C de la microalga S21 con alta intensidad de iluminación (AIL) y con medio de cultivo RLMO al 20% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

4.4.4.- Cultivo a 20°C durante 20 días de incubación con baja intensidad de iluminación (AIL) con el medio de cultivo RLMo al 50% (p/v)

| 218

En la **Figura 69** se muestran los citogramas de las dos subpoblaciones P1 correspondientes a los Grupos 1 y 2, siendo el porcentaje de población de 85,3±2,7% y 5,0±0,2% respectivamente. (**Tabla 66**).

Se puede observar que el porcentaje de población con emisión del Rojo Nilo es mayor en el Grupo 2 para la población P2 respecto a P3, lo cual indica que prácticamente la totalidad de la población presentaba lípidos neutros y muy pocos lípidos polares; no obstante y dado que el porcentaje de población P1 es mayor para el caso del Grupo 1 (85,3±2,7%), aunque su porcentaje de población P2 sea ligeramente menor, se estima que el contenido de lípidos neutros es mayor en el caso de la población P2 del Grupo 1 que en el caso del Grupo 2.

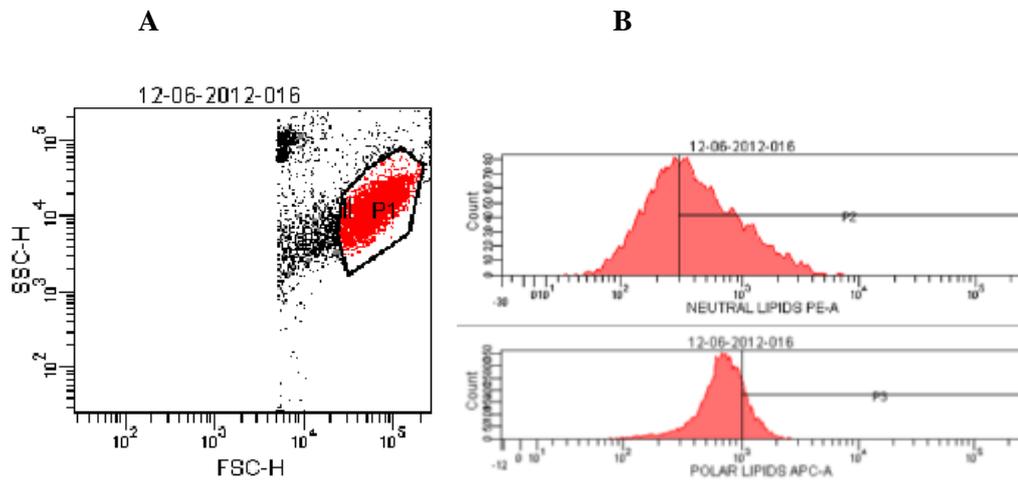
Además se aprecia un porcentaje significativo de población P3 en el caso del Grupo 1 lo cual indica la presencia también de lípidos polares en la población celular estudiada y un alto porcentaje de población con lípidos totales en este Grupo.

Tabla 66. Porcentaje de subpoblaciones con emisión de fluorescencia al Rojo Nilo (578nm y 660nm) del ensayo a 20°C/20d, AIL, RLMo (50%).

(%)	Grupo 1	Grupo 2
P1	85,3±2,7	5,0±0,2
P2	77,8±1,5	98,1±0,2
P3	18,6±0,7	1,6±0,3

P1: % Población estudiada a partir de 10.000 células. P2: % Población con lípidos neutros a partir de P1. P3: % Población con lípidos polares a partir de P1. **Grupo 1 y 2:** Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

Grupo 1



Grupo 1

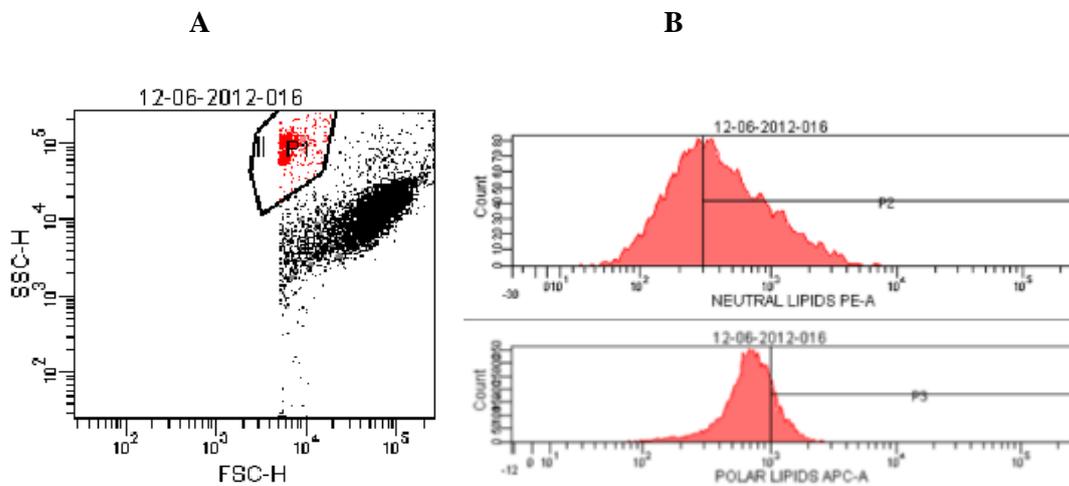


Figura 69: Estudio de los lípidos presentes en diferentes poblaciones celulares de la microalga S21 (fluorescencia tras la tinción con Rojo Nilo). Resultados obtenidos tras 20 días de cultivo a 20°C de la microalga S21 con alta intensidad de iluminación (AIL) y con medio de cultivo RLMO al 50% (p/v). **A:** Citograma de Población Diana **P1** y **P1-II** (Forward Scatter-X / Side Scatter-Y). **B:** Citograma de producción de lípidos: **P2** y **P3**: Fluorescencia positiva de emisión del Rojo Nilo correspondiente a lípidos polares y neutros de la P1 respectivamente. **Grupo 1** y **2**: Poblaciones Diana P1 morfológicamente diferentes.

5. Caracterización cualitativa de lípidos esenciales de interés producidos por la microalga S21 en distintas condiciones nutricionales utilizando el medio de cultivo RLMO.

220 | **5.1.** Estudio realizado a 10°C con medio de cultivo RLMO al 20%, p/v con baja intensidad de luz (BIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.

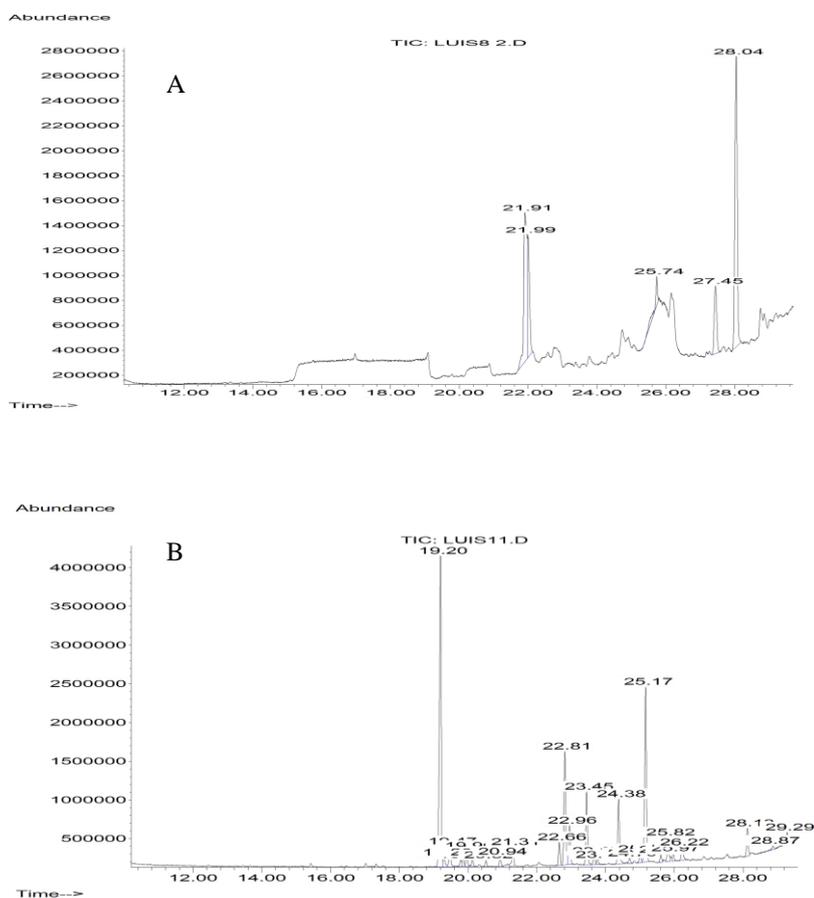


Figura 69: Análisis de GC/MS cualitativo de lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 20% p/v de concentración con baja intensidad de iluminación (BIL) ($26.8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) y a 10°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo.

5.2. Estudio realizado a 10°C con medio de cultivo RLMo al 50%, p/v con baja intensidad de luz (BIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.

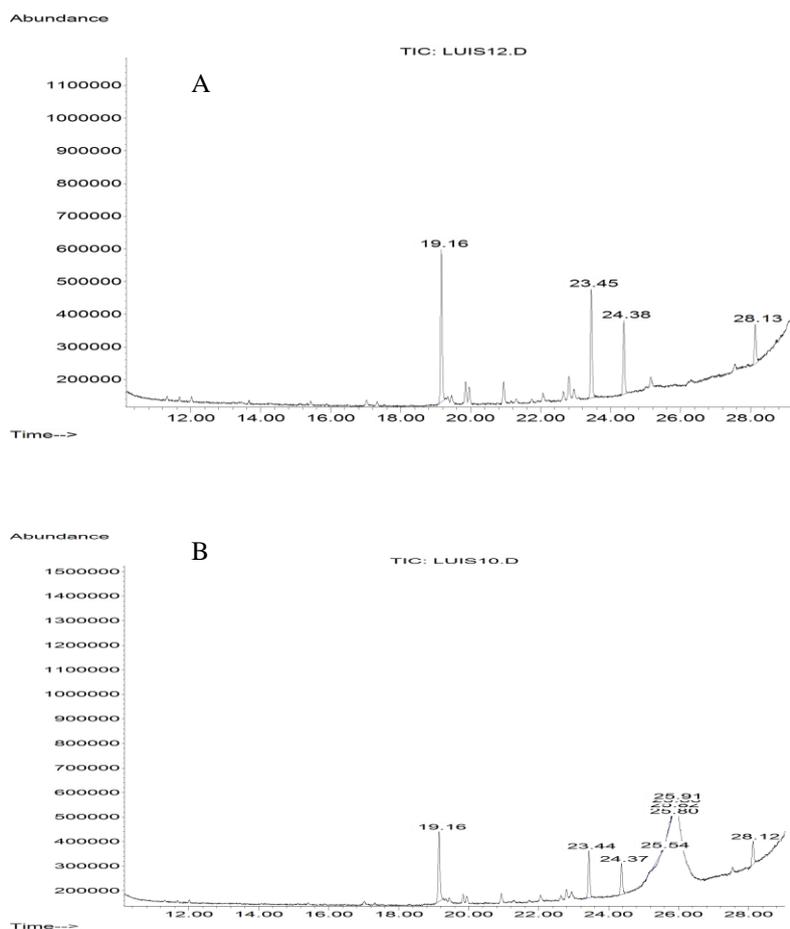


Figura 70. Análisis de GC/MS cualitativo de lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMo al 50% p/v de concentración con baja intensidad de iluminación (BIL) ($26.8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) y a 10°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo.

La **Figura 69-A** muestra los resultados obtenidos de ácidos grasos por GC/MS en los cultivos realizados bajo condiciones de baja iluminación y con el medio de cultivo al 20% de dilución; se puede apreciar que tras 8 días de cultivo no se detectaron ácidos grasos (Fase exponencial de crecimiento). No obstante tras 20 días de cultivo y bajo las mismas condiciones de cultivo (fase estacionaria de cultivo) (**Figura 69-B** y **Tabla 55**) se detectó la presencia de ac. palmítico, ac. esteárico, ac. oleico, ac. linoleico y ac. α -linolénico.

Tabla 55. Lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 20% p/v de concentración con baja intensidad de iluminación (BIL) ($26.8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) y a 10°C . **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo. Análisis cualitativo GC/MS. (**Figuras 69- A y 69-B**).

<i>Acidos grasos</i>	<i>Fase exponencial</i>	<i>Fase estacionaria</i>
	Tr (día 8)	Tr (día 20)
Ac. palmítico	nd	19,18
Ac. esteárico	nd	22,66
Ac. oleico	nd	22,81
Ac. linoleico	nd	23,45
Ac. α -linolénico	nd	24,38

Tr: tiempo de retención (min). n/d: no detectado. % similitud referido al compuesto de la librería Willey275 $\geq 99\%$.

La **Figura 70-A y 70-B** se corresponde con los cultivos realizados bajo condiciones de baja iluminación y con el medio de cultivo al 50% de dilución; bajo estas condiciones de cultivo el análisis de GC/MS únicamente detectó la presencia del ácido graso saturado hexadecanoico (ácido palmítico) tanto tras 8 días de cultivo (fase exponencial de crecimiento) como tras 20 días de cultivo (**Tabla 56**).

Tabla 56. Lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 50% p/v de concentración con baja intensidad de iluminación (BIL) ($26.8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) y a 10°C . **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo. Análisis cualitativo GC/MS. (**Figuras 70-A y 70-B**).

<i>Acidos grasos</i>	<i>Fase exponencial</i>	<i>Fase estacionaria</i>
	Tr (día 8)	Tr (día 20)
Ac. palmítico	19,16	19,66

Tr: tiempo de retención (min). n/d: no detectado. % similitud: referido al compuesto de la librería Willey275 $\geq 99\%$.

5.3. Estudio realizado a 10°C con medio de cultivo RLMo al 20%, p/v con alta intensidad de luz (AIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.

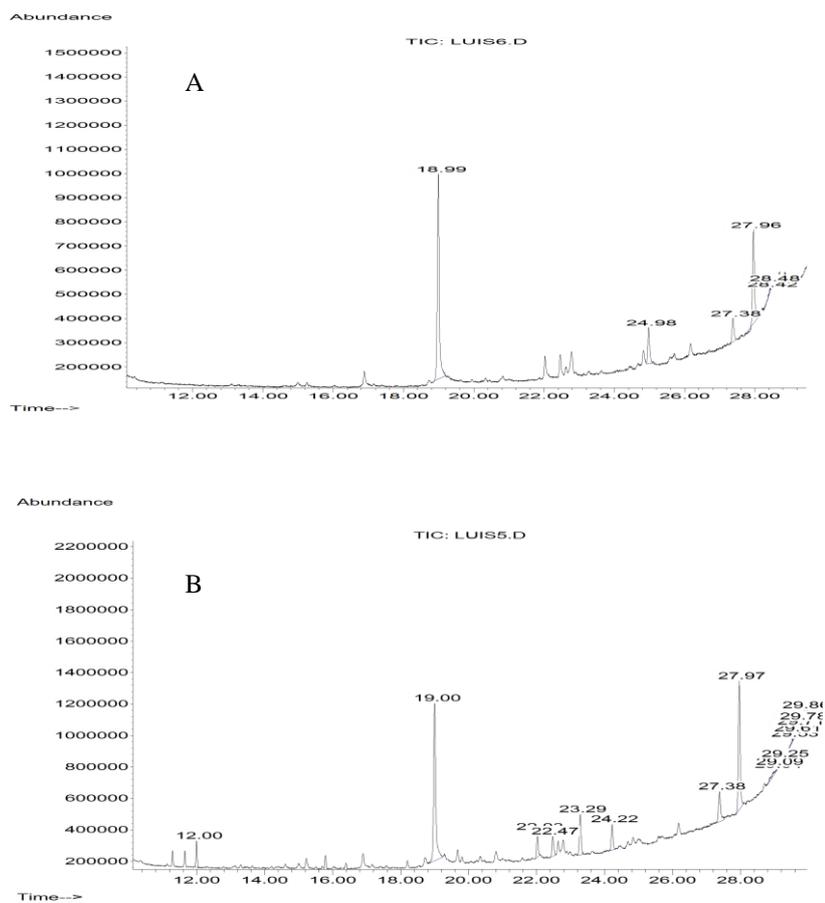


Figura 71. Análisis de GC/MS cualitativo de lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMo al 20% p/v de concentración con alta intensidad de iluminación (AIL) ($80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) y a 10°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo.

5.4. Estudio realizado a 10°C con medio de cultivo RLMO al 50%, p/v con alta intensidad de luz (AIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.

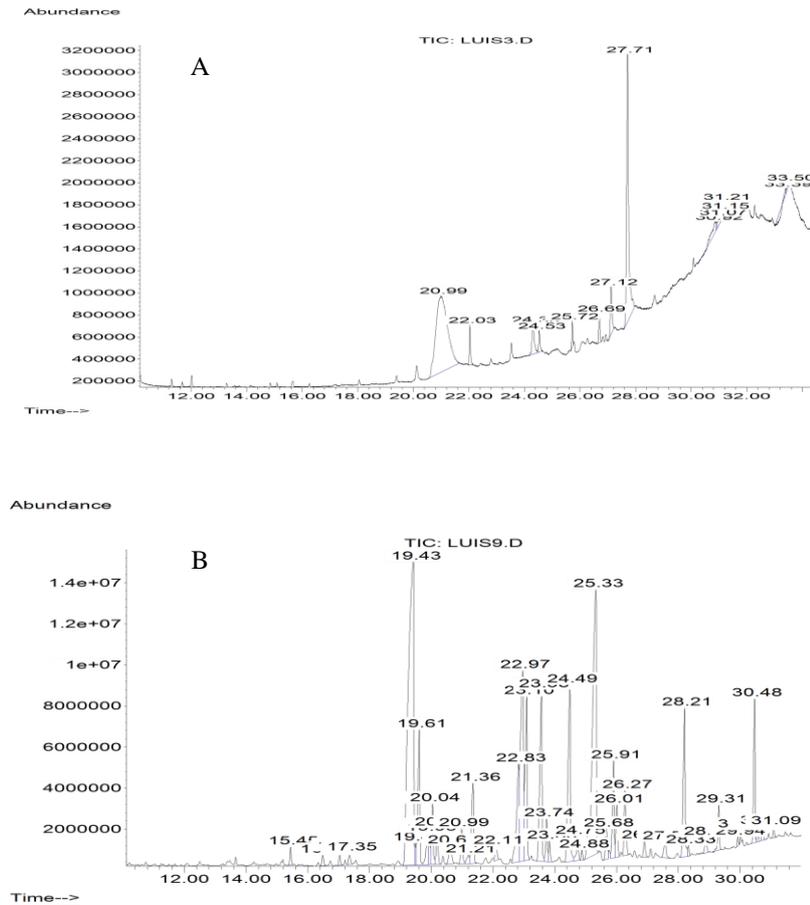


Figura 72. Análisis de GC/MS cualitativo de lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 50% p/v de concentración con alta intensidad de iluminación (AIL) ($80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) y a 10°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo.

En el cromatograma de la **Figura 71-A y 71-B** correspondiente con los cultivos realizados bajo condiciones de alta iluminación a 10°C y con el medio de cultivo RLMO al 50% de dilución se puede observar solo la presencia de ac. palmítico tanto a los 8 días de ensayo como a los 20 días (**Tabla 57**).

Tabla 57. Lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 20% p/v de concentración con alta intensidad de iluminación (AIL) (80 W*m⁻²) y a 10°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo. Análisis cualitativo GC/MS. (**Figuras 71- A y 71-B**).

<i>Acidos grasos</i>	<i>Fase exponencial</i>	<i>Fase estacionaria</i>
	Tr (día 8)	Tr (día 20)
Ac. palmítico	18,99	19,00

Tr: tiempo de retención (min). n/d: no detectado. % similitud: referido al compuesto de la librería Willey275 \geq 99%.

La **Figura 72-A y 72-B** muestra los resultados de GC/MS de los ácidos grasos obtenidos a partir de los cultivos realizados bajo las mismas condiciones del caso anterior pero con el medio RLMO diluido al 50% p/v; en este ensayo de GC/MS, se aprecia una notable diferencia con el caso anterior en relación al contenido de ácidos grasos detectados. Se pudo detectar durante la fase exponencial de crecimiento ac. palmítico, y tras 20 días de cultivo, es decir durante la fase estacionaria de crecimiento se detectaron ac. mirístico, ac. palmítico, ac. palmitoleico, ac. esteárico, ac. oleico, ac. linoleico y ac. α -linolénico (**Tabla 58**).

Tabla 58. Lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 50% p/v de concentración con alta intensidad de iluminación (AIL) (80 W*m⁻²) y a 10°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo. Análisis cualitativo GC/MS. (**Figuras 72- A y 72-B**).

<i>Acidos grasos</i>	<i>Fase exponencial</i>	<i>Fase estacionaria</i>
	Tr (día 8)	Tr (día 20)
Ac. mirístico	n/d	15,48
Ac. palmítico	20,99	19,20
Ac. palmitoleico	n/d	19,61
Ac. esteárico	n/d	22,83
Ac. oleico	n/d	22,97
Ac. linoleico	n/d	23,50
Ac. α -linolénico	n/d	24,49

Tr: tiempo de retención (min). n/d: no detectado. % similitud: referido al compuesto de la librería Willey275 \geq 99%.

5.5. Estudio realizado a 20°C con medio de cultivo RLMO al 20%, p/v con baja intensidad de luz (BIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.

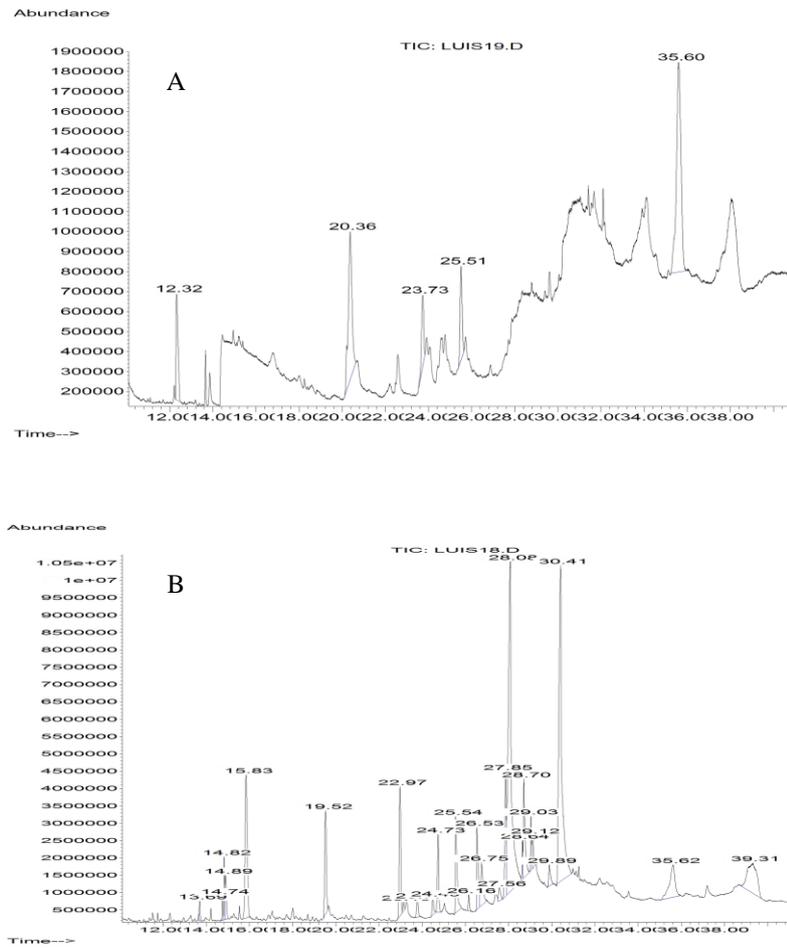


Figura 73. Análisis de GC/MS cualitativo de lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 20% p/v de concentración con baja intensidad de iluminación (BIL) ($26.8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) y a 20°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo.

5.6. Estudio realizado a 20°C con medio de cultivo RLMo al 50% p/v con baja intensidad de luz (BIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.

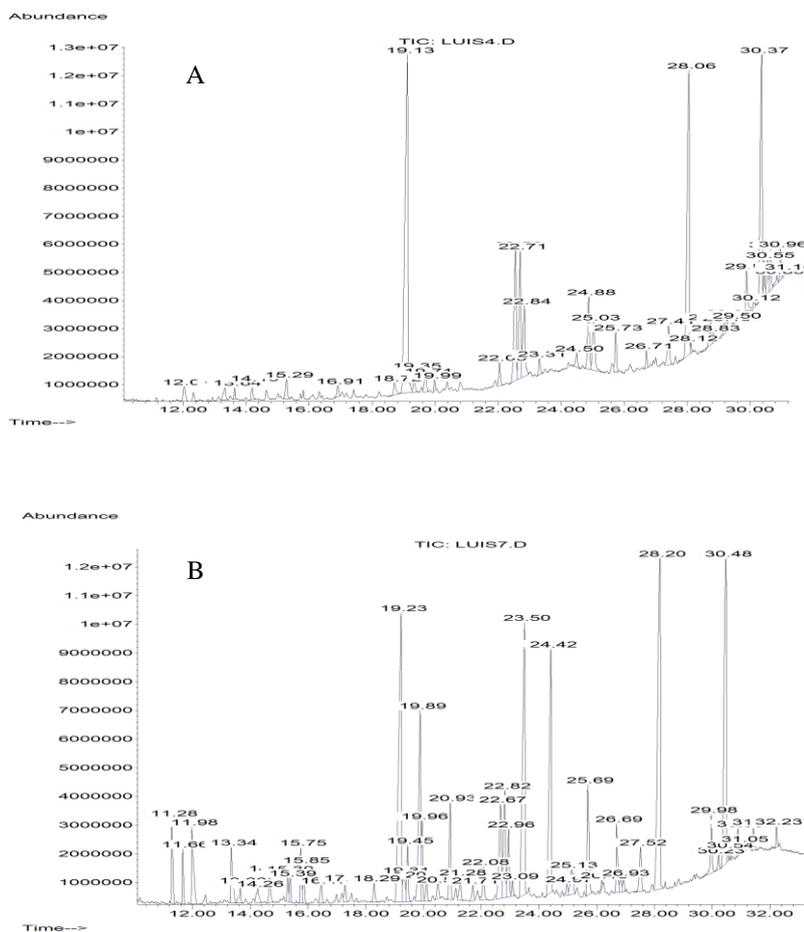


Figura 74. Análisis de GC/MS cualitativo de lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMo al 50% p/v de concentración con baja intensidad de iluminación (BIL) ($26.8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) y a 20°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo.

La **Figura 73-A** muestra los resultados de ácidos grasos obtenidos mediante GC/MS en los cultivos realizados bajo condiciones de baja iluminación y con el medio de cultivo RLMO al 20% de dilución; bajo estas condiciones se detectaron durante la fase exponencial tres ácidos grasos, ac. palmítico, ac. esteárico y ac. α -linolénico y un mayor número de ácidos grasos durante la fase estacionaria de crecimiento (20 días); cabe destacar que el ácido α -linolénico se encontraba presente a los 8 días pero no se detectó a los 20 días. (**Tabla 59**).

Tabla 59. Lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 20% p/v de concentración con baja intensidad de iluminación (BIL) ($26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) y a 20°C . **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo. Análisis cualitativo GC/MS. (**Figuras 73-A y 73-B**).

<i>Ácidos grasos</i>	<i>Fase exponencial</i>	<i>Fase estacionaria</i>
	Tr (día 8)	Tr (día 20)
Ac. mirístico	n/d	15,83
Ác. palmítico	20,36	19,52
Ac. esteárico	23,73	22,97
Ac. α -linolénico	25,51	n/d
Ac. oleico	n/d	23,13
Ac. linoleico	n/d	23,77

Tr: tiempo de retención (min). n/d: no detectado. % similitud: referido al compuesto de la librería Willey275 $\geq 99\%$.

En la **Figura 74-A** se muestra los cultivos realizados bajo condiciones de baja iluminación y con el medio de cultivo al 50% de dilución, donde se puede observar la presencia de 3 ácidos grasos esenciales tras 8 días de cultivo (fase exponencial de crecimiento). Sin embargo en la **Figura 74-B**, se pudo observar tras el análisis GC/MS cualitativo del ensayo a los 20 días de cultivo (fase estacionaria de cultivo) la presencia de un mayor número de ácidos grasos (**Tabla 60**).

Tabla 60. Lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 50% p/v de concentración con baja intensidad de iluminación (BIL) ($26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) y a 20°C . **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo. Análisis cualitativo GC/MS. (**Figuras 74-A y 74-B**).

<i>Ácidos grasos</i>	<i>Fase exponencial</i>	<i>Fase estacionaria</i>
	Tr (día 8)	Tr (día 20)
Ac. mirístico	15,29	15,39
Ac. palmítico	19,13	19,23
Ac. palmitoleico	n/d	19,45
Ác. margárico	n/d	20,08
Ac. esteárico	n/d	22,67
Ac. oleico	22,84	22,96
Ac. linoleico	n/d	23,50
Ac. α -linolénico	n/d	24,42

Tr: tiempo de retención (min). n/d: no detectado. % similitud: referido al compuesto de la librería Willey275 $\geq 99\%$.

5.7. Estudio realizado a 20°C con medio de cultivo RLMO al 20%, p/v con alta intensidad de luz (AIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.

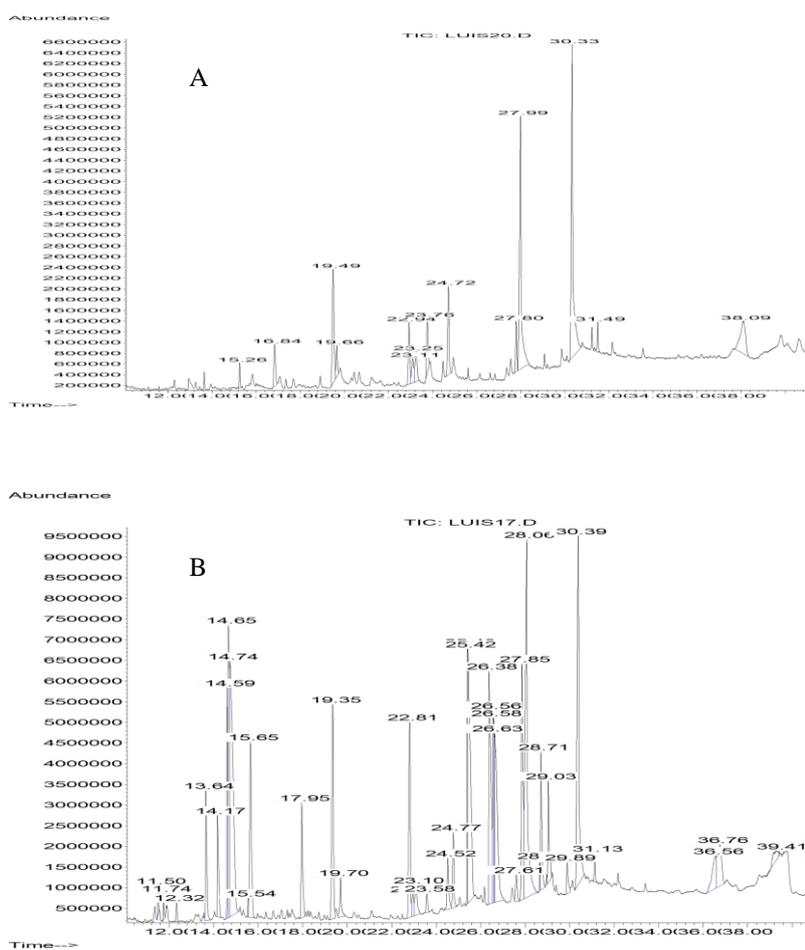


Figura 75. Análisis de GC/MS cualitativo de lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 20% p/v de concentración con alta intensidad de iluminación (AIL) ($80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) y a 20°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo.

5.8. Estudio realizado a 20°C con medio de cultivo RLMO al 50%, p/v con alta intensidad de luz (AIL) a los 8 días de cultivo y a los 20 días de cultivo.

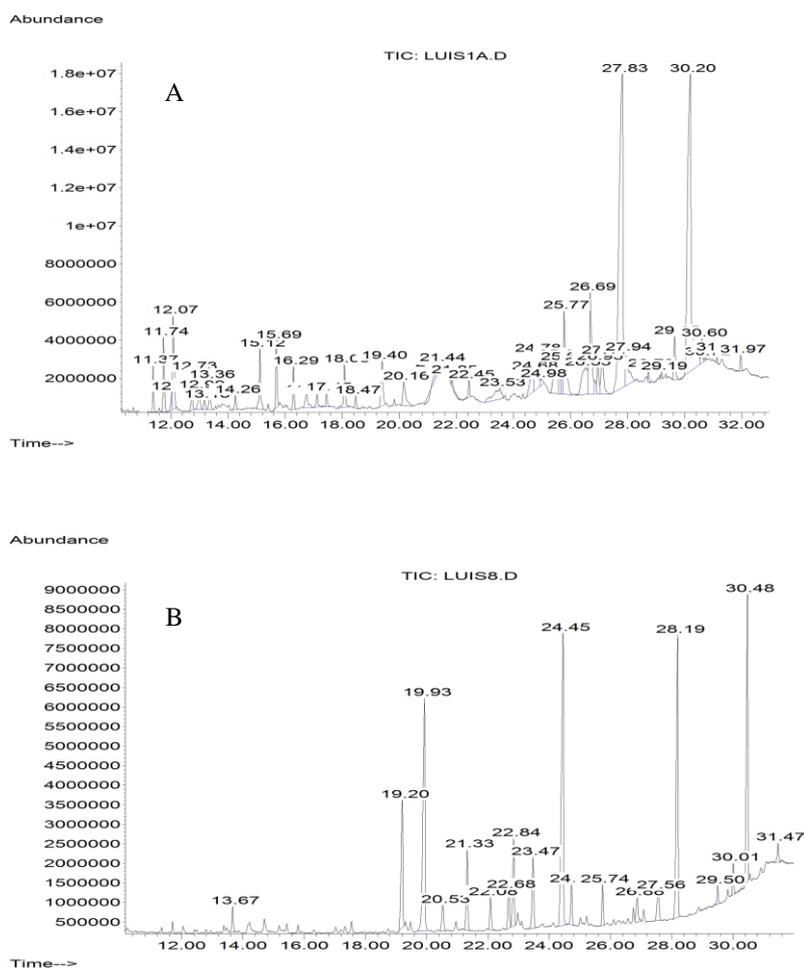


Figura 76. Análisis GC/MS cualitativo de lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 20% p/v de concentración con alta intensidad de iluminación (AIL) ($80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) y a 20°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo.

En la **Figura 75-A** se muestra el resultado del análisis de GC/MS correspondiente con los cultivos realizados bajo condiciones de alta iluminación y con el medio de cultivo al 20% de dilución a los 8 días de ensayo; bajo estas condiciones se detectaron tres ácidos grasos, ac. palmítico, ac. esteárico, y ac. oleico, siendo mayor el número de ácidos grasos esenciales detectados durante la fase estacionaria de crecimiento microalgal. Durante esta última etapa, es decir tras 20 días de cultivo se detectaron los siguientes ácidos grasos: ac. mirístico, ac. palmítico, ac. esteárico, ac. oleico, ac. linoleico (**Tabla 61**). Cabe destacar que durante la fase exponencial de crecimiento no se detectó ni ac. mirístico ni ac. linoleico.

Tabla 61. Lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 20% p/v de concentración con alta intensidad de iluminación (AIL) (80 W*m⁻²) y a 20°C. **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo. Análisis cualitativo GC/MS. (**Figuras 75-A y 75-B**).

<i>Acidos grasos</i>	<i>Fase exponencial</i>	<i>Fase estacionaria</i>
	Tr (día 8)	Tr (día 20)
Ac. mirístico	n/d	15,65
Ac. palmítico	19,49	19,35
Ac. esteárico	22,94	22,81
Ac. oleico	23,11	22,95
Ac. linoleico	n/d	23,58

Tr: tiempo de retención (min). n/d: no detectado. % similitud: referido al compuesto de la librería Willey275 \geq 99%.

La **Figura 76-A y 76-B** muestra los resultados de GC/MS de ácidos grasos detectados en los cultivos sometidos a condiciones de alta iluminación, 20°C y con el medio de cultivo RLMO al 50% de dilución. en estos ensayos durante la fase exponencial de crecimiento se detectaron tres ácidos grasos esenciales, ac. palmítico, ac. oleico y ac. linoleico, no obstante y bajo las mismas condiciones pero tras 20 días de cultivo, es decir durante la fase estacionaria de crecimiento se detectaron dos ácidos grasos más, el ac. esteárico y el ac. α -linolénico (**Tabla 62**).

Tabla 62. Lípidos esenciales de la microalga S21 en medio de cultivo RLMO al 50% p/v de concentración con alta intensidad de iluminación (AIL) ($80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) y a 20°C . **A:** tras 8 días de cultivo. **B:** tras 20 días de cultivo. Análisis cualitativo GC/MS. (**Figuras 76-A y 76-B**).

<i>Ácidos grasos</i>	<i>Fase exponencial</i>	<i>Fase estacionaria</i>
	Tr (día 8)	Tr (día 20)
Ac. palmítico	19,40	19,20
Ac. esteárico	n/d	22,68
Ac. oleico	24,98	22,84
Ac. linoleico	23,53	23,47
Ac. α -linolénico	n/d	24,45

Tr: tiempo de retención (min). n/d: no detectado. % similitud: referido al compuesto de la librería Willey275 $\geq 99\%$.

V.- DISCUSIÓN

En los últimos años, para entender los procesos microbianos en hábitats acuáticos, se ha considerado como requisito necesario el análisis de la estructura de las poblaciones allí existentes. El estudio de las poblaciones microbianas, abarca tanto microorganismos cultivables como los no cultivables, siendo objeto de estudio en el presente trabajo los microorganismos cultivables.

El primer paso para conocer y entender la ecología de los microorganismos cultivables de la laguna de *La Caldera*, es el estudio de los microorganismos allí presentes, tanto su abundancia numérica de acuerdo a su crecimiento en cultivos puros, como su identificación genética (Burns *et al.*, 2004).

Selección de medio de cultivo

Tal y como se ha descrito en el apartado de resultados, los medios utilizados para este estudio fueron el medio RL, GL y un tercer medio de cultivo diseñado por nuestro equipo de trabajo para estos ensayos, denominado RLMo. Se ha podido demostrar que las microalgas *SXI* y *Scenedesmus obliquus* son capaces de crecer y desarrollarse tanto a 10°C como a 20°C y en todas las diluciones ensayadas y sin diluir de los medios de cultivo ensayados, no obstante, se apreció un efecto significativo en los cultivos, dependiendo de las distintas condiciones empleadas, la mayor producción de biomasa se obtuvo en los ensayos con la microalga *Scenedesmus obliquus* cuando se cultivó a 20°C con los medios RL y RLMo. Por otro lado, cuando se cultivó la microalga *SXI*, la mayor producción de biomasa se obtuvo en cultivos a 20°C con el medio RLMo al 50% de dilución. Con ambas microalgas ensayadas, los valores más bajos de producción de biomasa se obtuvieron con el medio GL tanto a 10°C como a 20°C con sus respectivas diluciones y sin diluir.

Esta diferencia podría deberse a que si bien, los medios de cultivos ensayados presentan en su composición, disponibilidad de nitrógeno y fósforo como nutrientes principales, el medio RL y RLMo contienen nitrógeno en la forma de KNO_3 y NH_4Cl utilizado habitualmente como referencia de fuente de nitrógeno para algunas microalgas, mientras que el medio GL contiene nitrógeno en la forma de NaNO_3 . Talukdar *et al.* en 2012, demostraron que algunas microalgas tienen ciertas afinidades en la utilización del nitrógeno y ésta varía dependiendo del grado de oxidación y/o potencial iónico. Estos autores demostraron que la microalga *Ankistrodesmus falcatus* prefiere la utilización de nitrógeno de acuerdo al siguiente orden: $\text{KNO}_3 > \text{NaNO}_3 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Esta preferencia también fue comentada en 1971 cuando Smith *et al.* demostraron que la presencia de nitratos inducía la síntesis de la nitrato-dismutasa, existiendo diferencias en los niveles de inducción y dependiendo de los cationes que se utilicen. Por otro lado, se ha demostrado que las microalgas son capaces de proliferar empleando diversas fuentes de nitrógeno; se ha podido ver -incluso- que la forma de nitrato es la mejor fuente de nitrógeno en cultivos de *Chlorella protothecoides* (Shen *et al.*, 2009, Shen *et al.*, 2010), *Dunaliella tertiolecta* (Chen *et al.*, 2011) y *Neochloris oleoabundans* (Li *et al.*, 2008), mientras que *Scenedesmus dimorphus* y *Scenedesmus rubescens* presentaron mayor afinidad por la urea y el ión amonio, respectivamente (Shen *et al.*, 2009; Lin y Lin, 2011) y *Chlorella saccharophilase* prolifera mejor en presencia de peptona como fuente de nitrógeno, frente a nitrato y amonio (Isleten *et al.*, 2012).

Por otro lado, de acuerdo con Soletto *et al.* (2005), si bien la presencia de nutrientes es muy importante y decisivo cuando se diseña un cultivo microalgal, el exceso de nutrientes podría provocar un efector inhibitorio el crecimiento de algunas microalgas. En nuestros ensayos, se ha podido demostrar una leve inhibición por exceso de nutrientes en la producción de biomasa con la microalga SX1, cuando esta microalga fue cultivada a 10°C y los medios RL y RLMo sin diluir; en estos medios se observó una menor concentración de biomasa, obteniéndose un 5% menos en el caso del medio RLMo y un 32 % de diferencia cuando se utilizó el medio RL en relación a los ensayos realizados con estos medios de cultivo al 50% de dilución. Se pudo detectar un leve

comportamiento de inhibición en función de la concentración de nutrientes, en especial con el medio RL; no obstante, la microalga de colección *Scenedesmus obliquus*, generó los mejores valores de crecimientos cuando los ensayos se llevaron a cabo con los medios de cultivo sin diluir, lo cual nos indica que las microalgas ensayadas, tanto *Scenedesmus obliquus* como SX1 tienen diferente comportamiento en la producción de biomasa en función de la concentración y/o disponibilidad de nutrientes.

La microalga *Scenedesmus obliquus* presentó los mejores valores de producción de biomasa cuando esta fue cultivada a 20° en comparación con los ensayos de esta misma microalga a 10°C. Teniendo en cuenta que esta microalga presenta una temperatura óptima de crecimiento cercanos a los 31-32°C (Martínez *et al.*, 1999), se observó que podía proliferar en los 3 medios ensayados, y favorablemente a medida que los medios de cultivo no presentaban grado de dilución, registrando la mayor producción de biomasa cuando los tres medios de cultivos se ensayaron sin diluir. Es de destacar que en comparación con los medios RL y RLMo, el medio GL contiene fuente de nitrógeno en exceso, aproximadamente un 50% más de nitrógeno con respecto al medio RLMo y un 88 % más de nitrógeno con respecto al medio RL; se intuye así, que en los cultivos a ambas temperaturas podría existir un efecto de inhibición relacionado por el exceso de nitrógeno presente en este medio de cultivo, puesto que con el medio GL se obtuvieron los valores más bajos de producción de biomasa. Según esta afirmación, a la microalga *Scenedesmus obliquus* se le atribuye un posible grado de inhibición a medida que aumenta la concentración de nitrógeno. Sin embargo, Voltolina *et al.* 2005, afirmaron una tendencia contraria a estos resultados, demostrando que la microalga *Scenedesmus obliquus* presenta una disminución de la eficiencia de asimilación de nitrógeno a medida que aumentaba la dilución del medio. Nuñez *et al.*, 2001, obtuvo resultados similares, concluyendo que incluso la producción de proteínas es menor cuando el medio de cultivo se encuentra con mayor grado de dilución, por lo que, con estos antecedentes, no sería posible atribuir los bajos valores de producción de biomasa con el medio GL al exceso de nitrógeno, sino a la naturaleza química del nitrógeno. Es por esta capacidad de proliferar a altos niveles de nitrógeno, que numerosos autores han recomendado la utilización de

esta microalga para el tratamiento de sistemas eutrofizados (Lavoie *et al.*, 1985; Martínez *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2012).

| 238

Muy por el contrario, la microalga SX1 que tiene una correspondencia genética de un 99% con *Chlorella vulgaris*, mostró en todos los ensayos que podía crecer y desarrollarse cuando el medio presentaba cierto grado de dilución, siendo el medio de cultivo RLMO el que presentó las mejores condiciones nutricionales para su desarrollo.

El medio RL contiene aproximadamente un 80 % menos de nitrógeno que en el medio GL, el cual aún diluido presenta concentraciones de nitrógeno superiores los 20 mg*L⁻¹; se ha descrito en bibliografía que la microalga *Chlorella vulgaris* presenta un grado de inhibición a altas concentraciones de nutrientes. Tam *et al.*, 1996, comentan que *Chlorella vulgaris* disminuye su capacidad de asimilación de nitrógeno cuando éste se encontraba en concentraciones superiores a 80 mg*L⁻¹. Shukla *et al.*, 2011 describieron una serie de microalgas que requieren bajos niveles de radiación lumínica, nutrientes y temperatura para desarrollarse, entre ellas *Chlorella vulgaris*. Sin embargo, existen autores que afirman que las clorofitas, son candidatas idóneas, para tratamientos de agua; así, para Chacón *et al.*, 2004 tanto *Chlorella vulgaris* como *Scenedesmus obliquus* son capaces de reducir la demanda química de oxígeno (DQO) de una planta de tratamiento en un 55,8 % y en un 54,8 % respectivamente, y el nitrógeno puede ser eliminado en un 100%, partiendo de concentraciones de nitrógeno amoniacal de 25 a 30 mg*L⁻¹. Con todo ello, se sugiere que la utilización de microalgas para el tratamiento de aguas con altos contenidos de nitrógeno, dependerá de las características de cada microalga frente a distintas concentraciones de nitrógeno (Xin *et al.*, 2010).

En relación a las diferentes temperaturas utilizadas, se pudo observar que las microalgas ensayadas se adaptaron a ambas temperaturas, pudiéndose obtener valores positivos de biomasa en todos los experimentos realizados.

Se obtuvo óptimo de concentración de biomasa con la microalga *Scenedesmus obliquus* en los ensayos realizados a 20°C en relación a los cultivos realizados a 10°C. Martínez *et al.* (1999), comprobaron que la microalga *Scenedesmus obliquus* presenta una máxima producción de biomasa a 20°C, sin embargo la velocidad de crecimiento (V_c) es mayor a 30°C y 35°C; esto sugiere que si bien la velocidad de crecimiento está relacionada con la producción de biomasa, éstas no están correlacionadas entre sí en función de la temperatura. Con esta microalga se demostró que, si bien su temperatura de óptima de crecimiento es cercana a los 30°C, la mayor producción de biomasa se obtiene a 20°C, aludiendo a que es preferible un valor constante de velocidad de crecimiento en el tiempo, que un valor alto de V_c , pero muy efímero en el tiempo, es decir, un alto valor de V_c no se traduce necesariamente en producción y acumulación de biomasa.

Castillo *et al.* (19809, por otro lado, demostraron que la temperatura óptima de crecimiento depende a su vez, de la cantidad de radiación lumínica aportada al cultivo, demostrando que la microalga *Scenedesmus bijugates* -por ejemplo- posee un crecimiento óptimo a 37°C cuando la radiación lumínica se sitúa entre los 11,8 $W \cdot m^{-2}$ y 23 $W \cdot m^{-2}$. Sin embargo cuando la radiación lumínica era inferior a 11,8 $W \cdot m^{-2}$ la temperatura óptima de crecimiento disminuye a 32°C, estableciendo una relación directa entre la cantidad de radiación lumínica y la temperatura óptima de crecimiento.

Hodaifa *et al.* (2010) demostraron que la temperatura de cultivo también afecta de forma directa la asimilación de nutrientes, estableciendo una temperatura máxima, en que la microalga *Scenedesmus obliquus* no asimila eficientemente los nutrientes; esto hace necesario la búsqueda de modelos predictivos con ecuaciones matemáticas, con objeto de poder establecer el máximo de consumo de nutrientes en función de la temperatura. Con esta información se hace necesario el estudio específico de condiciones de cultivo en función de los objetivos perseguidos, haciendo imprescindible la búsqueda de microorganismos que tengan una gran adaptación a las distintas condiciones nutricionales.

En el caso de la microalga SX1, la temperatura en la que presentó la mayor producción de biomasa, también se observó a 20°C con el medio RLMo, dato que no concuerda con la temperatura ambiental en la cual fue aislada e identificada (cerca a los 12°C) (Andrade *et al.*, 2014). Esta microalga, posee una similitud filogenética del 99% con *Chlorella vulgaris* la cual, se ha demostrado en bibliografía que la temperatura óptima de crecimiento está comprendida en un rango de 20°C y los 30°C, existiendo incluso un máximo de intensidad de radiación lumínica de 30 W*m⁻² según los ensayos realizados por Dauta *et al.* (1990).

Por otro lado, Converti *et al.*, (2009) demostraron que esta microalga puede proliferar incluso a temperaturas cercanas a 38°C. De acuerdo con nuestros resultados y los consultados en bibliografía, se puede afirmar que esta microalga posee una gran capacidad de adaptación térmica.

En nuestros ensayos se pudo observar que la mayor cantidad de biomasa obtenida fue a 20°C en cultivos sometidos a una radiación lumínica de 80 W*m⁻², sin embargo a 10°C también se logró una producción de biomasa similar, obteniéndose un 10% menos que a 20°C. Maxwell *et al.* (1994) demostraron que si bien la temperatura óptima de crecimiento de *Chlorella vulgaris* es de 27°C, cuando ésta es cultivada a 5°C y luego se incrementa la temperatura a 27°C, se incrementa la producción de lípidos y pigmentos, demostrando que el cambio de temperatura produce un efecto inductor de estrés, lo que lleva a esta microalga a la producción de compuestos con interés biotecnológico.

Variaciones del estado fisiológico de la microalga S21

Actualmente y desde hace unas décadas, son numerosos los estudios sobre el desarrollo de sistemas de producción de biomasa y de componentes con alto interés biotecnológico a gran escala, con implicación directa de microalgas, no obstante muchos de estos avances, en ocasiones, se han visto limitados por la falta de un conocimiento más profundo sobre el estado metabólico y fisiológico de estos microorganismos.

Con el fin de poder evaluar detalladamente el comportamiento fisiológico de los microorganismos utilizados en biotecnología, se han llevado a cabo numerosos ensayos, modificando factores ambientales y nutricionales en los cultivos, puesto que son estos factores, los que afectan de manera directa a la producción de biomasa y el caso de la producción de biodiesel, la síntesis de lípidos a nivel intracelular, dando como resultado la mejora o la optimización en la producción de compuestos con interés biotecnológico, (Yeesang *et al.*, 2011; Zepka *et al.*, 2008).

En general, las microalgas requieren para su crecimiento óptimo, un suministro constante de carbono y una fuente de luz para poder realizar los procesos fotosintéticos. Sin embargo, como respuesta a la modificación de factores ambientales, estos microorganismos logran adaptarse poniendo en funcionamiento diversos tipos de metabolismos (fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico, fotoheterotrófico). Al considerar la utilización de microalgas para la producción de biomasa, es importante definir cuantitativamente la influencia de factores que intervienen en su crecimiento y que favorecen la producción de biomasa, así como la interacción de los factores para poder obtener una biomasa con determinadas características bioquímicas.

Por otro lado, el perfil de ácidos grasos de las microalgas varía no sólo entre especies sino también en función de los factores aplicados al cultivo microalgal (Miao y Wu, 2006; Hu *et al.*, 2008; Converti *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2010), del periodo de recolección de biomasa y la edad del cultivo (Mandal y Mallick, 2009; Widjaja *et al.*, 2009).

Los factores ambientales y nutricionales más importantes son la concentración de nutrientes, la cantidad de luz y la temperatura; De hecho, para muchos autores, el comportamiento de las microalgas ante condiciones de estrés fisiológico, varía entre especies, en especial la limitación de nutrientes como el nitrógeno y fósforo; Es por ello, que se considera, el crecimiento heterotrófico y las altas intensidades lumínicas, como las estrategias más eficientes para mejorar

el contenido de lípidos en las microalgas, en particular de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, ideales para la producción de biodiesel (Arias-Peñaranda *et al.*, 2013).

Efecto de la intensidad lumínica sobre microalgas

Un aspecto importante a considerar cuando se cultivan microalgas, es el objetivo principal que se persigue, por ejemplo, la producción de biocombustibles. En tal caso, la intensidad lumínica, influye notablemente en la actividad fotosintética y por consiguiente, el contenido de pigmentos y composición química de la microalga. En este sentido, la acumulación de lípidos puede verse afectada por la exposición del cultivo a diferentes regímenes de luz, por lo que es necesario tener en consideración la intensidad lumínica, la calidad espectral y la necesidad de establecer un fotoperiodo. Ruangsomboon. (2012) cultivó la microalga *Botryococcus braunii*, perteneciente a la división de las clorofitas, bajo diferentes intensidades y regímenes de luz/oscuridad, estableciendo que la radiación lumínica es uno de los factores más importantes en el metabolismo microalgal, afectando directamente a la capacidad de almacenamiento de lípidos en microalgas.

En nuestros estudios se evaluó el efecto de la luz sobre cultivos de la microalga S21. Se consideró como baja radiación lumínica $26,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ y como alta radiación lumínica $80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$; estos parámetros se determinaron basándonos en los ensayos realizados por Hodaifa *et al.* (2009) quienes demostraron que el crecimiento de la microalga clorofita *Scenedesmus obliquus* se inhibía en cultivos sometidos a intensidades de radiación lumínica superiores a $70,57 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

Existe una relación directa entre la cantidad de luz y el crecimiento microalgal. En nuestros estudios, hemos podido observar mediante técnicas de Citometría de Flujo que la viabilidad celular de la microalga S21 se ve afectada cuando ésta es cultivada a diferentes intensidades de radiación lumínica.

Hyka et al. 2013, describen la importancia del estudio de la viabilidad en cultivos microalgales, afirmando que una célula viable participa activamente en el crecimiento y producción de biomasa. En nuestros estudios a 10°C, se demostró que existe una relación directa entre los cultivos llevados a cabo con AIL (alta intensidad lumínica) y la viabilidad celular a lo largo del tiempo de cultivo.

Así, a 10°C se observó una alta viabilidad en cultivos sometidos a baja intensidad de luz (BIL) y alta intensidad de luz (AIL), en la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, tras 20 días, los cultivos sometidos a BIL, presentaron una alta mortalidad, detectándose remanentes viables relativamente bajos (entre 15% y 18%). Por otro lado, en los cultivos sometidos a AIL, sí se detectaron valores de células viables considerablemente altos (de 96% a un 98%), tras 20 días. *Wahidin et al.* en 2013, obtuvieron resultados similares con *Nannochloropsis* sp., concluyendo que, al ser la luz la principal fuente de energía, es fundamental que ésta esté presente en todas las fases de proliferación y en especial en la fase exponencial de crecimiento, debido a que si no hay una buena relación luz-fotosíntesis en la fase exponencial de crecimiento, no se favorece el desarrollo óptimo celular, afectando directamente a la viabilidad celular en el tiempo.

En nuestros ensayos, esta tendencia también se vio reflejada en la integridad celular, puesto que tras 20 días de cultivo a 10°C con BIL, no se detectó células con capacidad de homeostasis íntegra, por lo que tampoco se detectó actividad de polaridad de membrana, lo que a su vez se tradujo en un aumento de lípidos neutros intracelulares, aproximadamente de un 100% más, en comparación a los presentes a los 8 días de cultivo. Todo ello indica que, independientemente de que si el inoculo es viable o no en los primeros días de cultivo, habrá mayor probabilidad de que el cultivo sea viable en el tiempo si se le proporciona condiciones lumínicas favorables, en este caso valores cercanos a 80 W*m².

En los ensayos a 20°C y tras 8 días de cultivo, al igual a 10°C se evidenciaron valores de alrededor del 80 % de población viable, aunque ligeramente mayor en los cultivos con AIL;

además se pudo detectar la alta polarización de membrana encontrada en relación al cultivo llevado a cabo con BIL. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los cultivos a 10°C, en especial cuando se comparó la polaridad de membrana, es decir, a ambas temperaturas fue mayor en los cultivos con AIL, atribuyendo esta actividad de membrana a la presencia de luz; sin embargo a esta misma temperatura y tras 20 días de cultivo, la proporción de la población celular viable fue ligeramente menor cuando los cultivos se llevaron a cabo con AIL respecto a los valores de células viables presentes en los cultivos con BIL; este resultado resulta ser opuesto a la tendencia encontrada a 10°C, lo que podría deberse a que si bien la presencia de luz ejerce un efecto positivo sobre la viabilidad celular, el aumento de la temperatura podría generar un efecto de estrés provocado por el exceso de luz, traduciéndose en la acumulación de lípidos totales. Todo ello concuerda con los resultados de lípidos detectados, observándose un 50% más de lípidos totales con respecto a los encontrados a los 8 días de cultivo, y hasta 4 veces más que cuando se realizó el cultivo a 10°C bajo las mismas condiciones.

Estos resultado concuerdan con los obtenidos por Cheirsilp y Torpee en 2012, quienes comprobaron que el aumento en la intensidad de 9,2 a 37 W*m⁻² favorecía el crecimiento de la microalga marina *Chlorella* sp., no obstante habría que tener en cuenta que el incremento hasta 46,7 W*m⁻² lo disminuía ligeramente.

Este efecto se conoce como *Efecto Inhibitorio por Luz*, descrito por Fogg en 1965. Sin embargo hay que advertir que existen microalgas que no sufren este efecto, tal es el caso de *Nannochloropsis* sp. capaz de crecer de forma continua en todo el rango de radiación lumínica evaluado (9,2 – 46,7 W*m⁻²), y mostrando una gran capacidad de aclimatación a la luz.

De igual forma, Simionato *et al.* (2011) observaron tasas de crecimiento similares para *Nannochloropsis gaditana* en una amplia gama de irradiaciones, observándose diferencias cuando los cultivos fueron llevados a cabo bajo condiciones extremas; los cultivos expuestos a radiación

lumínica del orden de $1 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ se desarrollaron lentamente mientras los cultivos sometidos a valores sobre los $284,6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ logran alcanzar la fase estacionaria rápidamente.

Este comportamiento parece verse reflejado en la producción de lípidos, como ocurrió en nuestros ensayos, ya que según estos mismos autores, si bien, la acumulación lípidos ocurre durante la fase estacionaria, la acumulación de lípidos, resultó ser muy similar en los ensayos realizados con radiaciones lumínicas comprendidas entre los 1 y los $47,4 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$; No obstante, hay que tener en cuenta que a valores mayores de $284,6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ la síntesis de lípidos se inicia más temprano.

Concluyendo, la radiación lumínica por sí sola no parece inducir directamente la acumulación de lípidos, pero un exceso de radiación lumínica sí puede traducirse en un el efecto de estrés. En nuestros ensayos con la microalga S21 se obtuvieron resultados similares a los descritos por estos autores, llegándose a observar en la fase estacionaria un acúmulo celular de lípidos totales del orden del 67,6% a 20°C tras 20 días en comparación a los 11,2% de lípidos totales en la fase exponencial bajo las mismas condiciones.

Por otro lado, si bien hubo un aumento de lípidos totales, también se pudo observar un incremento en la variedad de lípidos neutros, principalmente de ácidos grasos como C:14, C:16 y C:18; tal fenómeno también fue descrito por Pal *et al.* en 2011, en ensayos con *Nannochloropsis* sp. sometidos a altas radiaciones lumínicas y de salinidad, y por Cheirsilp y Torpee en 2012, en cultivos con microalgas marinas (*Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp.).

Estos últimos autores lograron duplicar el contenido de lípidos cuando aumentaban gradualmente la intensidad de radiación lumínica. Algo similar ocurrió en los cultivos realizados con la microalga S21 a 20°C , sin embargo a 10°C y tras 20 días de incubación la cantidad de lípidos totales disminuyó de 19,3 a 10,7% (peso seco) bajo las mismas condiciones de radiación lumínica, lo cual podría deberse a la escasa viabilidad celular en la fase exponencial de

crecimiento, afectando directamente la capacidad metabólica de la microalga y por consiguiente generando un efecto negativo en la integridad celular y la polaridad de membrana. En este sentido, la intensidad lumínica ejerce un efecto positivo sobre la integridad celular, lo que se traduce en niveles aceptables de viabilidad a lo largo del tiempo (Hyka *et al.*, 2013).

Hernández *et al.* (2014) hablan de la importancia de las condiciones de cultivo sobre el sistema metabólico microalgal, y consideran la posibilidad de que exista un deterioro y por tanto efectos negativos sobre el crecimiento y la integridad celular cuando las condiciones lumínicas no son las adecuadas. Tredici (2010) menciona la importancia de la iluminación en etapas iniciales de cultivo, puesto que en esta etapa de cultivo, es cuando la maquinaria fotosintética es más eficiente. En la misma línea, Guerrero *et al.* (1999) mencionan el importante papel estructural de los carotenoides, los cuales ayudan a mantener la integridad tridimensional de la maquinaria fotosintética dentro de las membranas tilacoidales en los cloroplastos, ya que ciertos carotenoides, como la luteína, son fundamentales para el adecuado ensamblaje de los complejos captadores de luz en todas las etapas de cultivo y por consiguiente un papel muy importante en la fotosíntesis. Esto podría dar una explicación a la poca viabilidad encontrada en los cultivos con BIL a 10°C, puesto que no se encontraron microalgas celularmente integra, debido a que no detectó actividad en la membrana celular.

El efecto de la radiación lumínica sobre la polaridad de membrana puede mostrarnos una señal sobre lo que ocurre a nivel intracelular bajo diferentes condiciones de cultivo; en este sentido, el efecto de la luz conlleva un aumento en la actividad metabólica. En nuestro estudio, se pudo establecer una relación entre la cantidad de lípidos totales obtenidos y el aumento de actividad metabólica en función de la polaridad de membrana.

Guschina *et al.* (2006) destacan la relación entre la actividad metabólica y la producción de lípidos, mencionando que existe una relación directamente proporcional entre la intensidad lumínica y la producción de ácidos grasos saturados; sin embargo numerosos autores establecen

unos límites, aludiendo a unas radiaciones lumínicas óptimas, pudiendo ocurrir una inhibición en la producción de lípidos por exceso de luz. (Gim *et al.*, 2016; Bohutskyi *et al.*, 2016; Sathe *et al.*, 2016).

Es comprensible que la radiación lumínica ejerza un efecto positivo sobre los cultivos microalgales y sobre todo a nivel metabólico, lo cual a su vez dependerá de la microalga estudiada (Wahidin *et al.*, 2013). En general, se obtienen mejores resultados cuando se favorece la fotosíntesis, muchos autores concuerdan que cada microalga necesita requerimientos lumínicos particulares. Gonzalez. (2014) menciona que las clorofitas poseen una gran capacidad de adaptación metabólica a las diferentes intensidades de radiación lumínica, debido a su alto contenido de carotenoides y xantofilas. En nuestro caso, hemos podido comprobar que la microalga S21 guarda una relación filogenética de 99% con las clorofitas.

Nuestra microalga estudiada mostró un aumento de polarización de membrana, viabilidad celular y un ligero aumento en la integridad celular a intensidades lumínicas más altas. El conocer la intensidad de radiación lumínica óptima para el crecimiento de un microorganismo autótrofo nos puede orientar a conocer en parte, las condiciones en las que se podría estimular la producción de lípidos, y/o otros metabolitos de interés biotecnológico.

Efecto del tiempo de cultivo

En el cultivo de microorganismos las diferentes fases de crecimiento son de vital importancia, en especial cuando se persigue un objetivo en concreto. Un campo muy estudiado es el cultivo de las microalgas y su utilización en Biotecnología. De hecho, cada vez es mayor el interés que genera la producción de lípidos a partir de microalgas centrándose las investigaciones fundamentalmente en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento microalgal.

Son numerosos los autores que afirman que la mayor tasa de acumulación de lípidos ocurre en la fase estacionaria de crecimiento y que la edad un cultivo afecta también al contenido y composición de los ácidos grasos de la biomasa (Fidalgo *et al.*, 1998; Arias-Peñaranda *et al.*, 2013; Mansour *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015; Sakarika *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2017)

Generalmente, la acumulación lipídica de las microalgas durante la fase exponencial de crecimiento es $\leq 15\%$ (peso seco), y esto se debe a que estos compuestos sólo se acumulan cuando las células se encuentran bajo condiciones de estrés fisiológico, lo cual generalmente está asociado a condiciones de limitación de nutrientes (nitrógeno, fósforo, luz, etc.) (Li *et al.*, 2008); por otro lado, Chiu *et al.* (2009) observaron que en los cultivos de *Nannochloropsis oculata* la acumulación de lípidos al pasar de la fase exponencial a la estacionaria aumentaba significativamente del 30,8% al 50,4%.

En nuestros ensayos la fase estacionaria comenzó aproximadamente a partir del día 15 de cultivo, detectándose valores de lípidos totales del orden de 23,1 - 27,1 y 44,1- 67,6 % (peso seco) en las fases exponencial y estacionaria respectivamente, en cultivos a 20°C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bigogno *et al.*, 2002, quienes confirmaron un alto contenido de triacilgliceroles (del orden del 43 % del total de ácidos grasos) en la microalga *Parieto chlorisincisa* durante en la fase exponencial, y del 77% (aún mayor) durante la fase estacionaria. Hsieh *et al.* (2009) comprobaron que *Chlorella* sp. aumenta en casi un 80% la cantidad de lípidos en la fase de crecimiento estacionario respecto a la fase inicial de crecimiento; sin embargo estos autores advierten que la acumulación de lípidos no sólo depende de la fase estacionaria sino también del factor de estrés elegido para inducir dicha acumulación.

Si bien, esta afirmación se comprueba en numeras publicaciones ya mencionadas, también se puede decir que aun cuando el factor de estrés esté presente en todas las fase de cultivo, es sólo en la fase estacionaria donde se produce mayormente el efecto acumulativo de lípidos.

Como se comprueba en nuestros ensayos, los factores de estrés se incluyeron en las fases tempranas de crecimiento, y este hecho puede ejercer un efecto negativo sobre la viabilidad e integridad celular de las poblaciones microalgales. Todo esto puede comprometer la viabilidad del cultivo en el tiempo e incluso inducir a que el cultivo no supere la fase lag de crecimiento y por ende, a que el cultivo no alcance la fase estacionaria de crecimiento esperado.

Esta tendencia pudo ser observada en los cultivos de la microalga S21 a 20°C, obteniendo un total de 27,1 % de lípidos en la fase exponencial de crecimiento frente a los 67,1 % de lípidos totales en la fase estacionaria. Sin embargo cuando el cultivo se llevó a cabo a 10°C, los resultados fueron diametralmente opuestos, debido a que hubo mayor presencia de lípidos totales en la fase exponencial de crecimiento respecto a los encontrados en la fase estacionaria. Esto podría deberse a que el cultivo inicial a 10°C, a pesar de la presencia de células altamente viables, las condiciones externas no eran las óptimas, ni favorecían el metabolismo celular, provocando una situación poco próspera para el crecimiento celular. Este hecho se pudo comprobar, puesto que tras 20 días de cultivo, la viabilidad celular a 10°C fue menor que los observados a los 8 días de cultivo.

Una explicación a este fenómeno podría ser que, en la fase exponencial de crecimiento los nutrientes se encontraban en exceso y presentaban alta viabilidad celular, sin embargo esta condición debe estar en equilibrio con otros factores de crecimiento, y deben ser constantes en el tiempo, para asegurar la vida del cultivo.

Numerosos autores aseguran que es en la fase estacionaria (la limitada en nutrientes) donde se producen la mayor acumulación de lípidos en relación a la fase exponencial de crecimiento donde no existe limitación de nutrientes (Rodolfi *et al.*, 2009; Widjaja *et al.*, 2009; Beal *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Praveenkumar *et al.*, 2012), sin embargo, esta tendencia no se aplica a todas las microalgas.

Martínez *et al.* (2014) y Pal *et al.* (2011) comprobaron que el incremento de la salinidad en cultivos con *Nannochloropsis* sp. favorece la acumulación de lípidos en microalgas en las primeras 72 horas de cultivo; es por ello que en un proceso a gran escala (en cultivos continuos) podría ser de gran interés mantener la fase exponencial de crecimiento sin necesidad de llegar a la fase estacionaria.

De acuerdo con esta afirmación, la fase de crecimiento requerida dependerá del objetivo que se persiga. Por ejemplo, durante la fase exponencial de crecimiento existe un gran consumo de nutrientes, por lo que, esta etapa puede ser prolongada y mantenida con la finalidad de tratar aguas eutrofizadas con alto contenido en materia orgánica, al contrario de lo que ocurre en la fase estacionaria, donde se producen compuestos asociados a mecanismos de respuesta a condiciones de estrés como acumulación de lípidos, proteínas y otras moléculas, útil en caso de perseguir fines biotecnológicos (Valverde *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2016).

Resulta, por tanto, interesante estudiar las estrategias de cultivo más efectivas de acuerdo al fin que se persiga. Así, en nuestro caso, determinar las condiciones óptimas de crecimiento, tiempo de duración y momento en que se inicia la fase estacionaria de la microalga S21 se podrían traducir en un aumento de la eficiencia de la producción de biomasa y el aumento en contenido de lípidos.

Por otro lado, hay que tener en cuenta aspectos importantes del objetivo biotecnológico que se persigue, es decir, en el caso de la búsqueda de lípidos para la producción de biodiesel, las propiedades y calidad de los lípidos es de vital relevancia. Así, para obtener biodiesel de buena calidad será necesario asegurarse que los lípidos contengan ácidos grasos de cadena larga y bajo grado de insaturación. De hecho, los más interesantes de acuerdo a esta afirmación son los ac. palmitoleico (16:1), oleico (18:1) y mirístico (14:0), puesto que éstos, permiten disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible (número de cetano y estabilidad

oxidativa) sin comprometer sus características de flujo (punto de nube), viscosidad y lubricidad (Knothe, 2005; Mansour *et al.*, 2005; Chisti, 2007; Schenk *et al.*, 2008; Knothe, 2011).

Se ha demostrado que, el tiempo de incubación no sólo afecta positivamente a la acumulación de lípidos en las microalgas, sino que también genera un cambio gradual en la composición de estos metabolitos. Dustan *et al.* (1993) demostraron con tres microalgas que, a medida que avanza la fase estacionaria de cultivo se van incrementando los triglicéridos, ácidos grasos saturados e insaturados, y por consiguiente se produce una reducción de ácidos grasos polares.

Alonso *et al.* (2000) observaron un comportamiento similar en cultivos con *Phaeodactylum tricornutum*; en sus ensayos observaron que si bien no se incrementaba la concentración de lípidos totales, si se obtenía un incremento de triglicéridos y una reducción de lípidos polares. Liu *et al.* (2016) observaron resultados similares, y comprobaron además que, una etapa de oscuridad consigue un incremento en lípidos totales y a su vez de ácidos grasos polinsaturados. Heidari *et al.* (2016) incluyen en sus ensayos con *Chlorella vulgaris* la limitación de nutrientes consiguiendo de este modo incrementar la cantidad de lípidos totales y la composición de estos.

Otros estudios realizados con la microalga *Isochrysis galbana* (Fidalgo *et al.*, 1998) demuestran la importancia del tiempo de cultivo en la producción de lípidos. Estos autores dividen la fase estacionaria en dos subetapas, la temprana y la tardía, demostrando en este caso, que la mayor concentración de lípidos polinsaturados se produce en la fase estacionaria temprana.

Durmaz *et al.* (2007) comentan que es en esta etapa del cultivo cuando la microalga activa e induce el metabolismo de compuestos con interés comercial y biotecnológico; llegado a este punto habría que hacer énfasis en que la producción de compuestos con interés biotecnológico dependerá del conocimiento específico del comportamiento de cada microalga

frente a las condiciones nutricionales y ambientales. Estos mismos autores, demostraron que *N. oculata* produce diferentes concentraciones de esteroides dependiendo de la edad del cultivo y sobre todo de la fuente de nitrógeno utilizada.

| 252

Guschina *et al.* (2006) concluyen que a mayor tiempo de cultivo se obtienen menores cantidades de lípidos polares. Este hecho también pudimos observarlo en nuestros ensayos, ya que, tanto a 10°C como a 20°C tras 20 días de cultivo, las proporciones de lípidos polares disminuyeron en comparación a los lípidos neutros. Datos que concuerdan además con los altos valores de polaridad de membrana obtenidos en comparación a los obtenidos en la fase exponencial de crecimiento.

Se comprobó que, en los cultivos con la microalga *Scenedesmus rubescens*, la limitación de nutrientes en función del tiempo de cultivo pone de manifiesto un aumento de ac. oleico (de 16% a 54%), así como una disminución de los ácidos linoleico y linolénico (Tan y Lin, 2011). Arias-Peñaranda *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares en cultivos de *Scenedesmus incrassatulus* al observar un aumento del 78,8% en el contenido de ac. palmítico y del 133,4% de ac. oleico al pasar de 6 a 11 días de cultivo.

Por tanto, la composición bioquímica depende más de la fase de crecimiento, que de la disponibilidad de nutrientes, aunque esta última afirmación es discutible, debido a que muchos autores, concuerdan en que es la limitación de nutrientes la característica que mayor efecto ejerce sobre la producción de lípidos. En nuestros estudios se pudo observar que, en la fase estacionaria existía una mayor variedad de ácidos grasos con diferentes grados de insaturación en comparación a los encontrados durante la etapa de crecimiento exponencial tanto a 10°C como a 20°C.

Efecto de los nutrientes

Los nutrientes tales como el nitrógeno y el fósforo resultan de suma importancia para el crecimiento y proliferación microalgal y su deficiencia limita la fotosíntesis de éstas. (Lampert & Sommer, 2007).

En el caso del fósforo, la limitación del crecimiento microalgal afecta directamente a la replicación genómica y la síntesis de RNA. La limitación también puede afectar a la conversión de energía fotosintética, reduciendo la tasa de síntesis de proteínas en el cloroplasto (Gonzalez, 2010). A nivel bioquímico, la limitación de nitrógeno influye directamente en la formación de aminoácidos, lo cual a su vez limita la traslación del mRNA y por lo tanto se reduce la síntesis de proteínas. Por otra parte, la eficiencia del fotosistema II (PSII) disminuye inicialmente como una consecuencia de la disipación térmica de la energía de excitación absorbida en el sistema enzimático fotosintético, derivando en una reducción de la tasa de fotosíntesis. (Barsanti & Gualtieri, 2014), resultando ser un efecto negativo en el proceso de fotosíntesis, y provocando un estrés interno.

El efecto de la limitación de nutrientes está ampliamente estudiado, por ejemplo, con la microalga *Chlorella vulgaris*, Converti *et al.* (2009) y Yeh *et al.* (2011) coinciden en que la limitación de nitrógeno trae consigo un aumento en los lípidos totales; por otro lado, Widjaja *et al.* (2009) demostraron que la limitación de nitrógeno conlleva un aumento en la síntesis de triglicéridos, de esta manera la limitación combinada de nutrientes (N, K, P) podría favorecer la síntesis de lípidos en *Chlorella* sp. (Praveenkumar *et al.*, 2012) y en algunas especies del género *Scenedesmus*.

Alonso *et al.* (2000) demostraron que la limitación de nitrógeno daba como resultado un efecto de aumento de lípidos totales en *Phaeodactylum tricornutum*; El-Sheek *et al.* (1995) pudieron constatar que en *Chlorella kessleri*, la limitación de fósforo se traduce en un incremento

significativo en la síntesis de ácidos grasos insaturados. Resultados similares obtuvieron Reitan *et al.* (1994) quienes demostraron que la limitación de fósforo en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp. y *Isochrussis galbana* inducía a aumentar la cantidad de lípidos totales y concretamente de los ácidos grasos C16:0 y C18:1. En 2010, Xin *et al.* demostraron que una limitación conjunta de nitrógeno y fosforo, era capaz de inducir un incremento de lípidos totales en *Scenedesmus* sp.

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos realizados con la microalga S21 en el medio RLMo a dos diluciones de los nutrientes (20% y 50% p/v) concuerdan con los descritos por muchos autores, entre ellos Shen *et al.* (2010); estos autores aseguran que la producción de lípidos se incrementa con la limitación de nutrientes. Así mismo, es un hecho constatable, que las microalgas incrementan su contenido de lípidos al ser sometidas a condiciones de estrés, en particular bajo restricciones de nutrientes (Gonzales y Magallanes, 2012).

La enorme diversidad y la gran capacidad de las microalgas para proliferar en diversas condiciones extremas, comprueba que, en ocasiones puede existir un patrón inusual de comportamiento en la producción de lípidos obtenidos a partir de estos microorganismos (Sato *et al.*, 2000), explicando de esta manera, que la modificación de factores ambientales y nutricionales en los cultivos de microalgas no provocara el mismo efecto en todas las microalgas, sino que variará en función de la naturaleza de cada microalga estudiada.

En esencia, la producción de la biomasa y triglicéridos microalgales requieren muchas veces, una reprogramación de las vías fisiológicas para estimular la biosíntesis de lípidos, lo que permite a las microalgas soportar las condiciones adversas (Bigogno *et al.*, 2002).

Numerosos autores, describen que las condiciones nutricionales tienen un papel relevante en los cultivos microalgales, dependiendo éstos del grado de dilución y naturaleza química de los

nutrientes. En este sentido, Xin *et al.* (2010), comentan que es el nitrógeno el nutriente que más influye en la síntesis de lípidos.

Paes *et al.* (2016) destacan a la microalga *Nannochloropsis oculata* como una especie capaz de producir una gran cantidad de lípidos y que a su vez la diversidad de lípidos puede verse incrementado exitosamente, a través de la carencia de nitrógeno. Estos autores comentan, que los cultivos limitados en nitrógeno muestran una tendencia generalizada a incrementar el contenido de ac. grasos saturados y monoinsaturados a la vez que disminuir los poliinsaturados; por otro lado, al aumentar la concentración de este nutriente, se puede observar el efecto contrario, es decir se puede producir un incremento en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados.

En nuestros estudios, se evaluó la influencia que ejerce la dilución del medio de cultivo sobre el crecimiento microalgal en función de la producción de biomasa y contenido de lípidos, observando que cuando se utilizó el medio RLMo al 50% se obtuvieron mejores resultados que cuando se realizaron los mismos ensayos con el medio sin diluir.

En nuestros cultivos con la microalga S21 a 20°C se apreció una leve diferencia en la producción de lípidos cuando se utilizaban las dos diluciones (20% y 50% p/v); esta diferencia pudo detectarse en ambas fases (estacionaria y exponencial), encontrándose mayor concentración en peso seco de lípidos totales en los ensayos realizados con el medio al 50% de dilución, respecto a los obtenidos cuando se realizó el mismo ensayo a 10°C. En este último caso, es decir, a 10°C, únicamente se apreció una diferencia significativa en la producción de lípidos en la fase exponencial de crecimiento.

Este comportamiento podría deberse a que 10°C no era la temperatura óptima de crecimiento para la microalga S21 lo que conllevó una pérdida de viabilidad en las poblaciones celulares a los 20 días de cultivo. Si bien, era de esperar, que a menor concentración de nutrientes se viese favorecida la producción de lípidos y biomasa, se comprobó que una limitación extrema

no era favorable; en este caso, cuando se utilizó el medio de cultivo RLMO al 20% de sus nutrientes, obtuvo una baja producción de biomasa, y por consiguiente afectando directamente la capacidad de sintetizar metabolitos como lípidos y pigmentos.

| 256

Algunas microalgas tales como *Nannochloropsis* sp. perteneciente a la familia de las *Eustigmataceae*, en un medio limitado en nitrógeno y tras 5 días de cultivo, es capaz de producir lípidos neutros, tales como el ácido mirístico (2,9 %), palmítico (19,8 %), palmitoleico (15,1 %) y oleico (6,8 %) (Rodolfi *et al.*, 2009).

Por otro lado, en relación la intensidad de luz y la disponibilidad de nitrógeno, esta microalga presentó además, un comportamiento singular: es capaz de incrementar la acumulación de los ácidos grasos tales como palmítico y oleico en condiciones limitadas de nitrógeno sin importar la intensidad lumínica y la salinidad; además se pudo comprobar que, cuando los cultivos presentaban altas concentraciones de nitrógeno, junto a altas intensidades de luz y salinidad, se producía un incremento en la acumulación de estos lípidos, pero a la vez una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, araquidónico, eicosapentanoico) (Pal *et al.*, 2011). Esto demuestra la diversidad de patrones de comportamientos microalgales, en relación a la producción lipídica y/o condiciones de cultivo.

Yeh y Chang (2012) observaron que bajo condiciones fotoautotróficas y fotoheterotróficas, la disminución del nitrógeno en el medio de cultivo, tiene un importante papel en la acumulación de los ácidos grasos palmítico y oleico, y a su vez, en la disminución los ácidos grasos poliinsaturados. En general, en la mayoría de las especies de microalgas, el contenido celular en ácidos grasos aumenta en condiciones de crecimiento limitado (Roessler, 1990; Reitan *et al.*, 1994), especialmente de ácidos grasos de neutros, saturados y monoinsaturados.

Sin embargo en nuestros estudios con ambas diluciones no se pudo apreciar una diferencia significativa en la acumulación de ácidos grasos saturados e insaturados, sino que fue el tiempo

de cultivo el único factor que marcó dicha diferencia. Este hecho podría deberse al carácter oligotrófico de la microalga S21, ya que ha sido aislada de una laguna de alta montaña, con marcadas condiciones oligotróficas (Carrillo *et al.*, 1989; Echevarría *et al.*, 1990; Sánchez-Castillo *et al.*, 2008).

Nuestra microalga S21, al ser aislada de un ambiente con escaso contenido de nutrientes, es decir, un ambiente oligotrófico, podría dar una explicación al efecto reducido de estrés cuando se cultiva bajo condiciones reducidas de nutrientes, por lo que si atribuimos que el estrés es un factor importante en la formación de lípidos, ésta podría ser una explicación, del porqué se obtuvieron resultados similares de concentración de lípidos neutros, cuando se ensayaron ambas diluciones.

Efecto de la temperatura

Las variaciones de temperatura provocan cambios en la velocidad de crecimiento, en el contenido de lípidos y en la composición de los ácidos grasos en el interior de la célula microalgal, y a su vez, estos efectos son específicos para cada especie. La temperatura es uno de los factores ambientales que más afectan el crecimiento y desarrollo de los organismo vivos. El crecimiento de microalgas depende también de la temperatura, por lo que se requiere conocer cuál es el valor óptimo para lograr una tasa máxima de crecimiento.

Los sistemas fotosintéticos siempre generan calor a causa de la ineficiencia de la fotosíntesis para convertir la energía luminosa a energía química (Bholase, 2004). La conversión teórica de la luz roja en energía química es de un 31%, y el 69% restante se pierde como calor. Es por esto, que el enfriamiento en un sistema de cultivo dependerá de la intensidad de la radiación

lumínica y de la concentración celular, sin embargo, los procesos de enfriamiento en caso de cultivo en biorreactores únicamente es utilizado en sistemas cerrados (Andersen, 2005).

| 258

La temperatura óptima para el cultivo de microalgas, se encuentra generalmente comprendido entre valores de 20 y 24 °C, no obstante, estas temperaturas pueden variar dependiendo del medio de cultivo, la especie, radiación lumínica y la microalga utilizada. Comúnmente, los cultivos de microalgas toleran temperaturas de entre 16 y 27°C, así, temperaturas inferiores a 16°C, provocan una disminución del crecimiento, mientras que una temperatura superior a los 35°C resulta ser letal para un gran número de especies (Mehlitz, 2009).

Son numerosos los trabajos que advierten, de la importancia de optimizar las temperaturas de los cultivos microalgales, con objeto de lograr un crecimiento óptimo. En relación a nuestra microalga S21 es importante tener en cuenta que fue aislada de un ambiente psicrófilo (3-10°C), no obstante, en nuestros ensayos a varias temperaturas, se determinó que su temperatura óptima de crecimiento es cercana a los 20°C y 25°C, convirtiéndola en una microalga psicrotolerante, ya que es capaz de proliferar a 10°C.

De igual modo, Rusell *et al.* (2003) describen claramente cómo algunas microalgas son capaces de crecer incluso a 0°C, aun cuando su temperatura óptima de crecimiento ronde los 20 a 25°C. Dauta *et al.* (1990) demostraron que en algunos casos, si bien la temperatura óptima de crecimiento de algunas clorofitas se encuentra entre los 20 y 30°C, éstas tienen la capacidad de crecer y proliferar a temperaturas cercanas a 10°C. Cao *et al.* (2016) describen varias microalgas cercanas a *Chlorella* sp., cuyas temperaturas óptimas de crecimiento fluctúan entre 3 y 27°C. Gerloff-Elias *et al.* (2006) por otro lado, comprobaron que el crecimiento de *Chlamydomonas acidophila* disminuye a medida que la temperatura se incrementa a partir de 20°C, aun siendo esta su temperatura óptima de crecimiento.

En nuestros estudios, se pudo observar una clara diferencia en la producción de biomasa, entre los cultivos realizados a 20 y 10°C, siendo los cultivos a 20°C, donde se obtuvieron los mejores resultados. Sin embargo, fue sólo en la fase de crecimiento estacionario donde, sí se pudo observar una diferencia significativa entre ambas temperaturas, apreciándose que en la fase exponencial los resultados de lípidos totales, viabilidad y polarización de membrana fueron muy similares; sin embargo, en la fase de crecimiento estacionaria (tras 20 días de cultivo) los niveles de lípidos totales aumentaron, como también la cantidad de ácidos grasos saturados e insaturados.

Como se mencionó anteriormente, estos resultados concuerdan con el estado fisiológico de la microalga, existiendo mayor cantidad de células viables con la capacidad de homeostasis intacta en los cultivos realizados a 20°C, en comparación a los resultados obtenidos en los ensayos a 10°C.

La disponibilidad de carbono también se ve afectada por la temperatura, puesto que está directamente relacionada con disociación de las moléculas de carbono, influyendo así, en la disponibilidad de este nutriente para la fotosíntesis (Kommareddy y Anderson, 2003). Sin embargo, si existe fuente de carbono en exceso, el efecto de la radiación lumínica, como factor limitante en la fotosíntesis resulta ser insignificante (Pulz, 2001).

Esta afirmación no concuerda con los resultados obtenidos en nuestros ensayos, donde la temperatura sí fue un factor importante, puesto que los cultivos disponían de fuente de carbono en exceso y constante. Los valores de crecimiento y obtención de biomasa obtenidos en nuestros ensayos coinciden con los resultados obtenidos por numerosos autores y en especial con microalgas tales como *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp. (James *et al.*, 1989) en las que la temperatura induce un efecto positivo en la fotosíntesis (Raven *et al.*, 1988; Lacour *et al.*, 2016).

Por otro lado, los cambios en la temperatura, también pueden provocar alteraciones en muchas de las rutas metabólicas, incluyendo la biosíntesis de los carotenoides. Se han observado efectos sobre la síntesis de pigmentos de *Chlorella zofingiensis*, cuando se incrementó la temperatura de los cultivos, dando lugar a cambios en la eficiencia de absorción, asociados a una variación en el tamaño celular y los niveles de pigmento (Cordero *et al.*, 2010).

De acuerdo a Del Campo *et al.*, (2004), la acumulación celular de luteína y astaxantina en *Muriellopsis* sp. aumenta cuando se cultiva a una temperatura superior a 33°C; sin embargo el nivel volumétrico se incrementa hasta seis veces cuando la temperatura de cultivo es de 28°C. A temperaturas mayores, la división celular se ve afectada, no así la síntesis de proteínas. También se ha demostrado que algunas microalgas aumentan la acumulación de carotenoides a medida que aumenta la temperatura del cultivo en comparación con la tasa de producción de carotenoides obtenida a la temperatura óptima de crecimiento de 28°C (Mosqueda-Cano y Gutiérrez-Corona, 1995).

Los ensayos realizados para promover la síntesis de lípidos a pequeña escala, determinan que bajo condiciones limitantes de nitrógeno se puede producir un efecto positivo o negativo sobre la microalga y/o una gran variación en el contenido de lípidos y su perfil de ácidos grasos, lo cual dependerá de la naturaleza de la microalga elegida.

Algunas especies del género *Chlorella* acumulan lípidos totales e incluso almidón, en condiciones de deficiencia de nitrógeno, mientras que otras acumulan lípidos predominantemente neutros (Illman *et al.*, 2000). Las microalgas son, por tanto, un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos con una estructura simple, lo que permite el rápido crecimiento celular y por lo tanto una mayor producción de biomasa (Huang *et al.*, 2009).

Si hablamos de condiciones generales, muchos autores concuerdan en que una limitación de nutrientes incluyendo la luz, llevan a un microorganismo fotosintético a un cierto nivel de

estrés, lo que puede derivar en diferentes rutas metabólicas que dan lugar a la producción de lípidos y proteínas. En nuestros ensayos fueron precisamente el tiempo de cultivo y la cantidad de radiación lumínica los factores que más influyeron en la producción de lípidos, actividad metabólica y producción de biomasa.

No obstante, hay autores que consideran que el efecto de la temperatura es insignificante (Pulz, 2001), afirmación que no concuerda con nuestros datos, donde si se comprobó que la temperatura ejerce un efecto positivo o negativo sobre la producción de biomasa y lípidos.

De acuerdo con los resultados obtenidos a lo largo de todos los ensayos así como con la revisión bibliográfica llevada a cabo, se presentan las siguientes conclusiones, respecto al estudio de microalgas aisladas de la laguna de *La Caldera* de Sierra Nevada (Granada):

1. Los cuerpos de agua de sistemas lagunares de *Sierra Nevada*, concretamente de la laguna de *La Caldera*, presentan microorganismos fotosintéticos de las clases *Eustigmatophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Trebouxiophyceae* y *Chlorophyceae*.
2. A partir de los medios de cultivo descritos en diversas publicaciones para el cultivo de microorganismos fotosintéticos se diseñó un medio de cultivo denominado RLMo el cual cumple con los requisitos nutricionales para el crecimiento de dichos microorganismos
3. La metodología de superficie de respuesta (RSM), como herramienta estadísticamente útil para la determinación de parámetros óptimos físico-químicos en el diseño de medios de cultivo, permitiendo optimizar los factores que influyen en el crecimiento de microorganismos fotosintéticos.
4. La obtención de un modelo matemático predecible a partir de la información obtenida en la metodología de superficie de respuesta (RSM) permite el diseño de cultivos a mayor escala y la optimización en la producción de metabolitos secundarios con interés biotecnológico.
5. Cada una de las microalgas aisladas y posteriormente seleccionada en este trabajo, requieren condiciones nutricionales específicas en función de la temperatura, y cantidad de luz proporcionada con objeto de obtener una biomasa con alto valor biotecnológico.
6. Cada una de las microalgas aisladas y posteriormente seleccionadas en este trabajo, obtenidas de la laguna de *La Caldera* generaron mayor producción de biomasa cuando fueron cultivados con el medio RLMo al 50% de sus componentes nutricionales.

7. A pesar de que las microalgas aisladas en este trabajo fueron obtenidas a temperaturas medias de 10°C, fueron capaces de crecer y proliferar mejor a 20°C, obteniéndose los mejores resultados de producción de biomasa a esta última temperatura.
8. La microalga S21 próxima taxonómicamente a las Clorofitas y concretamente a *Chlorococcum minutum*; fue la que generó los mejores valores de velocidad de crecimiento y obtención de biomasa.
9. La microalga S21 -si bien fue aislada a temperaturas cercanas a 10°C- su óptimo de crecimiento fue a 20°C convirtiéndola en un microorganismo fotosintético psicotolerante. Esta microalga además fue capaz de crecer y desarrollarse mejor con el medio de cultivo RLMo al 50% de sus nutrientes en relación al medio sin diluir.
10. En los procesos de cultivo de las microalgas estudiadas, en general, cuando se les proporcionan las condiciones de cultivo favorables en la fase lag y exponencial se asegura la viabilidad celular en la fase estacionaria, lo que conlleva una mayor producción de biomasa y metabolitos secundarios.
11. La microalga S21 fue capaz de acumular mayor cantidad de lípidos en la fase estacionaria de crecimiento en relación a la fase exponencial. Las mayores cantidades de lípidos totales obtenidas fueron del 67,6% respecto a su peso seco, siendo las mejores condiciones de cultivo a 80 W/h*m² con medio RLMo al 50% de dilución y temperatura de 20°C.

VII. Publicaciones y congresos

- Publicaciones

Andrade, L., J. González-López., M. Fenice., M.V. Martínez-Toledo., C. Pesciaroli., P. Maza-Márquez., B. Juárez-Jiménez. 2014. *Application of Response Surface Methodology (RSM) for Culture Conditions and Biomass Production of Psychrophilic Microalgae Isolated from High Mountains Lake During the ice-free Season*. International Journal of Environmental Research. **8**: 799-812.

| 265

En proceso de redacción, publicación sobre el contenido de la 2 parte de los resultados sobre la viabilidad y estado de polarización de membrana de la microalga S21.

- Publicaciones Indirectas relacionados con el proyecto de tesis.

Reboleiro-Rivas, P., Juárez-Jiménez, B., Martínez-Toledo, M. V., Rodelas, B., **Andrade, L.**, González-López, J., & Fenice, M. (2013). Bacterial communities' structure in a high mountain lake during the ice-free season: Cultural and PCR-TGGE investigations. *International Journal of Environmental Research*, **7**, 3: 685–696.

Maza-Márquez, P., Martínez-Toledo, M. V., Fenice, M., **Andrade, L.**, Lasserrot, A., & González-López, J. (2014). Biotreatment of olive washing wastewater by a selected microalgal-bacterial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **88**, 69–76.

- Aporte a congreso.

Exposición panel informativo en XXIII Congreso Nacional de Microbiología, Salamanca, 2011. “ *Cultivo y asilamiento de microalgas aisladas de lagunas de alta montaña*”

- Aaronson and Dubinsky, 1982. *Mass Production Of Microalgae*. Experientia **38**, Birkhuser Verlag.
- Abdel-Fattah, Y.R., Saeed, H.M., Gohar, and .M., El-Baz, M.A. 2005. *Improved Production Of Pseudomonas Aeruginosa Uricase By Optimization Of Process Parameters Through Statistical Experimental Designs*. Process Biochemistry **40**,5: 1707–1714.
- Abdo, S. M., Hetta, M. H., El-Senousy., Ali, G. H., 2012., *Antiviral Activity Of Freshwater Algae*, Vol **2**: 21–25.
- Abinandan, S. and Shanthakumar, S. 2015. *Challenges and Opportunities In Application Of Microalgae (Chlorophyta) For Wastewater Treatment: A Review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, **52**:123–132.
- Ackman, R.G., C. S. Tocher., J. Mclachlan., 2011. *Marine Phytoplankter Fatty Acids*. Journal Of The Fisheries Research Board Of Canada. **25**: 1603-1620.
- Adan, A., Kiraz, Y. and Baran, Y., 2016. *Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays*. Current Pharmaceutical Biotechnology. **17**,14: 1213-1221.
- Adrian, R. O'reilly, C.M., Zagarese,H., Baines, S.B., Hessen, D.O., Keller,W., Livingstone, D.M., Sommaruga,R., Straile, D., Van Donk, E., Weyhenmeyer, G.A., and Winderl, M. 2009. *Lakes As Sentinels Of Climate Change*. Limnology and. Oceanography., **54**, 6-2: 2283–2297.
- Ahamed, Sarker Anowarul Kabir, Jin-Joo Kim, Tae-O Choi, and Tae-Jin Choi. 2015. *Growth Promotion Of Pavlova Viridis By Bacteria Isolated From The Microalga*. Korean Society of Life Science **25**, 5: 568–76
- Ahmad, A. L., Yasin, N. H. M., Derek, C. J. C., and Lim, J. K. 2011.. *Microalgae As A Sustainable Energy Source For Biodiesel Production: A Review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews **15**, 1: 584-593.
- Ahmed A, Lidan Ma., 1987. *Glycerol Production By Dunaliella Bioculata*. Journal Basic Microbiol; **27**: 419-23.
- Ak, Í., 2012. *Effect Of An Organic Fertilizer On Growth Of Blue-Green Alga Spirulina Platensis*. Aquaculture International, **20**: 413–422.
- Akino, T., Nakamura, N., Horikoshi, K. 1987. *Applied Microbiology Biotechnology Production Of P-Mannosidase and Fl-Mannanase By An Alkalophilic Bacillus Sp . Appl Microbiol Biotechnol* **26**: 323—327
- Alcaino, Jennifer, Víctor Cifuentes, and Marcelo Baeza. 2015. *Physiological Adaptations Of Yeasts Living In Cold Environments and Their Potential Applications*. World Journal Of Microbiology and Biotechnology. **31**. 10. 1467–73.
- Alketife, A.M., Judd, S. and Znad, H., 2017. *Synergistic effects and optimization of nitrogen and phosphorus concentrations on the growth and nutrient uptake of a freshwater Chlorella vulgaris*. Environmental technology. **38**, pp.94-102.
- Allen E.J. Nelson E.W., 1910. *On The Artificial Culture Of Marine Plankton Organisms*. A. Kinne (Eds.) Marine Ecology, **3**. Cultivation Part I, London
- Allen EJ, Nelson EW. 1910. *On the artificial culture of marine plankton organisms*. J Mar Biol Assoc UK **8**:421–474.
- Aller J.Y., Kuznetsova M.R., Jahns C.J. Kemp P.F. 2005. *The Sea Surface Microlayer As A Source Of Viral and Bacterial Enrichment In Marine Aerosols*. Journal Of Aerosol Science, **36**: 801–812.
- Alonso, D. L., Belarbi, E. H., Fernández-Sevilla, J. M., Rodríguez-Ruiz, J., Molina Grima. E., 2000. *Acyl Lipid Composition Variation Related To Culture Age and Nitrogen Concentration In Continuous Culture Of The Microalga Phaeodactylum Tricornutum*. Phytochemistry, **54**, 5: 461–71.
- Alonso, D.L., Belarbi, E.H., Fernández-Sevilla, J.M., Rodríguez-Ruiz, J. and Grima, E.M., 2000. *Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, **54**, pp.461-471.

- Alonso, D.L.; Belarbi, E.-H.; Fernández-Sevilla, J.M.; Rodríguez-Ruiz, J.; Grima, E.M. 2000. *Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, **54**, 461–471.
- Alonso, M., Lago, F. C., Vieites, J. M., Espiñeira, M., 2012. *Molecular Characterization Of Microalgae Used In Aquaculture With Biotechnology Potential*. *Aquaculture International*, **20**, 5: 847–857.
- Al-Zuhair S. 2007. *Production Of Biodiesel: Possibilities and Challenges*. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **1**: 57-66.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Amann, R. I., Ludwig, W., 1995. *Phylogenetic Identification and In Situ Detection Of Individual Microbial Cells Without Cultivation*. *Phylogenetic Identification and In Situ Detection Of Individual Microbial Cells Without Cultivation*. *Microbiol Rev.* **59**, 1:143-69.
- Amaral Zettler, L.A., Gomez, F., Zettler, E., Keenan, B.G., Amils, R., and Sogin, M.L., 2002 *Microbiology: Eukaryotic Diversity In Spain's River Of Fire*. *Nature*. **417**: 137.
- Andersen, R.A. ed., 2005. *Algal culturing techniques*. Academic press.
- Andrade, L., J. González-López., M. Fenice., M.V. Martínez-Toledo., C. Pesciaroli., P. Maza-Márquez., B. Juárez-Jiménez. 2014. *Application of Response Surface Methodology (RSM) for Culture Conditions and Biomass Production of Psychrophilic Microalgae Isolated from High Mountains Lake During the ice-free Season*. *International Journal of Environmental Research*. **8**: 799-812.
- Anuar, M.R. and Abdullah, A.Z. 2016. *Challenges In Biodiesel Industry With Regards To Feedstock, Environmental, Social and Sustainability Issues: A Critical Review*. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, **58**: 08–223.
- Arakawa, Shizuka, Yuichi Nogi, Takako Sato, Yasuhiko Yoshida, Ron Usami, And Chiaki Kato. 2014. *Diversity Of Piezophilic Microorganisms In The Closed Ocean Japan Sea*. *Bioscience, Biotechnology And Biochemistry* **70**, 3: 749–52.
- Aravantinou, A.F. And Manariotis, I.D. 2016. *Effect Of Operating Conditions On Chlorococcum Sp. Growth And Lipid Production*. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*. **4**, 1: 1217–1223.
- Aravantinou, A.F., Tsarpali, V., Dailianis, S. And Manariotis, I.D. 2015. *Effect Of Cultivation Media On The Toxicity Of Zno Nanoparticles To Freshwater And Marine Microalgae*. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, **114**:109-116.
- Arias-Peñaranda, M.T., Cristiani-Urbina, E., Montes-Horcasitas, C., Esparza-García, F., Torzillo, G. and Cañizares-Villanueva, R.O., 2013. *Scenedesmus incrassatulus CLHE-Si01: A potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production*. *Bioresource technology*. **140**. 158-164.
- Armand, Z, Andriantsimahavandy A, Ramamonjisoa D. J, And Andrianainarivelo M. 2015. *An Evaluation Study Of The Cultivation Of Spirulina In The Area Of Sambirano*. *Madagascar*. **5**, 3: 101–14.
- Asiloglu, R., Honjo, H., Saka, N., Asakawa, S. And Murase, J., 2015. *Community Structure Of Microeukaryotes In A Rice Rhizosphere Revealed By Dna-Based Pcr-Dgge*. *Soil Science And Plant Nutrition*, **61**, 5: 761-768.
- Astroc, N.C., Reyes, N.A., Buitrago, L.D., Aguilar, J.J. and Jiménez, J.A.S., 2015. *Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga Haematococcus pluvialis*. *UGCiencia*. **21**. 73-82.
- Attilio Converti, Alessandro A. Casazza, Erika Y. Ortiz, Patrizia Perego, Marco Del Borghi. 2009. *Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production*. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. **48**. 1146-1151
- Auernik, Kathryn S., And Robert M. Kelly. 2010. *Physiological Versatility Of The Extremely Thermoacidophilic Archaeon Metallosphaera Sedula Supported By Transcriptomic Analysis Of*

- Heterotrophic, Autotrophic, And Mixotrophic Growth*. Applied And Environmental Microbiology **76**, 3: 931–35.
- Ausubel, F. M., Brent, F., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. Struhl, K., 1989. *Short Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York.
- Avila-Leon, I., Chuei Matsudo, M., Sato, S., De Carvalho, J. C. M., 2012. *Arthrospira Platensis Biomass With High Protein Content Cultivated In Continuous Process Using Urea As Nitrogen Source*. Journal Of Applied Microbiology, **112**,6. : 1086–94.
- Azevedo, Brian., 2009. *Algae As An Economical Protein Source For Dairy Cattle Nutrition*. Dairy Science Department College Of Agriculture, Food, And Environmental Science California Polytechnic State University.
- Babadzhanov, A. S., Abdusamatova, N., Yusupova, F. M., Faizullaeva, N., Mezhlumyan, L. G., Malikova, M. K., 2004. *Chemical Composition Of Spirulina Platensis Cultivated In Uzbekistan*. Chemistry Of Natural Compounds, **40**,3. 276–279.
- Bae, J.H., Park, H.G., Park, J.M. And Hong, S.E. 2015. *Growth And Changes In The Biochemical Composition Of Isochrysis Galbana Under Different Light-Emitting Diode Conditions*. J. Korean Soc. Fish. Technol. **51**, 4: 475—483,
- Baek, Kiwoon, Yung Mi Lee, Chung Yeon Hwang, Hyun Park, You Jung Jung, Mi Kyeong Kim, Soon Gyu Hong, Ji Hee Kim, And Hong Kum Lee. 2015. *Psychroserpens Jangbogonensis Sp. Nov., A Psychrophilic Bacterium Isolated From Antarctic Marine Sediment*. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology **65**, 1: 183–88.
- Balboa, E.M. 2015. *Cosmetics Fro. Application Of Marice Biotechnology*. Springer Handbook of Marine Biotechnology. **44**: 1015-1042
- Ballantine, J. A., Lavist, A., Morris, R. J., 1979. *Sterols Of The Phytoplankton-Effects Illumination And Growth Stage Of Illumination And Growth Stage*, **18**, 1459–1466.
- Banskota, A. H., Stefanova, R., Sperker, S., Melanson, R., Osborne, J. A., O’leary, S. J. B., 2013. *Five New Galactolipids From The Freshwater Microalga Porphyridium Aerugineum And Their Nitric Oxide Inhibitory Activity*. Journal of Applied Phycology. **25**, 4. 951–960
- Barbosa-Cánovas, G.V.; Pothakamury, U.R.; Palou, E.; Swanson, B.G. 1998. *Procesado de alimentos con alta presión*. En: Conservación no térmica de alimentos. 9-48. Ed. Acribia S.A. Zaragoza.
- Barsanti, L. and Gualtieri, P., 2014. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press.
- Barsanti, L., Gualtieri. 2006. *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press.
- Barsanti, Laura., And Gualtieri, Paolo., 2005. *Algae: Anatomy, Biochemistry, And Biotechnology*. Taylor And Francis Group. Crc Press. Usa.
- Baumgardt, F.J., Zandoná Filho, A., Brandalize, M.V., Da Costa, D.C., Antoniosi Filho, N.R., Abreu, P.C., Corazza, M.L. And Ramos, L.P. 2016. *Lipid Content And Fatty Acid Profile Of Nannochloropsis Oculata Before And After Extraction With Conventional Solvents And/Or Compressed Fluids*. The Journal Of Supercritical Fluids, **108**: 89-95.
- Beal, C.M., Webber, M.E., Ruoff, R.S. and Hebner, R.E., 2010. *Lipid analysis of Neochloris oleoabundans by liquid state NMR*. Biotechnology and bioengineering. **106**,4. 573-583.
- Becker, W., 2004. *18 Microalgae In Human And Animal Nutrition*. Handbook Of Microalgal Culture: Biotechnology And Applied Phycology. **312**.
- Beevi, Sabeela, U. And Sukumaran, R.K. 2015. *Cultivation Of The Fresh Water Microalga Chlorococcum Sp. Rap13 In Sea Water For Producing Oil Suitable For Biodiesel*. Journal of Applied Phycology. 141–147.
- Begum, H., Yusoff, F.M., Banerjee, S., Khatoon, H. And Shariff, M. 2015. *Availability And Utilization Of Pigments From Microalgae*. Crit Rev Food Sci Nutr. **56**, 13: 2209-2222.

- Ben-Amotz A, Avron M., 1980. *Glycerol, B-Carotene And Dry Algal Meal Production By Commercial Cultivation Of Dunaliella*. Shelef G, Soeder Cj (Eds) *Algae Biomass*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 603-610.
- Ben-Amotz A. 1987. *Effect Of Irradiance And Nutrient Deficiency On The Chemical Composition Of Dunaliella Bardawil (Volvocales, Chlorophyta)*. *J Plant Physiol* **131**: 479–487
- Benemann, J. R., Tillett, D. M., And Weissman, J. C. 1987. *Microalgae Biotechnology*. *Trends In Biotechnology*, **5**: 47–53.
- Berges, J. A., Franklin, D. J. Harrison, P. J., 2001 *Evolution Of An Artificial Seawater Medium: Improvements In Enriched Seawater, Artificial Seawater Over The Last Two Decades*. *J. Phycol.* **37**: 1138–1145.
- Bermúdez, J.L., Lodeiros, C. and Morales, E., 2002. *Producción de biomasa de la microalga marina Chroomonas sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad*. *Boletín de investigaciones marinas y costeras*. **31**: 167-182
- Bertucco, A., Sforza, E., Fiorenzato, V. and Strumendo, M., 2015. *Population balance modeling of a microalgal culture in photobioreactors: Comparison between experiments and simulations*. *AIChE Journal*, **61**,9. 2702-2710.
- Bertus Van Den Burg. 2003. *Extremophiles As A Source For Novel Enzymes*. *Curr Opin Microbiol.* **26**, 3.213-8.
- Beuckels, Annelies, Erik Smolders, And Koenraad Muylaert. 2015. *Nitrogen Availability Influences Phosphorus Removal In Microalgae-Based Wastewater Treatment*. *Water Research* **77**. 98–106.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., 2012. *High-Pressure Homogenisation And Benzoate To Control Alicyclobacillus Acidoterrestis: A Possible Way?* *International Journal Of Food Science & Technology*, **47**, 4: 879–883.
- Bhadury, P., Wright, P. C., 2004. *Exploitation Of Marine Algae: Biogenic Compounds For Potential Antifouling Applications*. *Planta*, **219**, 4.561–78.
- Bhagwat, Prashant K., Sowmya B. Jhample, And Padma B. Dandge. 2015. *Statistical Medium Optimization For The Production Of Collagenolytic Protease By Pseudomonas Sp. Suk Using Response Surface Methodology*. *Microbiology*. **84**, 4. 520–30.
- Bhat, M R, And T Marar. 2016. *Purification And Characterization Of L-Asparaginase Asparaginase From Salinicoccus Sp . M KJ997975*. 2015. *International Journal of Recent Trends in Science And Technology*. **14**,1: 42-48
- Bhatt, Harshil H, Bhimaraj M Sharma, And Vivek N Upasani. 2016. *Studies On Microbial Diversity Of A Soda Lake In India By Winogradsky Column Technique*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* **5**, 4.608-614
- Bhosale, P., 2004. *Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **63**,4. 351-361.
- Bianchini, R., Silvana, D., Maurício., 2006. *Microalgas, Produtos E Aplicações Microalgae*, *Products And Applications*. 1959–1967.
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., 2002. *Lipid And Fatty Acid Composition Of The Green Oleaginous Alga Parietochloris Incisa, The Richest Plant Source Of Arachidonic Acid*. *Phytochemistry* **60**. 497–503
- Bitan-Banin, G., Ortenberg, R., Mevarech, M., Bitan-Banin, G., Ortenberg, R., Mevarech, M., 2003. *Development Of A Gene Knockout System For The Halophilic Archaeon Haloferax Volcanii By Use Of The Pyre Gene*. *J Bacteriol.* **185**,3. 772-78.
- Blake, C., Maggs, C., Reimer, P., 2007. *Uso De Técnicas De Fechado Con Carbono Radioactivo Para Interpretar Ambientes Históricos De Bancos De Rodolitos*. *Cienc. Mar.* **33**,4. 385–397.

- Bodénès, P., F. Lopes, D. Pareau, O. Français, And B. Le Pioufle. 2016. *Microdevice For Studying The In Situ Permeabilization And Characterization Of Chlamydomonas Reinhardtii In Lipid Accumulation Phase*. Algal Research. **16**. 357–67.
- Bohutskyi, P., Kligerman, D.C., Byers, N., Nasr, L.K., Cua, C., Chow, S., Su, C., Tang, Y., Betenbaugh, M.J. and Bouwer, E.J., 2016. *Effects of inoculum size, light intensity, and dose of anaerobic digestion centrate on growth and productivity of Chlorella and Scenedesmus microalgae and their poly-culture in primary and secondary wastewater*. Algal Research. **19**. 278–290.
- Borowitzka Ma., 1999. *Commercial Production Of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes And Fermenters*. J Biotechnol **70**. 313–321
- Borowitzka, L. J., Borowitzkal, M. A., Moulton, T. P., 1984. *Production And Utilization Of Microalgae The Mass Culture Of Dunaliella Salina For Fine Chemicals : From Laboratory To Pilot Plant*. Hydrobiologia, **116**: 115–135.
- Borowitzka, M.A., 1988. *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press, New York.
- Boussiba S, Vonshak A., 1991. *Astaxanthin Accumulation In The Green Alga H. Plutialis*. Plant Cell Physiol. **32**: 1077–1082.
- Bovallius A., Roffey R. Henningson E. 1980. *Long Range Air Transmission Of Bacteria*. Annals Of The New York Academy Of Sciences, **353**. 186–200.
- BP Statistical Review of World Energy, 2015. Edición 65.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G., 1997. *Nutritional Properties Of Microalgae For Mariculture*. Aquaculture, **151**,1-4. 315–331.
- Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., Trenerry, C., 1999. *The Vitamin Content Of Microalgae Used In Aquaculture*. Journal of Applied Phycology. **11**,3. 247–255.
- Bunse, Carina, Daniel Lundin, Christofer M. G. Karlsson, Maria Vila-Costa, Joakim Palovaara, Neelam Akram, Lovisa Svensson. 2016. *Response Of Marine Bacterioplankton Ph Homeostasis Gene Expression To Elevated CO₂*. Nature Climate Change **6**. 1–7.
- Burns, D.G., Camakarlis, H.M., Janssen, P.H. And Dyal-Smith, M.L. 2004. *Combined Use of Cultivation-Dependent and Cultivation-Independent Methods Indicates that Members of most haloarchaeal Groups in an australian Crystallizer pond Are Cultivable*. Applied and Environmental Microbiology. 5258-5265.
- Burrows, E. H., Bennette, N. B., Carrieri, D., Dixon, J. L., Brinker, A., Frada, M., Baldassano, S. N., 2012. *Dynamics Of Lipid Biosynthesis And Redistribution In The Marine Diatom Phaeodactylum Tricornutum Under Nitrate Deprivation*. Bioenergy Research, **5**, 4: 876–885.
- Butcher, R., *Contributions To Our Knowledge Of The Smaller Marine Algae*. 1952. J. Mar. Biol. Assoc. Uk **31**: 175–191.
- Cabrales, M.M.Q., Nazario, L.H., Quevedo, H.M. and González, M.F., 1999. *Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga Chlorella sp*. Rev Cubana Aliment Nutr. **13**,1: 9-13.
- Camacho Rubio, F., Martinez Sancho, M., Sanchez Villasclaras, S., 1988. *Aplicaciones De Los Cultivos De Microalgas*. Ingenieria Química. 207–211.
- Cañizares-Villanueva, Olivis., García-Cañedo, Juan C., Cristiani-Urbina, Eliseo, Flores-Ortiz, César M., Ponce-Noyola, Teresa, R. 2013. *Producción De Carotenoides A Partir De Las Microalgas*. Appl Microbiol Biotechnol. **68**: 31-35.
- Cao, K., He, M., Yang, W., Chen, B., Luo, W., Zou, S. and Wang, C., 2016. *The eurythermal adaptivity and temperature tolerance of a newly isolated psychrotolerant Arctic Chlorella sp*. Journal of applied phycology, **28**, 2: 877-888.
- Caporgno, M.P., Olkiewicz, M., Fortuny, A., Stüber, F., Fabregat, A., Font, J., Pruvost, J., Lepine, O., Legrand, J. And Bengoa, C. 2016. *Evaluation Of Different Strategies To Produce Biofuels From Nannochloropsis Oculata And Chlorella Vulgaris*. Fuel Processing Technology, **144**: 132-138.

- Carlucci, M. J., Mateu, C. G., Artuso, M. C., Scolaro, L. A., 2012. *Polysaccharides From Red Algae : Genesis Of A Renaissance*. Intech, Open Access, **20**: 10-31
- Carrillo, P. 1989., *Caracterización Del Fitoplancton De Las Lagunas De Alta Montaña De Sierra Nevada (Granada , Espana) En Relación Con Las Características Físico-Químicas Del Medio*. Limnética, **5**: 37-50
- Carrillo, P., L. Cruz Pizarro Y P. M. Sánchez Castillo., 1990. *Analysis Of Phytoplankton-Zooplankton Relationships In An Oligotrophic Lake Under Natural And Manipulated Conditions*. Hydrobiologia **200**/201: 49-58.
- Carrillo, P., L. Cruz Pizarro, R. Morales Y P. M. Sánchez Castillo., 1987. *Cambios Estacionales En Las Comunidades De Fitoplancton Y De Zooplankton De La Albufera De Adra*. Limnetica **3**, 2: 243-254.
- Carrillo, P., Reche, I. And Cruz-Pizarro, L.: 1996. *Intraspecific Stoichiometric Variability And The Ratio Of Nitrogen To Phosphorus Resupplied By Zooplankton*. Freshwater Biology, **36**: 363–374.
- Carrillo, P., Sanchez-Castillo, P., Cruz-Pizarro, L. , 1991. *Coincident Zooplankton And Phytoplankton Diel Migrations In A High Mountain Lake (La Caldera, Sierra Nevada, Spain)*. Archivo Hidrología. Vol. **122,1**: 57-67.
- Carrillo, S., Bahena, A., Casas, M., Carranco, M., Calvo, C., Avila, E., Perez-Gil, F., 2012. *The Alga Sargassum Spp . As Alternative To Reduce Egg Cholesterol Content*. Cuban Journal Of Agricultural Science. **46**, 2: 181–186.
- Carvalho J., Francisco F., Almeida K., Sato S. & Converti A. 2004. *Cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates*. J. Phycol., **40**: 589-597.
- Castenholz, R. W., 1969. *Thermophilic Blue-Green Algae And The Thermal Environment*. Bacteriological Reviews. **33**, 4: 476–504.
- Castillo Martín, A, Benavente, J. Hidalgo, M.C. 2005. *Primeros Datos Sobre El Inventario Y Caracterización Morfométrica De Las Lagunas Glaciares “Permanentes” Del Parque Nacional De Sierra Nevada (Granada)*. Publicaciones Del Igme: Serie Hidrogeología Y Aguas Subterráneas, No 14. Vi Simposio Del Agua En Andalucía. I: 619-628.
- Castillo Martín, A. 2009. *Lagunas De Sierra Nevada*. Ed. Universidad De Granada.
- Castillo Martín, A., Cruz Sanjulian, J.J., Benavente Herrera, J. 1999. *Aguas De Sierra Nevada Aguas De Lanjaron.. “Lanjaron: Paisajes Del Agua”*. Ed. Balneario De Lanjarón, S.A. 35-64
- Castillo, S.J., Merino, M.F., Heussler, P., 1980. *Production and ecological implications of algae mass culture under Peruvian conditions*. In: Shelef, G., Soeder, C.J. (Eds.), *Algae Biomass*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 123-134.
- Cavalier-Smith, T., 2004. *Only Six Kingdoms Of Life*. Proc R Soc Lond B Biol Sci **271**: 1251–1263.
- Celekli A., Balci M., Bozkurt H., 2008. *Modelling Of Scenedesmus Obliquus; Fuction Of Nutrient With Modified Gompertz Model*. Biores.Technol **19**: 8742–8747
- Chacón, C. Hu, C. Cárdenas, C. Araujo, I. y Morales, E. (2004). *Uso de Chlorella sp. y Scenedesmus sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo*. Venezuela. Boletín de Investigaciones Biológicas de La Universidad Del Zulia. **38**, 94 – 108.
- Chaloub, Ricardo M., Nathania Maria S Motta, Silvia P. De Araujo, Paula F. De Aguiar, And Anita F. Da Silva. 2015. *Combined Effects Of Irradiance, Temperature And Nitrate Concentration On Phycoerythrin Content In The Microalga Rhodomonas Sp. (Cryptophyceae)*. Algal Research **8**: 89–94.
- Chan Yoo, So-Young Jun, Jae-Yon Lee, Chi-Yong Ahn And H.-M.O. 2010. *Selection Of Microalgae For Lipid Production Under High Levels Carbon Dioxide*. Bioresource Technology **101**, 1:71–S74

- Chang, H.X., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q. and Zhu, X., 2016. *Kinetic characteristics and modeling of microalgae Chlorella vulgaris growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon*. *Bioresource technology*. 206, pp.231-238.
- Cheftel, J. C., 1995. *Review : High-Pressure, Microbial Inactivation And Food Preservation / Revision: Alta-Presion, Inactivacion Microbiologica Y Conservacion De Alimentos*. *Food Science And Technology International*, **1**, 2-3: 75-90.
- Cheirsilp, B., Mandik, Y.I. And Prasertsan, P. 2015. *Evaluation Of Optimal Conditions For Cultivation Of Marine Chlorella Sp. As Potential Sources Of Lipids, Exopolymeric Substances And Pigments*. *Aquaculture International*, **24**, 1: 313-326.
- Cheirsilp, B., Torpee, S., 2012. *Enhanced Growth And Lipid Production Of Microalgae Under Mixotrophic Culture Condition: Effect Of Light Intensity, Glucose Concentration And Fed-Batch Cultivation*. *Bioresource Technology*, **110**, 510-6.
- Chen Meng, Haiying Tang, Hongzhi Ma, Thomas C. Holland, K.Y. Simon Ng, Steven O. Salley. 2011. *Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*. **102**, 2: 1649-1655
- Chen Xi, Feng Shugeng, Zhang Hongxun, Wang Yanfen, Bai Zhihui, Gu Likun. 2011. *Investigation Of Bacterial Community Diversity In Water Of Zoige Alpine Wetland*. *Acta Ecologica Sinica*, **31**, 4: 205-211.
- Chen, H., Lu, Y., Jiang, J.-G., 2012. *Comparative Analysis On The Key Enzymes Of The Glycerol Cycle Metabolic Pathway In Dunaliella Salina Under Osmotic Stresses*. *Plos One*. **7**,6.(a)
- Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., Wang, J., 2012. *Biodiesel Production From Algae Oil High In Free Fatty Acids By Two-Step Catalytic Conversion*. *Bioresource Technology*, **111**, 208-14. (b)
- Cherad, R. 2016. *Hydrogen Production From The Catalytic Supercritical Water Gasification Of Process Water Generated From Hydrothermal Liquefaction Of Microalgae*. *Fuel*, **166**: 24-28.
- Chevalier, Pierre., De La Noüe, Joël., 1985. *Wastewater Nutrient Removal With Microalgae Immobilized In Carrageenan*. *Enzyme and Microbial Technology*, **7**, 621-624.
- Chisholm. S. W., Stross, Raymond G., Nobbs, Paul A., 1975. *Environmental And Intrinsic Control Of Filtering And Feeding Rates In Arctic Daphnia*. *Journal Of The Fisheries Research Board Of Canada*. **32**, 2: 219-226
- Chisti, Y., 2007. *Biodiesel From Microalgae*. *Biotechnology Advances*, **25**, 3: 294-306.
- Chisti, Y., 2008. *Biodiesel From Microalgae Beats Bioethanol*. *Trends In Biotechnology*, **26**, 3: 126-31.
- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen, C.H. and Lin, C.S., 2009. *Lipid accumulation and CO₂ utilization of Nannochloropsis oculata in response to CO₂ aeration*. *Bioresource technology*, **100**, 2: 833-838.
- Chiu, Sheng Yi, Chien Ya Kao, Tsai Yu Chen, Yu Bin Chang, Chiu Mei Kuo, And Chih Sheng Lin. 2015. *Cultivation Of Microalgal Chlorella For Biomass And Lipid Production Using Wastewater As Nutrient Resource*. *Bioresource Technology* **184**:179-89.
- Chow, Y., Tu, W.Y., Wang, D., Ng, D.H. And Lee, Y.K. 2015. *The Role Of Micronutrients And Strategies For Optimized Continual Glycerol Production From Carbon Dioxide By Dunaliella Tertiolecta*. *Biotechnology And Bioengineering*, **112**, 10: 2163-2171.
- Cicczazo, Sonia, Alfonso Esposito, Luigimaria Borruso, And Lorenzo Brusetti. 2015. *Microbial Communities And Primary Succession In High Altitude Mountain Environments*. *Annals Of Microbiology*, 43-60.
- Cid, A, Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1996. *Toxic Action Of Copper On The Membrane System Of A Marine Diatom Measured By Flow Cytometry*. *Cytometry*, **25**, 1: 32-6.
- Claire Vieille, Doug S. Burdette, J. Gregory Zeikus., 1996. *Biotechnology Annual Review*. **2**: 1-83

- Coello-Camba, A., Agustí, S., Vaqué, D. et al. *Estuaries and Coasts*. 2015. *Experimental Assessment Of Temperature Thresholds For Arctic Phytoplankton Communities*. *Estuaries And Coasts*. **38**: 873–85.
- Cohen Z. , Vonshak A., Richmond A., 1988. *Effect Of Environmental Conditions On Fatty Acid Composition Of The Red Alga Porphyridium Cruentum: Correlation To Growth Rate*. *Journal Of Phycology*. **24**,3: 328-332.
- Collier, J. L. 2000. *Review Flow Cytometry And The Single Cell In Phycology 1*. *Journal Of Phycology* **64**,4: 628–44.
- Combe, C, Hartmann, P., Rabouille S., Talec A., Bernard, O., and Sciandra, A. 2015. *Long-Term Adaptive Response To High-Frequency Light Signals In The Unicellular Photosynthetic Eukaryote Dunaliella Salina*. *Biotechnology And Bioengineering*. **112**, 6: 1111–21.
- Constantinos, E. V. and Antranikian, G. 2004. *Extremophiles: Ph, Temperature, And Salinity*.. *Microbial Diversity And Bioprospecting*. 146-152.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., Del Borghi, M., 2009. *Effect Of Temperature And Nitrogen Concentration On The Growth And Lipid Content Of Nannochloropsis Oculata And Chlorella Vulgaris For Biodiesel Production*. *Chemical Engineering And Processing: Process Intensification*, **48**. 6, 1146–1151.
- Convey, P., 2001. *Antarctic Ecosystems*. Levin, S. (Ed.). *Encyclopaedia Of Biodiversity*. **1**: 171-184.
- Convey, P., Stevens, M.I., 2007. *Antarctic Biodiversity*. *Science* **317**: 1877-1878.
- Cook, O. And Hildebrand, M., 2015. *Enhancing Lc-Pufa Production In Thalassiosira Pseudonana By Overexpressing The Endogenous Fatty Acid Elongase Genes*. *Journal Of Applied Phycology*. 897–905.
- Coppens, J., Grunert, O., Van Den Hende, S., Vanhoutte, I., Boon, N., Haesaert, G., and De Gelder, L. 2015. *The Use Of Microalgae As A High-Value Organic Slow-Release Fertilizer Results In Tomatoes With Increased Carotenoid And Sugar Levels*. *Journal Of Applied Phycology*. 1–11.
- Cordero B., Otero A., Patino M., Arrendondo B. O., Fabregas J., 1996. *Astaxanthin Production From The Green Alga Haematococcus Pluvialis With Different Stress Conditions*. *Biotechnology Letters*. **18**,2: 213-218.
- Cordero, B.F., Obratsova, I., Martín, L., Couso, I., León, R., Ángeles Vargas, M. and Rodríguez, H., 2010. *Isolation And Characterization Of A Lycopene B-Cyclase Gene From The Astaxanthin-Producing Green Alga Chlorella Zofingiensis (Chlorophyta)*. *Journal of phycology*. **46**,6: 1229-1238.
- Cota, G. F., Smith, R. E., 1991. *Ecology Of Bottom Ice Algae: Iii. Comparative Physiology*. *Journal Of Marine Systems*, **2**, 3-4: 297–315.
- Cota, G.F., 1985. *Photoadaptation Of High Arctic Ice Algae*. *Nature*, **315**: 219-222.
- Craigie, J.S., 2011. *Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture*. *Journal of Applied Phycology*, 23(3:371-393.
- Cremonese, P.A., Feroldi, M., Nadaleti, W.C., De Rossi, E., Feiden, A., De Camargo, M.P., Cremonese, F.E. And Klajn, F.F. 2015. *Biodiesel Production In Brazil: Current Scenario And Perspectives*. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, **42**, Pp.415-428.
- Crump B.C., Adams H.E., Hobbie J.E. Kling G.W. 2007. *Biogeography Of Bacterioplankton In Lakes And Streams Of An Arctic Tundra Catchment*. *Ecology*, **88**: 1365-1378.
- Cruz-Pizarro, L. Carrillo, P., 1996. *A High Mountain Oligotrophic Lake (La Caldera, Sierra Nevada, España)*. *Wetlands: a multiapproach Perspective*. Granada, University Of Granada. 111-130.
- Cruz-Pizarro, L.; Reche, I.; Carrillo, P. 1994. *Plankton Dynamics In A High Mountain Lake (Las Yeguas, Sierra Nevada, Spain)*. *Indirect Evidence Of Ciliates As Food Source For Zooplankton*. *Hydrobiología*, **274**: 29-35.
- Cubas, P., 2008. *Chlorophyta (Algas Verdes)*. 1–5.

- D. Soletto, L. Binaghi, A. Lodi, J.C.M. Carvalho, A. Converti. 2005. *Batch and fed-batch cultivations of Spirulina platensis using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources*, Aquaculture. **243**, 1–4: 217-224
- D'alessandro, Emmanuel And Antoniosi Filho, N.R. 2016. *Concepts And Studies On Lipid And Pigments Of Microalgae : A Review*. Renewable And Sustainable Energy Reviews. **58**: 832–841.
- D'amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., Gerday, C., 2006. *Psychrophilic Microorganisms: Challenges For Life*. Embo Reports, **7**, 4: 385–9.
- Da Silva Vaz, B., Costa, J.A.V. And De Moraes, M.G. 2015. *CO₂ Biofixation By The Cyanobacterium Spirulina Sp. Leb 18 And The Green Alga Chlorella Fusca Leb 111 Grown Using Gas Effluents And Solid Residues Of Thermoelectric Origin*. Applied Biochemistry And Biotechnology. Appl Biochem Biotechnol. **178**, 2: 418-429
- Da Silva, T. L., Reis, A., Medeiros, R., Oliveira, A, C., and Gouveia, A. 2009. *Oil Production Towards Biofuel From Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized By Flow Cytometry*. Applied Biochemistry And Biotechnology. **159**, 2: 568–78.
- Da Silva, T.L., Reis, A., Kent, C.A., Roseiro, J.C. and Hewitt, C.J., 2005. *The use of multi-parameter flow cytometry to study the impact of limiting substrate, agitation intensity, and dilution rate on cell aggregation during Bacillus licheniformis CCMI 1034 aerobic continuous culture fermentations*. Biotechnology and bioengineering, **92**,5: 568-578.
- Da Silva, T.L., Reis, A., Medeiros, R., Oliveira, A.C. and Gouveia, L., 2009. *Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous cultivations monitorized by flow cytometry*. Applied biochemistry and biotechnology, **159**,2: 568-578.
- Damiani Mc, Popovich Ca, Constenla D, Leonardi P. 2010. *Lipid analysis in Haematococcus pluvialis to assess its potential use as a biodiesel feedstock*. Bioresour Technol. **101**, 11: 3801-3807.
- Darland, G., B, T. D., 1971. *Bacillus Acidocaldarius Sp. Nov., An Acidophilic Thermophilic Spore-Forming Bacterium*. J. Gen. Mi-Crobiol. **67**, 9-15
- Dauta, A., D, J., Piquemal, F. 1990. *Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperatura*. Hydrobiologia. 207: 221.
- Dauta, A., De, J., Piquemal, F. and Boumnick, L., 1990. *Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperature*. Hydrobiologia, **207**, 1: 221-226.
- David, F., Hebeisen, M., Schade, G., Franco-Lara, E. and Di Berardino, M., 2012. *Viability and membrane potential analysis of Bacillus megaterium cells by impedance flow cytometry*. Biotechnology and bioengineering, **109**, 2: 483-492.
- Dawczynski, C., Schubert, R., And Jahreis, G. 2007. *Amino Acids, Fatty Acids, And Dietary Fibre In Edible Seaweed Products*. Food Chemistry **103**, 3: 891–99.
- Dawson, S.C., And Pace, N.R., 2002. *Novel Kingdom-Level Eukaryotic Diversity In Anoxic Environments*. Proc Natl Acad Sci Usa **99**: 8324–8329
- De Jesus Raposo, M., De Moraes, A. And De Moraes, R., 2016. *Emergent Sources Of Prebiotics: Seaweeds And Microalgae*. Marine Drugs, **14**. 2: 27.
- De Jesus Raposo, M.F., de Moraes, A.M.B. and de Moraes, R.M.S.C., 2015. *Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications*. Marine drugs. **13**, 5: 2967-3028.
- De La Noue, J., Pauw, N., 1988. *The Potential Of Microalgal Biotechnology : A Review Of Production And Uses Of Microalgae*, Biotechnology Advances. **6**: 725–770.
- De Los Cobos-Vasconcelos, D., García-Cruz, E.L., Franco-Morgado, M. and González-Sánchez, A. 2015. *Short-Term Evaluation Of The Photosynthetic Activity Of An Alkaliphilic Microalgae Consortium In A Novel Tubular Closed Photobioreactor*. Journal Of Applied Phycology. 795–802.

- De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R. And Vincenzini, M. 2001. *Exopolysaccharide-Producing Cyanobacteria And Their Possible Exploitation: A Review*. *Journal Of Applied Phycology*, **13**,4: 293-299.
- De Roeck-Holtzhauer, Y., Quere, I., Claire, C., 1991. *Vitamin Analysis Of Five Planktonic Microalgae And One Macroalga*. *Journal Of Applied Phycology*, **3**,3: 259–264.
- De Santi, Concetta, L., Del Vecchio, P., Anda Tutino, M., Parrilli, E., and De Pascale, D. 2012. *Thermal Stabilization Of Psychrophilic Enzymes: A Case Study Of The Cold-Active Hormone-Sensitive Lipase From Psychrobacter Sp. Ta144*. *Biotechnology Progress*. **28**, 4:946–952.
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Altan, E., 1987. *Bacillus Acidoterrestriis Sp. Nov., A New Thermotolerant Acidophile Isolated From Different Soils*. *Systematic And Applied Microbiology*, **10**, 1: 47–53.
- Del Campo, J.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Vargas, M.A., Rivas, J. and Guerrero, M.G., 2004. *Accumulation of astaxanthin and lutein in Chlorella zofingiensis (Chlorophyta)*. *Applied microbiology and biotechnology*, **64**, 6: 848-854.
- Del Valle Pérez, Lázaro., Macías Abraham, C., Torres Leyva, I., Socarrás Ferrer, B., Marsán Suárez, V., Sánchez Segura, M., 2002. *Efecto In Vitro De La Espirulina Sobre La Respuesta Inmune*. *Revista Cubana De Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. **18**,2.
- Delgado-Molina, J.A, Carrillo P, Medina-Sánchez J.M, Villar-Argaiz M, Bullejos F.J 2009. *Interactive Effects Of Phosphorus Loads And Ambient Ultraviolet Radiation On The Algal Community In A High-Mountain Lake*. *Journal Of Plankton Research*, **31**, 6: 619-634.
- DeLong, E. F., Franks, D. G., 1997. *Evolutionary Relationships Of Cultivated Psychrophilic And Barophilic Deep-Sea Bacteria*. *Appl Environ Microbiol.***63**, 5: 2105–2108.
- Denicola, D. M. 2000. *A Review Of Diatoms Found In Highly Acidic Environments*. *Hydrobiologia* **433**: 111–22.
- Dennis P.P., Shimmin L.C., 1997. *Evolutionary Divergence And Salinity-Mediated Selection In Halophilic Arquea*. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, **61**: 90-104.
- Deregibus, D., M. L. Quartino, G. L. Campana, F. R. Momo, C. Wiencke, And K. Zacher. 2016. *Photosynthetic Light Requirements And Vertical Distribution Of Macroalgae In Newly Ice-Free Areas In Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica*. *Polar Biology*. **39**, 1: 153–66.
- Desai, R.K., Streefland, M., Wijffels, R.H. and Eppink, M.H., 2016. *Novel astaxanthin extraction from Haematococcus pluvialis using cell permeabilising ionic liquids*. *Green Chemistry*, **18**,5: 1261-1267.
- Devos, N., Ingouff, M., Loppes, R., Matagne, R. F., 1998. *Rubisco Adaptation To Low Temperatures: A Comparative Study In Psychrophilic And Mesophilic Unicellular Algae*. *Journal Of Phycology*, **34**, 4: 655–660.
- Dickinson, I., Walker, G. and Pearce, D.A., 2016. *Microbes and the Arctic Ocean*. In *Their World: A Diversity of Microbial Environments*. 341-381.
- Dietzel, L., Bräutigam, K., Pfannschmidt, T., 2008. *Photosynthetic Acclimation: State Transitions And Adjustment Of Photosystem Stoichiometry--Functional Relationships Between Short-Term And Long-Term Light Quality Acclimation In Plants*. *The Febs Journal*. **275**, 6: 1080–8.
- Diez, B., Pedro, C., Marsh, T. L., Massana, R., Marina, D. D. B., Cie, I., 2001. *Application Of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Dgge) To Study The Diversity Of Marine Picoeukaryotic Assemblages And Comparison Of Dgge With Other Molecular Techniques*. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 7: 2942–2951.
- Dismukes Gc, Carrieri D, Bennette N, Ananyev Gm Posewitz Mc., 2008. *Aquatic Phototrophs: Efficient Alternatives To Land-Based Crops For Biofuels*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**: 235- 240.

- Doğan-Subaşı, E. and Demirer, G.N., 2016. *Anaerobic digestion of microalgal (Chlorella vulgaris) biomass as a source of biogas and biofertilizer. Environmental Progress & Sustainable Energy*. **35**: 936–941
- Dogan-Subasi, Eylem, And Goksel N. Demirer. 2009. *Anaerobic Digestion Of Microalgal (Chlorella Vulgaris) Biomass As A Source Of Biogas And Biofertilizer. Environmental Progress*. **28**, 3: 404–9.
- Dong, T., Knoshaug, E.P., Davis, R., Laurens, L.M., Van Wychen, S., Pienkos, P.T. And Nagle, N. 2016. *Combined Algal Processing: A Novel Integrated Biorefinery Process To Produce Algal Biofuels And Bioproducts. Algal Research* **19**: 316-323.
- Donovan, D.C., D.J. Schingoethe., R.J. Baer., J. Ryali., A.R. Hippen., S.T. Franklin., 2000. *Influence Of Dietary Fish Oil On Conjugated Linoleic Acid And Other Fatty Acids In Milk Fat From Lactating Dairy Cows. Journal Of Dairy Science*. **83**, 1: 2620–2628.
- Dopson, M., Lindström, E. B., Hallberg, K. B., 2001. *Chromosomally Encoded Arsenical Resistance Of The Moderately Thermophilic Acidophile Acidithiobacillus Caldis. Extremophiles : Life Under Extreme Conditions*, **5**, 4: 247–55.
- Dos Santos, R.R., Moreira, D.M., Kunigami, C.N., Aranda, D.A.G. and Teixeira, C.M.L.L., 2015. *Comparison between several methods of total lipid extraction from Chlorella vulgaris biomass. Ultrasonics sonochemistry*, **22**: 95-99.
- Doyle, J. J. Doyle, J. L., 1987. *A Rapid Dna Isolation Procedure For Small Quantities Of Fresh Leaf Tissue. Phytochem. Bull.* **19**:11–5.
- Doyle, J. J. Doyle, J., 1990. *Isolation Of Plant Dna From Fresh Tissue. Focus* **12**:13.
- Drake, D., Brogden, K., 2002. *Continuous Culture Chemostat Systems And Flow Cells As Methods To Investigate Microbial Interactions. Polymicrobial Diseases* **2**.
- Dreyer, I. 2011. *Global Warming Problems And Solutions. Material Science & Applied Chemistry*. **22**:94–98.
- Drira, N. 2016. *Microalgae From Domestic Wastewater Facility's High Rate Algal Pond: Lipids Extraction, Characterization And Biodiesel Production. Bioresource Technology*. **206**:239–244.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., Ravishankar, G. A., 2005. *Microorganisms And Microalgae As Sources Of Pigments For Food Use: A Scientific Oddity Or An Industrial Reality?. Trends In Food Science & Technology*, **16**, 9: 389–406.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Garland, C. D., 1993. *Changes In The Lipid Composition And Maximisation Of The Polyunsaturated Fatty Acid Content Of Three Microalgae Grown In Mass Culture. Journal Of Applied Phycology*, **5**, 1:71–83.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M. and Garland, C.D., 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, **5**,1: 71-83.
- Duraiarasan, S., Razack, S.A., Munusamy, A., Manickam, A., Syed, M.B., Razvi, A.R.A. And Siddiq, S.M. 2016. *Direct Conversion Of Lipids From Marine Microalga C. Salina To Biodiesel With Immobilised Enzymes Using Magnetic Nanoparticle. Journal Of Environmental Chemical Engineering*. **4**,1: 1393–1398.
- Durmaz, Y., 2007. *Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. Aquaculture*, **272**, 1: 717-722.
- Duval, B., Duval, E., Hoham, R. W., 1999. *Snow Algae Of The Sierra Nevada, Spain, And High Atlas Mountains Of Morocco. International Microbiology: The Official Journal Of The Spanish Society For Microbiology*, **2**,1: 39–42.
- Echevarría, F., Carrillo, P., Jimenez, F., Sanchez-Castillo, P., Cruz-Pizarro, L. and Rodriguez, J., 1990. *The size-abundance distribution and taxonomic composition of plankton in an oligotrophic, high*

- mountain lake (*La Caldera, Sierra Nevada, Spain*). *Journal of Plankton Research*, **12**, 2: 415-422.
- Echevarría, F., Carrillo, P., Jimenez, F., Sanchez-Castillo, P., Cruz-Pizarro, L. And Rodriguez, J. 1990. *The Size-Abundance Distribution And Taxonomic Composition Of Plankton In An Oligotrophic, High Mountain Lake (La Caldera, Sierra Nevada, Spain)*. *Jornal Of Plankton Research*. **12**, 2: 415-422.
- Eddie B, Krembs C, Neuer S., 2008. *Characterization And Growth Response To Temperature And Salinity Of Psychrophilic, Halotolerant Chlamydomonas Sp. Arc Isolated From Chukchi Sea Ice*. *Mar Ecol Prog Ser* **354**:107-117
- El Baky, Abd., El-Baroty, G.S., Bouaid, A., Martinez, M., & Aracil, J., 2012. *Enhancement Of Lipid Accumulation In Scenedesmus Obliquus By Optimizing CO₂ and Fe³⁺ Levels For Biodiesel Production*. *Bioresource Technology*, **119**: 429–32.
- El-Sheek, M.M.; Rady, A.A. 1995. *Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga Chlorella kessleri*. *Phyton*. **35**: 139–151.
- Encinar, J.M., Pardal, A. And Sanchez, N. 2016. *An Improvement To The Transesterification Process By The Use Of Co-Solvents To Produce Biodiesel*. *Fuel*, **166**: 51–58.
- Eryilmaz, T., Yesilyurt, M.K., Cesur, C. And Gokdogan, O. 2016. *Biodiesel Production Potential From Oil Seeds In Turkey*. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, **58**: 842-851.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. and Cid, Á., 2015. *Chlamydomonas reinhardtii cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress*. *Aquatic Toxicology*. **165**: 64-72.
- Ettl, H., Gartner, G., 1995. *Syllabus of Soil, Aero- and Lichenous Algae*. **2** :
- Evens T, Randall P. Niedz, Kirkpatrick, G. J., 2007. *Temperature And Irradiance Impacts On The Growth, Pigmentation And Photosystem Ii Quantum Yield Of Haematococcus Pluvialis (Chlorophyceae)*. *Journal Appl.Phycol*. **20**: 411-422
- Fábregas J., J. Abalde Y C. Herrero., 1989. *Biochemical Composition And Growth Of The Marine Microalgae Dunaliella Tertiolecta (Butcher) With Different Ammonium Nitrogen Concentration As Chloride, Sulphate, Nitrate And Carbonate*. *Aquaculture* **83**: 289-304.
- Fábregas, J., Domínguez, A, Regueiro, M., Maseda, A, Otero, A., 2000. *Optimization Of Culture Medium For The Continuous Cultivation Of The Microalga Haematococcus Pluvialis*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, **53**,5: 530–5.
- Fábregas, J., García, D., Morales, E., Domínguez, A. and Otero, A., 1998. *Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga Porphyridium cruentum modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity*. *Journal of fermentation and bioengineering*, **86**,5: 477-481.
- Fabregas, J., Herrero, C., 1990. *Vitamin Content Of Four Marine Microalgae. Potential Use As Source Of Vitamins In Nutrition*. *Journal Of Industrial Microbiology*, **5**,4: 259–263.
- Fábregas, J., Toribio, L., Abalde, J., Cabezas, B. Herrero, C., 1987. *Approach To Biomass Production Of The Marine Microalga Tetraselmis Suecica Using Common Garden Fertilizer And Soil Extract As Cheap Nutrient Supply In Batch Cultures*. *Aquacultural Engineering*, **6**: 141-50.
- Fábregas, J.; Herrero, C. Y Abalde, C., 1985. *Growth, Chlorophyll A And Protein Of The Marine Microalga Isochrysis Galbana In Batch Cultures With Different Salinities And High Nutrient Concentrations*. *Aquaculture*. **50**: 1-11.
- Fachet, Melanie, Dana Hermsdorf, Liisa Rihko-Struckmann, And Kai Sundmacher. 2016. *Flow Cytometry Enables Dynamic Tracking Of Algal Stress Response: A Case Study Using Carotenogenesis In Dunaliella Salina*. *Algal Research*. **13**: 227–34.
- Fajardo, A. R., Cerdán, L. E., Medina, A. R., Fernández, F. G. A., Moreno, P. A. G., Grima, E. M., 2007. *Lipid Extraction From The Microalga Phaeodactylum Tricornutum*. *European Journal Of Lipid Science And Technology*, **109**,2: 120–126.

- Fan, L., Vonshak, A., Gabbay, R., Hirshberg, J., Cohen, Z. and Boussiba, S., 1995. *The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga Haematococcus pluvialis as indicated by inhibition with diphenylamine*. Plant and cell physiology, **36**, 8: 1519-1524.
- Fanés Treviño Ingrid, F., González, A., Castillo, M. S., 2009. *Aguas Continentales De Andalucía*. Acta Botanica Malacitana **34**. 11-32.
- Fang, Lei, Lei Chen, Yuan Liu, Wei Tao, Zhongzhe Zhang, Haiying Liu, And Yong Tang. 2015. *Planktonic And Sedimentary Bacterial Diversity Of Lake Sayram In Summer*. Microbiologyopen. **4,5**: 814–25.
- Fawley, M. W., Karen, P., 2004. *Note A Simple And Rapid Technique For The Isolation of DNA*. Journal of Phycology. **40**: 223–225.
- Fehling, J, D. H. Green, Davidson, K., Botch, C. J., And Bates. S. S. 2004. *Domoic Acid Production By Pseudo-Nitzschia Seriata (Bacillariophyceae) In Scottish Waters*. Journal Of Phycology. **40**, 4: 622–30.
- Feller, G. 2003. *Molecular Adaptations To Cold In Psychrophilic Enzymes*. Cellular And Molecular Life Sciences. **60,4**: 648–62.
- Fernández G., Johnston M., 2006. *Fisiología Vegetal Experimental*. (Libro) Servicio Editorial Lica. San Jose. Costa Rica.
- Fernández Olmos, A., García De La Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., Valdezate Ramos, Sylvia., 2010. *Métodos De Identificación Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología*. Cap. **37**.
- Fernandez, L., Valiente, O. G., Mainardi, V., Bello, J. L., 1989. *Isolation And Characterization Of An Antitumor Agar-Type Polysaccharide Of Gracilaria Dominguisis*. Carbohydrate Research. **190**: 77–83.
- Fernández-Linares, L.C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A. and Badillo-Corona, J.A., 2012. *Producción de biocombustibles a partir de microalgas*. Ra Ximhai, **8**, 3b: 101-115.
- Fernández-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J., Labarta, U., 1989. *Biomass Production And Variation In The Biochemical Profile (Total Protein, Carbohydrates, Rna, Lipids And Fatty Acids) Of Seven Species Of Marine Microalgae*. Aquaculture, **83.1,2**: 17–37.
- Ferrara, M., Guerriero, G., Cardí, M., Esposito, S., 2012. *Purification And Biochemical Characterisation Of A Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase From The Psychrophilic Green Alga Koliella Antarctica*. Extremophiles: Life Under Extreme Conditions. **17,1**: 53-62
- Ferreira, L. S., Rodrigues, M. S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J. C. M., 2012. *Arthrospira (Spirulina) Platensis Cultivation In Tubular Photobioreactor: Use Of No-Cost CO₂ From Ethanol Fermentation*. Applied Energy, **92**: 379–385.
- Ferreira, M., Seixas, P., Coutinho, P., Fábregas, J., Otero, A., 2011. *Effect Of The Nutritional Status Of Semi-Continuous Microalgal Cultures On The Productivity And Biochemical Composition Of Brachionus Plicatilis*. Marine Biotechnology (New York, N.Y.), **13,6**: 1074–85.
- Fiala, M., Oriol, L., 1990. *Light-Temperature Interactions On The Growth Of Antarctic Diatoms*. Polar Biology, **10,8** : 629–636.
- Fidalgo, J.P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. and Herrero, C., 1998. *Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga Isochrysis galbana*. Aquaculture, **166**, 1: 105-116.
- Figueroa, F.L., N. Korbee, P. Carrillo, J.M. Medina-Sánchez, M. Mata, J. Bonomi P. M. Sánchez-Castillo., 2009. *The Effects Of Uv Radiation On Photosynthesis Estimated As Chlorophyll Fluorescence In Zygnemopsis Decussate (Chlorophyta) Growing In A High Mountain Lake (Sierra Nevada, Southern Spain)*. J. Limnol., **68**: 206-216.

- Fischer, D., Schl, U. G., Institut, P., Biologie, A. P., Kiel, D., 1997. *Exopolysaccharide Production By Cyanobacteria Grown In Closed Photobioreactors And Immobilized Using White Cotton Towelling*. Journal of Applied Phycology. **9**,3: 205–213.
- Foflonker, Fatima, Gennady Ananyev, Huan Qiu, Andrenette Morrison, Brian Palenik, G. Charles Dismukes, And Debashish Bhattacharya. 2016. *The Unexpected Extremophile: Tolerance To Fluctuating Salinity In The Green Alga Picochlorum*. Algal Research. **16**: 465–72
- Fogg, G.E., Nalewajko, C. and Watt, W.D., 1965. *Extracellular products of phytoplankton photosynthesis*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, **162**. 989: 517-534.
- Fogg, G.E., Thake, B., 1987. *Algal Cultures And Phytoplankton Ecology*. 3^o Edition, University Of Wisconsin Press. Usa. **189**.
- Forster, J., 1887. *Ueber Einige Eigenschaften Leuch- Tender Bakterien*. Zentbl. Bakt. Parasitkde (Abt. Ii) **12**, 337-340
- Frada, M.J., Schatz, D., Farstey, V., Ossolinski, J.E., Sabanay, H., Ben-Dor, S., Koren, I. and Vardi, A., 2014. *Zooplankton may serve as transmission vectors for viruses infecting algal blooms in the ocean*. Current Biology, **24**.21: 2592-2597.
- Fradique, M. 2013. *Isochrysis Galbana And Diacronema Vlkianum Biomass Incorporation In Pasta Products As Pufa's Source*. Lwt - Food Science And Technology, **50**,1: 312–319.
- Franklin, D.J., Choi, C.J., Hughes, C., Malin, G. and Berges, J.A., 2009. *Effect of dead phytoplankton cells on the apparent efficiency of photosystem II*. Marine Ecology Progress Series. **382**: 35-40.
- Franklin, N. M., M. S. Adams, J. L. Stauber, And R. P. Lim. 2001. *Development Of An Improved Rapid Enzyme Inhibition Bioassay With Marine And Freshwater Microalgae Using Flow Cytometry*. Archives Of Environmental Contamination And Toxicology. **40**,4: 469–80.
- Franqueira, D, M Orosa, E Torres, C Herrero, And A Cid. 2000. *Potential Use Of Flow Cytometry In Toxicity Studies With Microalgae*. The Science Of The Total Environment **247**,2,3: 119–26.
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A., 2000. *Potential Use Of Flow Cytometry In Toxicity Studies With Microalgae*. The Science Of The Total Environment. Science of The Total Environment. **247**, 2–3:119-126
- Friedl, T., 1995. *Inferring Taxonomic Positions And Testing Genus Level Assignments In Coccoid Green Lichen Algae: A Phylogenetic Analysis Of 18s Ribosomal Rna Sequences From Dictyochloropsis Reticulata And From Members Of The Genus Myrmecia (Chlor- Ophyta, Trebouxiophyceae Cl. Nov.)*. J. Phycol. **31**: 632–9.
- Fu, Yuejun, Xing Li, Shuhua Zheng, Jun Du, And Aihua Liang. 2015. *Classification And Identification Of Bacteria In The Soil Treated By Acmpv Using High-Throughput Sequencing Technique*. Biotechnology And Bioprocess Engineering. **20**: 931–36.
- Fuentes-Grünwald, C., Bayliss, C., Zanain, M., Pooley, C., Scolamacchia, M. and Silkina, A., 2015. *Evaluation of batch and semi-continuous culture of Porphyridium purpureum in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production*. Bioresource technology, **189**: 357-363.
- Fujimoto, Naoshi, Keigo Mizuno, Tomoki Yokoyama, Akihiro Ohnishi, Masaharu Suzuki, Satoru Watanabe And Kenji Komatsu. 2015. *Community Analysis Of Picocyanobacteria In An Oligotrophic Lake By Cloning 16s Rrna Gene And 16s Rrna Gene Amplicon Sequencing*. J Gen Appl Microbiol. **61**,5: 171–176.
- Fujiwara, N., Yamamoto, K., 1987. *Production Of Alkaline Protease In A Low-Cost Medium By Alkalophilic Bacillus Sp. And Properties Of The Enzyme*. Journal of Fermentation Technology. **65**,3: 345–348.
- Fujiwara-Arasaki, T., Mino, N. and Kuroda, M., 1984. *The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan*. Hydrobiologia, **116**, 1: 513-516.

- Fukase, S., 1962. *Oceanographic Condition Of Surface Water Between The South End Of Africa And Antartica*. Nankyoku Shiryo (Antarctic Research). **15**, 53-110.
- Fukuchi, M., 1980. *Phytoplankton chlorophyll stocks in the Antarctic Ocean*. Journal of Oceanography, **36**, 1:73-84.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda H., 2001. *Biodiesel Fuel Production By Transesterification Of Oils*. J Biosci Bioeng. **92**,5: 405-416.
- Furio, E. F. F., Zanza, R. V. A., Ukuyo, Y. F., Atsuoka, K. M., 2012. *Review Of Geographical Distribution Of Dinoflagellate Cysts In Southeast Asian Coasts*, Coastal Marine Science. **35**,1: 20-33.
- Galloway, S. B., Joseph, J. D., 1993. *Marine Biotoxin And Harmful Algae: A National Plan*.
- Gangl, Doris, Julie A Z Zedler, Priscilla D Rajakumar, Erick M Ramos Martinez, Anthony Riseley, Artur Włodarczyk, And Saul Purton. 2015. *Biotechnological Exploitation of Microalgae*. Journal Of Experimental Botany. **66**,22: 6975-90.
- Gantt, E., & Lipschultz, C. A., 1974. *Phycobilisomes Of Porphyridium Cruentum: Pigment Analysis*. Biochemistry. **13**,14: 2960-2966.
- Gao, X. And Kolomiets, M.V. 2009. *Host-Derived Lipids And Oxylipins Are Crucial Signals In Modulating Mycotoxin Production By Fungi*. Toxin Reviews. **28**,2-3: 79-88.
- García Canseco, V., Delgado Calvo-Flores, R. 2001. *Parque Nacional De Sierra Nevada*. Ed 1. Esfagnos, Talavera De La Reina.
- García-Jurado, F., Guerrero, F., Galotti, A., Gema Parral, G., Cruz-Pizarro, L., De Vicente, I., Rueda, F., Amores, V., Lucena, J., Rodríguez, V., León, P., Moreno-Ostos, E., Bautista, B., Blanco, J.M. Zabala, L., Gilbert, J.D. Y Jiménez-Gómez, F. 2007. *El Plancton De Las Lagunas De Sierra Nevada: Necesidad De Estudios Transdisciplinarios*. M+A. Revista Electrónica De Medioambiente, **4**: 1-10.
- Gardissal CD (1857) *A method of treating and preparing sea weeds or marine plants for manure*. British Patent vol. XXIX January-June. **2**.
- Gardissal Cd., 1857. *A Method Of Treating And Preparing Sea Weeds Or Marine Plants For Manure*. British Patent . 29: 2
- Garro, A., Krulwich, T. A., 1986. *Isolation And Characterization Of New Isolation And Characterization Of New Facultatively Alkalophilic Strains Of Bacillus Species*. Journal Of Bacteriology. **167**, 3: 766-773
- Gasol, J. M, Paul A D E L Giorgio, And P A Del Giorgio. 2000. *Using Flow Cytometry For Counting Natural Planktonic Bacteria And Understanding The Structure Of Planktonic Bacterial Communities*. Scientia Marina. **64**,2: 197-224.
- Gaur, A, Goutam S, and Mohan, D., 2015. *Isolation And Characterization Of Moderate Halophilic Salinicoccus Sp . Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes*. Journal of Global Biosciences. **4**,9: 3379-83.
- Georlette, D., B, V., Collins, T., D'amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A, Marx, J.-C., 2004. *Some Like It Cold: Biocatalysis At Low Temperatures*. Fems Microbiology Reviews, **28**: 25-42.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J. P., Claverie, P., Collins, T., D'amico, S., 2000. *Cold-Adapted Enzymes: From Fundamentals To Biotechnology*. Trends In Biotechnology, **18**: 103-7.
- Gerloff-Elias, A., Barua, D., Mölich, A. and Spijkerman, E., 2006. *Temperature-and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga Chlamydomonas acidophila*. FEMS microbiology ecology, 56(3):345-354.
- Ghirardi, M.L. 2006. *Hydrogen Production By Photosynthetic Bacteria*. , Indian J Biochem Biophys. **43**: 201-210.

- Ghosh, A., Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O.N., Saini, S., Bhowmick, T.K. and Gayen, K., 2016. *Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: a review*. Energy Conversion and Management, *113*, pp.104-118.
- Gibson, C. E., Wu, Y. And Pinkerton, D. 1995. *Substance Budget Of An Upland Catchment: The Significance Of Atmospheric Phosphorus Inputs*. Freshwater Biology, **33**: 385-392.
- Gieskes, W. W. C., Kraay, G., 1983. *Dominance Of Cryptophyceae During The Phytoplankton Spring Blom In The Central North Sea Detected By Hplc Analysis Of Pigments*. Marine Biology. **185**: 179-185.
- Gill, I., Valivety, R., 1997. *Polyunsaturated Fatty Acids, Part 1: Occurrence, Biological Activities And Applications*. Trends In Biotechnology. **15**,10: 401-9.
- Gim, G.H., Kim, J.K., Kim, H.S., Kathiravan, M.N., Yang, H., Jeong, S.H. and Kim, S.W., 2014. *Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions*. Bioprocess and biosystems engineering, **37**, 2: 99-106.
- Gim, G.H., Ryu, J., Kim, M.J., Kim, P.I. And Kim, S.W. 2016. *Effects Of Carbon Source And Light Intensity On The Growth And Total Lipid Production Of Three Microalgae Under Different Culture Conditions*. Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology. **43**,5: 605-616.
- Ginzburg, B., 1993. *Liquid Fuel (Oil) From Halophilic Algae " A Renewable Source Of Non-Polluting Energy*. Renewable Energy. **3**,2: 249-252.
- Girard P, Falconnier B, Bricout J, Vladescu B., 1994. *B-Carotene Producing Mutants Of Phaffia Rhodozyma*. Appl Microbiol Biotechnol. **41**: 183-191.
- Gladu Pk, Patterson Gw, Wikfors Gh, Smith Bc., 1995. *Sterol, Fatty Acid, And Pigment Characteristics Of UTEX 2341, A Marine Eustigmatophyte Identified Previously As Chlorella Minutissima (Chlorophyceae)*. J Phycol. **31**: 774-777
- Go, A.W., Sutanto, S., Ong, L.K., Tran-Nguyen, P.L., Ismadji, S. And Ju, Y.H. 2016. *Developments In In-Situ (Trans) Esterification For Biodiesel Production: A Critical Review*. Renewable And Sustainable Energy Reviews. **60**: 284-305.
- Gocmen, D., E, A, Williams, T., Parish, M., Rouseff, R. L., 2005. *Identification Of Medicinal Off-Flavours Generated By Alicyclobacillus Species In Orange Juice Using Gc-Olfactometry And Gc-MS*. Letters In Applied Microbiology. **40**,3: 172-7.
- Goh, L. P., Loh, S. P., Fatimah, M. Y., Perumal, K., 2009. *Bioaccessibility Of Carotenoids And Tocopherols In Marine Microalgae, Nannochloropsis Sp. And Chaetoceros Sp. Malaysian*. Journal Of Nutrition. **15**,1: 77-86.
- Goh, S.H., Yusoff, F.M. And Loh, S.P. 2010. *A Comparison Of The Antioxidant Properties And Total Phenolic Content In A Diatom, Chaetoceros Sp. And A Green Microalga, Nannochloropsis Sp*. Journal Of Agricultural Science. **2**,3: 123.
- Golyshina, O. V., 2011. *Environmental, Biogeographic, And Biochemical Patterns Of Archaea Of The Family Ferroplasmaceae*. Applied And Environmental Microbiology. **77**,15: 5071-8.
- Gomez, J.A., Höffner, K. And Barton, P.I. 2016. *From Sugars To Biodiesel Using Microalgae And Yeast*. Green Chem. **18**: 461-475.
- Gómez, L. M., Ramirez, C., 2004. *Microalgas Como Biomonitores De Contaminación*. Revista Cubana De Química. **16**: 34-48.
- Gómez, P.I., Inostroza, I., Pizarro, M. and Pérez, J., 2013. *From genetic improvement to commercial-scale mass culture of a Chilean strain of the green microalga Haematococcus pluvialis with enhanced productivity of the red ketocarotenoid astaxanthin*. AoB Plants, **5**.

- Gonzales A, Magallanes J. *Efecto del estrés nutritivo (Nitrógeno y Hierro) sobre la producción de lípidos en tres cepas de microalgas clorófitas*. México D.F.: 1er Encuentro de Jóvenes Investigadores-CONACYT; 2012: 23-25.
- González G, Raquel, 2014. Tesis doctoral, *Mecanismos genéticos de adaptación de microalgas al cambio ambiental brusco: extinciones masivas y antropoceno*. U. complutense de Madrid. España
- Gonzalez, Lina., 2010 *Efecto De La Comunidad Bacteriana En El Dinoflagelado Gymnodinium Catenatum: Crecimiento, Perfil De Pigmentos Y Toxinas Paralizantes*. Tesis doctoral. Universidad nacional de Colombia. Colombia
- Gordillo F.J.L. Goutx, M., Figueroa, F.L., Niell, F.X., 1998. *Effects Of Light Intensity, CO₂ And Nitrogen Supply On Lipid Class Composition Of Dunaliella Viridis*. J Appl Phycol **10**,2: 135- 144.
- Gosselin , M., Legendre, L. Therriault, J.-C. And Demers, S., 1990. *Light And Nutrient Limitation Of Sea-Ice Microalgae*. J. Phycol. **26**: 220-232
- Goudie A.S. Middleton N.J. 2006. *Desert Dust In The Global System*. Springer, Berlin, 287.
- Gouveia, L., Oliveira, A. C., 2009. *Microalgae As A Raw Material For Biofuels Production*. Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology, **36**,2: 269–74.
- Graneli, E., Carlsson, P., Legrand, C., 1999. *The Role Of C , N And P In Dissolved And Particulate Organic Matter As A Nutrient Source For Phytoplankton Growth , Including Toxic Species*. Aquatic Ecology. **33**,1: 17–27.
- Griffin D.W., Kellogg C.A., Garrison V.H. Shinn E.A. 2002. *The Global Transport Of Dust*. American Scientist, 90: 230–237.
- Griffiths, M., Harrison, S.T., Smit, M. and Maharajh, D., 2016. *Major Commercial Products from Micro-and Macroalgae*. In Algae Biotechnology: 269-300.
- Gu, N., Lin, Q., Li, G., Tan, Y., Huang, L., Lin, J., 2012. *Effect Of Salinity On Growth, Biochemical Composition, And Lipid Productivity Of Nannochloropsis Oculatacs 179*. Engineering In Life Sciences. **5**: 1–7.
- Gudynaite-Savitch L, Gretes M, Morgan-Kiss Rm, Savitch Lv, Simmonds J, Kohalmi Se, Huner, N.R., 2006. *Cytochrome F From The Antarctic Psychrophile, Chlamydomonas Raudensis Uwo 241: Structure, Sequence, And Complementation In The Mesophile, Chlamydomonas Reinhardtii*. Mol Genet Genomics **275**: 387–398
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Malcata, F. X., 2011. *Microalgae As Sources Of Carotenoids*. Marine Drugs. **9**,4: 625–644.
- Guerrero, M.G., Rodriguez, H., Vargas, M., García-González, M., Campo, J.A.D., Moreno, J. and Rivas, J., 1999. Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial.
- Guffanti, A.A., Finkelthal, O.P.H.I.R., Hicks, D.B., Falk, L.E.O.N., Sidhu, A.N.I.T.A., Garro, A. and Krulwich, T.A., 1986. Isolation and characterization of new facultatively alkalophilic strains of Bacillus species. *Journal of bacteriology*, **167**, 3: 766-773.
- Guillard R.R.L., 1973. *Divisions Rates*, J.R. Stein (Ed.). *Handbook Of Phycological Methods*. Culture Methods And Growth Measurements. Cambridge, Universa Press : 289–311.
- Guillard, R. R. L. And J. H. Ryther., 1962. *Studies Of Marine Planktonic Diatoms. I. Cyclotella Nana Hustedt Anddetonula Eonfervaeae (Cleve) Gran*. Can. J. Microbiol. **8**: 229-239.
- Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Ramluckan, K. and Bux, F., 2014. *Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production*. Fuel, **128**: 46-52.
- Guschina, I. A., Harwood, J. L., 2006. *Lipids And Lipid Metabolism In Eukaryotic Algae*. Progress In Lipid Research, **45**: 160–186.
- Guschina, I.A. and Harwood, J.L., 2006. *Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae*. Progress in lipid research, **45**. 2:160-186.

- Gutiérrez, G. C., Almaraz, R. De La Torre. 2008. *Fitoplasmas: síntomas y características moleculares*. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 2008, **14**, 2.
- Gutwinski, P. And Cema, G., 2016. *Removal Of Nitrogen And Phosphorus From Reject Water Using Chlorella Vulgaris Algae After Partial Nitrification/Anammox Process*. Water Environment Research- **88**,1: 63-69.
- Guyre, R.A.; Konopka, A.; Brooks, A. Doemel, W., 1987. *Algal And Bacterial Activities In Acidic (pH3) Strip Mine Lakes*. Applied And Environmental Microbiology. **53**:2069-2076
- H. Honda, T. Kudo, Y. Ikura, K. Horikoshi. 1985. *Two Types Of Xylanases Of Alkalophilic Bacillus Sp. No. C-125*. Canadian Journal Of Microbiology. **31**,6: 538-542.
- Hadj-Romdhane, F., Jaouen, P., Pruvost, J., Grizeau, D., Van Vooren, G., Bourseau, P. 2012. *Development And Validation Of A Minimal Growth Medium For Recycling Chlorella Vulgaris Culture*. Bioresource Technology. **123**, 366–74.
- Hadj-Romdhane, F., Jaouen, P., Pruvost, J., Grizeau, D., Van Vooren, G., Bourseau, P., 2012. *Development And Validation Of A Minimal Growth Medium For Recycling Chlorella Vulgaris Culture*. Bioresource Technology. **123**: 366–74.
- Hadley, Scott, Wild-Allen, K. Johnson, C. and Macleod, C. 2014. *Modeling Macroalgae Growth And Nutrient Dynamics For Integrated Multi-Trophic Aquaculture*. Journal Of Applied Phycology. **27**. 901–16.
- Hagström, J.A., 2014. *Effects Of Rice Straw On The Cell Viability, Photosynthesis, And Growth Of Microcystis Aeruginosa*. Chinese Journal Of Oceanology And Limnology. **32**,1: 120-129.
- Hagström, J.A., 2014. *Effects of rice straw on the cell viability, photosynthesis, and growth of Microcystis aeruginosa*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, **32**,1:120-129.
- Hallenbeck, P.C. 2015. *Advances In Enzymatic Conversion Of Biomass To Biofuels*. Pages 96-110
- Hancke, Kasper, Brian K. Sorrell, Lars Chresten Lund-Hansen, Morten Larsen, Torunn Hancke, And Ronnie N. Glud. 2014. *Effects Of Temperature And Irradiance On A Benthic Microalgae Community: A Combined Two-Dimensional Oxygen And Fluorescence Imaging Approach*. Limnology And Oceanography. **59**,5: 1599–1611.
- Hansen P. J., 2002. *Effect Of High Ph On The Growth And Survival Of Marine Phytoplankton: Implications For Species Succession*. Aquatic Microbial Ecology. **28**,3: 279-288
- Harrison, P.J., Thompson, P.A. and Calderwood, G.S., 1990. *Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton*. Journal of Applied Phycology. **2**, 1:45-56.
- Härtel, H., Dormann, P., Benning, C., 2000. *Dgd1-Independent Biosynthesis Of Extraplastidic Galactolipids After Phosphate Deprivation In Arabidopsis*. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, **97**,19: 10649–10654.
- Hartig, P., Grobbelaar, J. U., S, C. J., Groeneweg, J., 1988. *On The Mass Culture Of Microalgae: Areal Density As An Important Factor For Achieving Maximal Productivity*. Biomass. **15**: 211–221.
- Hasle, G.R., 1969. *An Analysis Of The Phytoplankton Of The Pacific Souththorn Ocean: Abundance Composition And Distribution During The Bratigg Expedition. 1947-1948*. Hvalradets Skr. **52**: 1-168
- Hattori, Tatsuya, Hiromichi Shiba, Ken-Ichi Ashiki, Takuma Araki, Yoh-Kow Nagashima, And Katsuhiko Yoshimatsu. 2016. *Anaerobic Growth Of Haloarchaeon Haloferax Volcanii By Denitrification Is Controlled By The Transcription Regulator Naro*. J Bacteriol. **198**, 7: 1077–1086.
- Havlik, Ivo, Patrick Lindner, Thomas Scheper, And Kenneth F. Reardon. 2013. *On-Line Monitoring Of Large Cultivations Of Microalgae And Cyanobacteria*. Trends In Biotechnology **31**,7: 406–14.
- He, F., Fu, P. C., Xu, C. M., 2011. *Precision Cultivation Of Phaeodactylum Tricornutum And Free Lipid Acid Analysis*. Advanced Materials Research, **354-355**: 226–230.

- Heesch, S., Pažoutová, M., Moniz, M.B. And Rindi, F., 2016. *Prasiolales (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) Of The Svalbard Archipelago: Diversity, Biogeography And Description Of The New Genera Prasionella And Prasionema*. European Journal Of Phycology. **51**,2: 171-187.
- Heidari, M., Kariminia, H.R. and Shayegan, J., 2016. Effect of culture age and initial inoculum size on lipid accumulation and productivity in a hybrid cultivation system of *Chlorella vulgaris*. Process Safety and Environmental Protection, 104, pp.111-122.
- Henderson, R.J. and Mackinlay, E.E., 1992. *Radiolabelling studies of lipids in the marine cryptomonad Chroomonas salina in relation to fatty acid desaturation*. Plant and cell physiology, **33**:4: 395-406.
- Hendriks, I.E., Duarte, C.M., Olsen, Y.S., Steckbauer, A., Ramajo, L., Moore, T.S., Trotter, J.A. And Mcculloch, M., 2015. *Biological Mechanisms Supporting Adaptation To Ocean Acidification In Coastal Ecosystems*. Estuarine, Coastal And Shelf Science. **152**, 1-8.
- Henrard, Arruda, A., Martins, Da Rosa, G. Moraes, L., Greque De Morais, G. And Alberto Vieira Costa. J. 2015. *African Journal Of Microbiology Research The Cultivation Of Microalgae Cyanobium Sp. And Chlorella Sp. In Different Culture Media And Stirring Setting*. Afr. J. Microbiol. Res. **9**,21: 1431–39.
- Hernández, A. G., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez, M. P., Carreón, L. S., Jiménez, A. M., Cuernavaca, P., 2009. Biodiesel A Partir De Microalgas, **13**,3: 38–61.
- Hernández, C.F.G., Hernández, M.D.J.S. and Nava, M.Á.F., 2014. Estimación de Iluminación en un Fotobiorreactor Productor de Biomasa a Partir de Microalgas. Conciencia Tecnológica, (47):29-35.
- Hernandez, J.P., de-Bashan, L.E. and Bashan, Y., 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**(1):190-198.
- Hernández-Míreles, T., Benavides, J., Rito-Palomares, M., 2006. *Process To Purify The Colored Protein B-Phycoerythrin Produced*. Revista Mexicana De Ing. Química. **5**: 131–143.
- Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J.-S. (2012). *Characterization And Optimization Of Carbohydrate Production From An Indigenous Microalga Chlorella Vulgaris Fsp-E*. Bioresource Technology **135**: 157-165.
- Hodač, L., Hallmann, C., Rosenkranz, H., Faßhauer, F., Friedl, T., 2012. *Molecular Evidence For The Wide Distribution Of Two Lineages Of Terrestrial Green Algae (Chlorophyta) Over Tropics To Temperate Zone*. Isrn Ecology **2012**: 1–9.
- Hodaifa, G., Martínez, M. E. and Sánchez, S. (2010), Influence of temperature on growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted olive mill wastewater as culture medium. Eng. Life Sci., 10: 257–264.
- Hodgson, Dominic A., Stephen J. Roberts, Michael J. Bentley, Emma L. Carmichael, James A. Smith, Elie Verleyen, Wim Vyverman, Paul Geissler, Melanie J. Leng, And David C W Sanderson. 2009. *Exploring Former Subglacial Hodgson Lake, Antarctica. Paper Ii: Palaeolimnology*. Quaternary Science Reviews. **28** :23-24.
- Hodkinson, B.P. and Grice, E.A., 2015. Next-generation sequencing: a review of technologies and tools for wound microbiome research. *Advances in wound care*, **4**(1):50-58.
- Hoh, Donghee, Stuart Watson, And Eunsung Kan. 2016. *Algal Biofilm Reactors For Integrated Wastewater Treatment And Biofuel Production: A Review*. Chemical Engineering Journal. **287**: 466–73.
- Holzappel A.M, Vinebrooke R.D., 2005. *Environmental Warming Increases Invasion Potential Of Alpine Lake Communities By Imported Species*. Global Change Biology. **11**: 2009–2015.
- Honda, H., Kudo, T., Ikura, Y. and Horikoshi, K., 1985. Two types of xylanases of alkalophilic *Bacillus* sp. No. C-125. *Canadian Journal of Microbiology*, **31**(6):538-542.

- Hong, J.W., Jo, S.W. and Yoon, H.S., 2015. Research and development for algae-based technologies in Korea: a review of algae biofuel production. *Photosynthesis research*, 123(3):297-303.
- Hong, Y. K., Sohn, C. H., Lee, K. W. Kim, H. G., 1997. *Nucleic Acid Extraction Conditions From Seaweed Tissues For Poly- Merase Chain Reaction*. J. Mar. Biotechnol. **5**: 95–9.
- Horikoshi, K., 1998 *Extremophiles: Microbial Life In Extreme Environments* Wiley-Liss. 155-179.
- Horne, J. R., Erdmann, V. A., 1972. *Isolation And Characterization Of 5s Rna-Protein Complexes From Bacillus Stearothermophilus And Escherichia Coli Ribosomes*. Molecular & General Genetics. **119**,4: 337–44.
- Horst, G. 2012. Rekha, V. 2012. *Culture And Biofuel Production Efficiency Of Marine Microalgae Chlorella Marina And Skeletonema Costatum*. Indian Journal Of Marine Sciences. **41**,2: 152–158.
- Horst, I., Parker, B. M., Dennis, J. S., Howe, C. J., Scott, S. A, Smith, A. G., 2012. *Treatment Of Phaeodactylum Tricornutum Cells With Papain Facilitates Lipid Extraction*. Journal Of Biotechnology. **162**,1: 40–49.
- Hou, S.-Y., Govorunova, E. G., Ntefidou, M., Lane, C. E., Spudich, E. N., Sineshchekov, O. A, Spudich, J. L., 2012. *Diversity Of Chlamydomonas Channelrhodopsins*. Photochemistry And Photobiology. **88**,1: 119–28.
- Hsieh, C.H. and Wu, W.T., 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource technology*, 100(17):3921-3926.
- Hsieh, C.-H., Wu, W.-T. 2009. *Cultivation Of Microalgae For Oil Production With A Cultivation Strategy Of Urea Limitation*. Bioresource Technology. **100**,17: 3921–3926.
- Hsieh, Wen-Shyang, Nai-Yu Wang, Jou-An Feng, Li-Chuan Weng, And Hsueh-Hsia Wu. 2015. *Identification Of Dha-23, A Novel Plasmid-Mediated And Inducible Ampc Beta-Lactamase From Enterobacteriaceae In Northern Taiwan*. Frontiers In Microbiology. **6**: 1–7.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. *Microalgal Triacylglycerols As Feedstocks For Biofuel Production: Perspective And Advances*. Plant J. **54**: 621–639.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. and Darzins, A., 2008. *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*. The plant journal, **54**,4:621-639.
- Huang, Z., Li, L., Huang, G., Yan, Q., Shi, B. and Xu, X., 2009. *Growth-inhibitory and metal-binding proteins in Chlorella vulgaris exposed to cadmium or zinc*. Aquatic toxicology, **91**,1:54-61.
- Huber, G., Spinnler, C., Gambacorta, A., and Stetter., K.O. 1989. *Metallosphaera Sedula Gen, And Sp. Nov. Represents A New Genus Of Aerobic, Metal-Mobilizing, Thermoacidophilic Archaeobacteria*. Systematic And Applied Microbiology, Volume **12**,1 : 38-47.
- Hughes-Martiny J.B., Bohannan B.J., Brown J.H. 2006. *Microbial Biogeography: Putting Microorganisms On The Map*. Nature Review Microbiology. 4: 102-112.
- Hulatt, C.J., Wijffels, R.H., Bolla, S. and Kiron, V., 2017. *Production of Fatty Acids and Protein by Nannochloropsis in Flat-Plate Photobioreactors*. PLoS One, **12**,1
- Hutchinson, M., Johnstone, K. I., White, D., 1966. *Taxonomy Of The Acidophilic Thiobacilli*. Journal Of General Microbiology. **44**,3: 373–81.
- Hutter, K J, And H E Eipel. 1978. *Flow Cytometric Determinations Of Cellular Substances In Algae, Bacteria, Moulds And Yeasts*. Antonie Van Leeuwenhoek. **44**,4: 269–282
- Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., Kovar, K., 2012. *Flow Cytometry For The Development Of Biotechnological Processes With Microalgae*. Biotechnology Advances. **31**: 2-16.
- Idler, D. R., Saito, A., Wisaman, P., 1968. *Steroids* **465**: 465–473.
- Illman, A., Scragg, A., Shales, S. 2000. *Increase In Chlorella Strains Calorific Values When Grown In Low Nitrogen Medium*. Enzyme And Microbial Technology. **27**,8: 631–635.

- Illman, A.M., Scragg, A.H. and Shales, S.W., 2000. *Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium*. Enzyme and microbial technology. **27**,8:631-635.
- Illman, A.M.; Scragg, A.H.; Shales, S.W., 2000. *Increase In Chlorella Strains Calorific Values When Grown In Low Nitrogen Medium*. Enzyme Microb. Technol. **27**: 631–635.
- Ippc, 2007: *Cambio Climático 2007: Informe De Síntesis. Contribución De Los Grupos De Trabajo I, Ii Y Iii Al Cuarto Informe De Evaluación Del Grupo Intergubernamental De Expertos Sobre El Cambio Climático*. Ippc, Ginebra, Suiza, 104 .
- Isleten-Hosoglu, Muge, Idil Gultepe, Murat Elibol, 2012. *Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by Chlorella saccharophila under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content*. Biochemical Engineering Journal **61**: 11-19
- Jaenicke, R. Y Zavodszky, P., 1990. *Proteins Under Extreme Physical Conditions*. Febs Lett **268**: 344-349.
- James, C.M., Al-Hinty, S. and Salman, A.E., 1989. *Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes*. Aquaculture, **77**,4: 337-351.
- James, G. O., Hocart, C. H., Hillier, W., Price, G. D., Djordjevic, M. A., 2012. *Temperature Modulation Of Fatty Acid Profiles For Biofuel Production In Nitrogen Deprived Chlamydomonas Reinhardtii*. Bioresource Technology. **127**c: 441–447.
- Jayachandra, S Y, Anil Kumar S, D P Merley, And M B Sulochana. 2012. *Isolation And Characterization Of Extreme Halophilic Bacterium Salinicoccus Sp . Jas4 Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes*. Rec. Res. Sci. Tech. **4**,4: 46–49.
- Jazzar, S., Olivares-Carrillo, P., De Los Ríos, A.P., Marzouki, M.N., Acién-Fernández, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., Smaali, I. And Quesada-Medina, J. 2015. *Direct Supercritical Methanolysis Of Wet And Dry Unwashed Marine Microalgae (Nannochloropsis Gaditana) To Biodiesel*. Applied Energy, **148**: 210-219.
- Jeppesen, E., Kronvang, B., Olesen, J. E., Audet, J., Søndergaard, M., Hoffmann, C. C., Andersen, H. E., 2010. *Climate Change Effects On Nitrogen Loading From Cultivated Catchments In Europe: Implications For Nitrogen Retention, Ecological State Of Lakes And Adaptation*. Hydrobiologia. **663**,1: 1–21.
- Jochem, Frank J., 2001. *Flow Cytometry In Biological Oceanography*.
- Johnson, D. B., 1998. *Biodiversity And Ecology Of Acidophilic Microorganisms*. Fems Microbiology Ecology, **27**, 4: 307–317.
- Johnson, D. B., Hallberg, K. B., 2003. *The Microbiology Of Acidic Mine Waters*. Research In Microbiology, **154**, 7: 466–73.
- Johnson, P.W. And Sieburth, J.M., 1982. *In Situ Morphology And Occurrence Of Eucaryotic Phototrophs Of Bacterial Size In The Picoplankton Of Estuarine And Oceanic Waters*. J. Phycol. **18**: 318–327.
- Jonte, L., Rosales-Loaiza, N., Bermúdez-González, J. and Morales, E., 2013. *Cultivos discontinuos alimentados con urea de la cianobacteria Phormidium sp. en función de la salinidad y edad del cultivo*. Revista Colombiana de Biotecnología, **15**, 2:38-46.
- Juárez-Jiménez, B., Manzanera, M., Rodelas, B., Martínez-Toledo, M.V., Gonzalez-López, J., Crognale, S., Pesciaroli, C., Fenice, M. 2010. *Metabolic characterization of a strain (BM90) of Delftia tsuruhatensis showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols*. Biodegradation, **21**:475–489
- Kamarudin, Kamrul Fakir, Ding Gong Tao, Zahira Yaakob, Mohd Sobri Takriff, Muhammad Syukri Abd Rahaman, And Jalaini Salihon. 2015. *A Review On Wastewater Treatment And Microalgal By-*

- Product Production With A Prospect Of Palm Oil Mill Effluent (Pome) Utilization For Algae.* Der Pharma Chemica. **7,7** : 73–89.
- Kappen, L., 2004. *The Diversity Of Lichens In Antarctica, A Review And Comments.* Contributions To Lichenology. Festschrift In Honour Of Hannes Hertel. **88**: 331-343.
- Karan, R., Capes, M. D., Dassarma, S., 2012. *Function And Biotechnology Of Extremophilic Enzymes In Low Water Activity.* Aquatic Biosystems. **8,1**: 4.
- Karło, A., Ziemińska-Buczyńska, A., Pilarczyk, M. And Surmacz-Górska, J. 2015. *Molecular Monitoring Of Bacterial And Microalgal Biocenoses' Biodiversity In High Loaded Farming Ponds.* Ecological Chemistry And Engineering S. **22,3** : 425–437.
- Keller, Maureen D., Rhonda C. Selvin, Wolfgang Claus, Robert R. L. Guillard., 1987. *Media For The Culture Of Oceanic Ultraphytoplankton.* Journal Of Phycology Volume **23**, 4: 633–638.
- Kendel, M., Couzinet-Mossion, A., Viau, M., Fleurence, J., Barnathan, G., Wielgosz-Collin, G., 2012. *Seasonal Composition Of Lipids, Fatty Acids, And Sterols In The Edible Red Alga Grateloupia Turuturu.* Journal Of Applied Phycology. **25,2**: 425–432.
- Kernan, M., Ventura, M., Bitušík, P., Brancelj, A., Clarke, G., Velle, G., Raddum, G.G., Stuchlík, E. and Catalan, J., 2009. Regionalisation of remote European mountain lake ecosystems according to their biota: environmental versus geographical patterns. *Freshwater Biology*, **54,12**: 2470-2493.
- Kevbrin, V.V., Romanek, C. S. And J. Wtegel., 2003. *Alkalithermophles: A Double Challenge From Extreme Environments.* Section Vi: Extremophiles And Biodiversity. **6**
- Khotimchenko, S. V., Yakovleva, I. M., 2005. *Lipid Composition Of The Red Alga Tichocarpus Crinitus Exposed To Different Levels Of Photon Irradiance.* Phytochemistry, **66,1**: 73–79.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., 2006. *The Effect Of Phosphate Starvation On The Lipid And Fatty Acid Composition Of The Fresh Water Eustigmatophyte Monodus Subterraneus.* Phytochemistry. **67,7**: 696–701.
- Kim, Eun Jae, Woongsic Jung, Suyoun Lim, Sanghee Kim, Se Jong Han, And Han Gu Choi. 2016. *Growth And Lipid Content At Low Temperature Of Arctic Alga Chlamydomonas Sp. Knm0029c.* Bioprocess And Biosystems Engineering. **39,1**: 151–157.
- Kim, H.J., Choi, Y.K., Jeon, H.J., Bhatia, S.K., Kim, Y.H., Kim, Y.G., Choi, K.Y., Kim, H.J., Lee, S.H., Lee, Y.K. And Yang, Y.H. 2015. *Growth Promotion Of Chlorella Vulgaris By Modification Of Nitrogen Source Composition With Symbiotic Bacteria, Microbacterium Sp. Hjl.* Biomass And Bioenergy. **74**: 213-219.
- Kim, Hyun Joong, Yong Keun Choi, Hyeon Jin Jeon, Shashi Kant Bhatia, Yong Hyun Kim, Yun Gon Kim, Kwon Young. 2015. *Growth Promotion Of Chlorella Vulgaris By Modification Of Nitrogen Source Composition With symbiotic Bacteria, Microbacterium Sp. Hjl.* Biomass And Bioenergy. **74**: 213–19.
- Kim, J.-Y., Hur, S.-H., Hong, J.-H., 2005. *Purification And Characterization Of An Alkaline Cellulase From A Newly Isolated Alkalophilic Bacillus Sp. Hsh-810.* Biotechnology Letters. **27,5**: 313–316.
- Kim, T.H., Suh, W.I., Yoo, G., Mishra, S.K., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M.S. And Yang, J.W. 2015. *Development Of Direct Conversion Method For Microalgal Biodiesel Production Using Wet Biomass Of Nannochloropsis Salina.* Bioresource Technology. **191**: 438-444.
- Kinne O., 1977. *Bivalvia: Mollusca. Cultivation Of Animals - Research Cultivation,* In: O. Kinne (Ed.), Marine Ecology **3**: 900–934.
- Kiperstok, A.C., Sebestyén, P., Podola, B. and Melkonian, M., 2017. *Biofilm cultivation of Haematococcus pluvialis enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities.* Algal Research, **21**:213-222.

- Kiran, B., Pathak, K., Kumar, R. and Deshmukh, D. 2016. *Statistical Optimization Using Central Composite Design For Biomass And Lipid Productivity Of Microalga: A Step Towards Enhanced Biodiesel Production*. Ecological Engineering. **92**: 73-81.
- Kiran, B., Pathak, K., Kumar, R. And Deshmukh, D. 2015. *Growth Pattern And Biofuel Production Potential Of Newly Isolated Microalga, Chlorococcum Sp. Im-03 Under Nitrogen Limited Conditions*. Journal Of Chemical Technology And Biotechnology. **91**,5: 1339–1344.
- Kligerman, D.C. And Bouwer, E.J. 2015. *Prospects For Biodiesel Production From Algae-Based Wastewater Treatment In Brazil: A Review*. Renewable And Sustainable Energy Reviews. **52**: 1834–1846.
- Knothe, G. and Steidley, K.R., 2005. *Lubricity of components of biodiesel and petrodiesel. The origin of biodiesel lubricity*. Energy & fuels, **19**,3: 1192-1200.
- Knothe, G., 2011. *A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. algae. Will algae-derived biodiesel perform?*. Green Chemistry, **13**, 11:3048-3065.
- Kobori, H., Sullivan, C. W., Shizuya, H., 1984. *Heat-Labile Alkaline Phosphatase From Antarctic Bacteria: Rapid 5' End-Labeling Of Nucleic Acids*. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, **81**: 6691–5.
- Kōki Horikoshi, William D. Grant., 1998. *Extremophiles: Microbial Life In Extreme Environments*
- Komitopoulou, E., Boziaris, I. S., Davies, E. A., Delves-Broughton, J., Adams, M. R., 1999. *Alicyclobacillus Acidoterrestris In Fruit Juices And Its Control By Nisin*. International Journal Of Food Science And Technology. **34**: 81–85.
- Kommareddy, A. and Anderson, G., 2003. *Study of Light as a Parameter in the Growth of Algae in a Photo-Bio Reactor (PBR)*. In 2003 ASAE Annual Meeting (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Kosek, Klaudia, Żaneta Polkowska, Beata Żyszka, And Jacek Lipok. 2016. *Phytoplankton Communities Of Polar Regions–Diversity Depending On Environmental Conditions And Chemical Anthropopressure*. Journal Of Environmental Management. **171**: 243-251.
- Kristjánsson, Jk, And Go Hreggvidsson. 1995. *Ecology And Habitats Of Extremophiles*. World Journal Of Microbiology And Biotechnology. **11**,1: 17–25.
- Kubiszyn, A.M. And Wiktor, J.M., 2015. *The Gymnodinium And Gyrodinium (Dinoflagellata: Gymnodiniaceae) Of The West Spitsbergen Waters (1999–2010): Biodiversity And Morphological Description Of Unidentified Species*. Polar Biology. 1–9.
- Kumagai, Y., Satoh, T., Inoue, A., Ojima, T., 2012. *Enzymatic Properties And Primary Structures Of Two A-Amylase Isozymes From The Pacific Abalone Haliotis Discus Hannai. Comparative Biochemistry And Physiology*. Part B, Biochemistry & Molecular Biology. 1–9.
- Kumagai, Yuya, And Takao Ojima. 2009. *Enzymatic Properties And The Primary Structure Of A B-1,3-Glucanase From The Digestive Fluid Of The Pacific Abalone Haliotis Discus Hannai. Comparative Biochemistry And Physiology - B Biochemistry And Molecular Biology*. **154**,1: 113–20.
- Kumar, C. G., 2002. *Purification And Characterization of A Thermostable Alkaline Protease From Alkaliphilic Bacillus Pumilus*. **34**: 13–17.
- Kumar, V., Muthuraj, M., Palabhanvi, B. and Das, D., 2016. Synchronized growth and neutral lipid accumulation in Chlorella sorokiniana FC6 IITG under continuous mode of operation. *Bioresource technology*, **200**: 770-779.
- Kumar, V., Muthuraj, M., Palabhanvi, B., Ghoshal, A.K. and Das, D., 2014. *High cell density lipid rich cultivation of a novel microalgal isolate Chlorella sorokiniana FC6 IITG in a single-stage fed-batch mode under mixotrophic condition*. Bioresource technology, **170**: 115-124.

- Kumaran, J., Jose, B., Joseph, V. And Bright Singh, I.S. 2016. *Optimization Of Growth Requirements Of Marine Diatom Chaetoceros Muelleri Using Response Surface Methodology*. Aquaculture Research. 1–12.
- Kuo, C.M., Chen, T.Y., Lin, T.H., Kao, C.Y., Lai, J.T., Chang, J.S. and Lin, C.S., 2015. *Cultivation of Chlorella sp. GD using piggery wastewater for biomass and lipid production*. Bioresource technology, **194**: 326-333.
- La Rocca, Nicoletta, Katia Sciuto, Andrea Meneghesso, Isabella Moro, Nicoletta Rascio, And Tomas Morosinotto. 2015. *Photosynthesis In Extreme Environments: Responses To Different Light Regimes In The Antarctic Alga Koliella Antarctica*. Physiologia Plantarum. **153**,4: 654–67.
- Lacour, T., Larivière, J. and Babin, M., 2016. *Growth, Chl a content, photosynthesis, and elemental composition in polar and temperate microalgae*. Limnology and Oceanography. **62**: 43-58
- Lam, Daryl W., Heroen Verbruggen, Gary W. Saunders, And Morgan L. Vis. 2016. *Multigene Phylogeny Of The Red Algal Subclass Nemaliophycidae*. Molecular Phylogenetics And Evolution. **94**: 730–36.
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., Wijffels, R. H., 2012. *Carotenoid And Fatty Acid Metabolism In Nitrogen-Starved Dunaliella Salina, A Unicellular Green Microalga*. Journal Of Biotechnology. **162**,1: 21–7.
- Lampert, W. & Sommer, U. 2007. *Limnocoology*. Second Edition. Oxford University Press Inc., New York.
- Langó, Z., G.-Tóth, L., Kovács, G. And Cruz-Pizarro, L. 1999. *Identification And Biochemical Characterization Of streptomyces Galbus From The Sediment Of The High-Mountain Lake La Caldera (Sierra Nevada, Spain)*. Folia Microbiologica. **44**,6: 651-656.
- Lavoie, A., De La Noüe, J. 1985. *Hyperconcentrated Cultures Of Scenedesmus Obliquus*. Water Res. **19**,11: 1437–1442.
- Lawes, C. C., Neilan, B., M. Brown And G. Clark. 2016. *Elevated Nutrients Change Bacterial Community Composition And Connectivity: High Throughput Sequencing Of Young Marine Biofilms Biofouling: The Journal Of Bioadhesion And Biofilm Research*. **32**: 57-69.
- Lawley, B., Ripley, S., Bridge, P., Convey, P., 2004. *Molecular Analysis Of Geographic Patterns Of Eukaryotic Diversity In Antarctic Soils*. Applied And Environmental Microbiology. **70**: 5963-5972.
- Lazarus, Katherine L., And Timothy Y. James. 2015. *Surveying The Biodiversity Of The Cryptomycota Using A Targeted Pcr Approach*. Fungal Ecology. **14**.: 62–70.
- Lazzara, L., Nardello, I., Ermanni, C., Mangoni, O., Saggiomo, V., 2007. *Light Environment And Seasonal Dynamics Of Microalgae In The Annual Sea Ice At Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica*. Antarctic Science. **19**,1.
- Lee Yk, Ding Sy, Low Cs, Chang Yc, Forday Wl, Chew Pc., 1995. *Design And Performance Of An A-Type Tubular Photobi- Oreactor For Mass Cultivation Of Microalgae*. J. Appl. Phycol. **7**: 47–51.
- Lee, A.K., Lewis, D.M. And Ashman, P.J. 2009. *Microbial Flocculation, A Potentially Low-Cost Harvesting Technique For Marine Microalgae For The Production Of Biodiesel*. Journal Of Applied Phycology. **21**,5: 559–567.
- Lee, Junghyun, Eun Joo Choi, And Kitae Rhie. 2015. *Validation Of Algal Viability Treated With Total Residual Oxidant And Organic Matter By Flow Cytometry*. Marine Pollution Bulletin. **97**,1,2: 95–104.
- Lee, S J, B D Yoon, And H M Oh. 1998. *Rapid Method For The Determination Of Lipid From The Green Alga Botryococcus Braunii*. Biotechnology Techniques. **12**,7: 553–56.
- Lee, S., Dougherty, R. H., Kang, D., 2002. *Inhibitory Effects Of High Pressure And Heat On Alicyclobacillus Acidoterrestris Spores In Apple Juice Inhibitory Effects Of High Pressure And*

- Heat On Alicyclobacillus Acidoterrestris Spores In Apple Juice*. Appl Environ Microbiol. **68**, 8: 4158–4161.
- Lee, Y., 2001. *Microalgal Mass Culture Systems And Methods : Their Limitation And Potential*. **13**,4: 307–315.
- Lee, Y.C., Lee, K. and Oh, Y.K., 2015. Recent nanoparticle engineering advances in microalgal cultivation and harvesting processes of biodiesel production: a review. *Bioresource technology*, **184**, pp.63-72.
- Lee, Young-Shin, And Gee-Bong Han. 2016. *Complete Reduction Of Highly Concentrated Contaminants In Piggery Waste By A Novel Process Scheme With An Algal-Bacterial Symbiotic Photobioreactor*. Journal Of Environmental Management **177**: 202–212.
- Legendre, Louis., Courties, Claude. 2001. Flow cytometry in oceanography 1989–1999: Environmental challenges and research trends. *Cytometry* **44**: 164 –172.
- Leila Zarandi Miandooab, Mohammad B. Bagherieh-Najjar , Mohammad A. Hejazi , Nader Chaparzadeh. 2015. *Expression Analysis Of Dunaliella Salina Key Genes Involved In B-Carotene Biosynthesis Under Various Salinity And Light Conditions*. Journal of Plant Process and Function Iranin Society Of Plant Physiology. **4**, 12: 85-93.
- Lemak, S., Tchigvintsev, A., Petit, P., Flick, R., Singer, A. U., Brown, G., Evdokimova, E., 2012. *Structure And Activity Of The Cold-Active And Anion-Activated Carboxyl Esterase Olei01171 From The Oil-Degrading Marine Bacterium Oleispira Antarctica*. The Biochemical Journal. **445**,2: 193–203.
- Lemak, Sofia, Anatoli Tchigvintsev, Pierre Petit, Robert Flick, Alexander U Singer, Greg Brown, And Elena Evdokimova. 2012. *Structure And Activity Of The Cold-Active And Anion-Activated Carboxyl Esterase Olei01171 From The Oil-Degrading Marine Bacterium Oleispira Antarctica*. The Biochemical Journal. **445**,2 : 193–203.
- León-Bogarín, C., Rojas-Gutiérrez, J.M., Bertsch-Hernández., 1994. *Utilización De Cianobacterias (Algas Verde-Azules) Fijadoras De Nitrógeno Y El Helecho Acuático Azolla, Como Biofertilizantes En El Cultivo De Arroz*. **3**, Editorial San José, Euned / Euna, Costa Rica.
- Li Xin, Hu Hong-ying, Gan Ke, Sun 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 Technology*, **101**,14: 5494-5500
- Li, S., Han, D. and Row, K.H., 2012. *Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from some marine algae by response surface methodology*. Korean Journal of Chemical Engineering, **29**,5: 650-656.
- Li, W. F., Zhou, X. X. Y Lu, P., 2005. *Structural Features Of Thermozyms*. *Biotechnol Adv.* **23**: 271-281.
- Li, William K W, And A Michelle Woodt. 1988. *Vertical Distribution Of North Atlantic Ultraphytoplankton: Analysis By Flow Cytometry And Epifluorescence Microscopy*. *Deep-Sea Research*. **35**,9 : 1615–38.
- Li, X., Hu, H., Zhang, Y., 2011. *Growth And Lipid Accumulation Properties Of A Freshwater Microalga Scenedesmus Sp. Under Different Cultivation Temperature*. *Bioresource Technology*. **102**,3: 3098–102.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. And Lan, C.Q. 2008. *Effects Of Nitrogen Sources On Cell Growth And Lipid Accumulation Of Green Alga Neochloris Oleoabundans*. *Applied Microbiology And Biotechnology*. **81**,4: 629-636.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q. And Dubois-Calero, N., 2008b. *Biofuels From Microalgae*. *Biotechnol. Prog.* **24**,4: 815-820.

- Li, Yuqin, Hua Xu, Fangxin Han, Jinxiu Mu, Di Chen, Bo Feng, And Hongyan Zeng. 2014. *Regulation Of Lipid Metabolism In The Green Microalga Chlorella Protothecoides By Heterotrophy-Photoinduction Cultivation Regime*. Bioresource Technology. **192**: 781–91.
- Liang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Luo, T., Rivkin, R.B. and Jiao, N., 2017. *Distributions and relationships of virio-and picoplankton in the epi-, meso-and bathypelagic zones of the Western Pacific Ocean*. FEMS Microbiology Ecology, *93*(2), p.fiw238.
- Lim, C. L., 1991. *An Overview Of Live Feeds Production System In Singapore. Rotifer And Micro-Algae Culture System*. Proc. Us-Asia Works. Ocean Inst. Hawaii, Usa: 203- 220.
- Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., Chaffron, S., Ignacio-Espinosa, J.C., Roux, S., Vincent, F. and Bittner, L., 2015. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, *348*(6237), p.1262073.
- Lin, Q., Gu, N., Lin, J., 2012. *Effect Of Ferric Ion On Nitrogen Consumption, Biomass And Oil Accumulation Of A Scenedesmus Rubescens-Like Microalga*. Bioresource Technology. **112**: 242–7.
- Lina María González González Tesis Magister, 2010 *Influencia De La Deficiencia De Nitrógeno Y Fósforo En Las Interacciones Competitivas Entre Chlorella Vulgaris y Scenedesmus Acutus*. Departamento de Biología, Universidad de Colombia.
- Linares Cuesta, J.E.; Morales Baquero, R.; Sánchez Castillo, P. 2000. *Comparación De La Comunidad Epilítica De Dos Lagunas De Alta Montaña (La Caldera Y Río Seco, Sierra Nevada, Granada) De Diferente Régimen Hídrico*. Resúmenes X Congreso De La Asociación Española De Limnología, Valencia, P.150.
- Lincymol K.P., Gijo Ittoop, Lakshmi Devi P., Aneykutty Joseph., 2012. *Modulation In Nutritional Quality Of Microalgae, Chaetoceros Calcitrans In Different Culture Media*. Fishery Technology. **49**, 2.
- Lindstro, E.S., Forslund M., Algesten G. Bergstro, M A.K., 2006. *External Control Of Bacterial Community Structure In Lakes*. Limnology And Oceanography, **51**: 339-342.
- Liszka, M, J., Melinda E. Clark, Elizabeth Schneider, and Douglas S. Clark., 2012. *Nature Versus Nurture: Developing Enzymes That Function Under Extreme Conditions*. Annual Review Of Chemical And Biomolecular Engineering. **3**: 77-102.
- Liu, B., Zhao, Z., 2007. *Biodiesel Production By Direct Methanolysis Of Oleaginous Microbial Biomass*. J Chem Technol Biotechnol **82**: 775-780.
- Liu, J., Vanormelingen, P. and Vyverman, W., 2016. *Fatty acid profiles of four filamentous green algae under varying culture conditions*. Bioresource technology, **200**: 1080-1084.
- Liu, Y.-H., Liu, Y., Chen, Z.-S., Lian, J., Huang, X., Chung, Y.C., 2004. *Purification And Characterization Of A Novel Organophosphorus Pesticide Hydrolase From Penicillium Lilacinum Bp303*. Enzyme And Microbial Technology, **34**, 3-4: 297–303.
- Liu, Z.Y., Wang, G.C. and Zhou, B.C., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*. **99**, 11: 4717-4722.
- Lizotte, M.P. And Sullivan, C.W., 1992. *Biochemical Composition And Photosynthate Distribution In Sea Ice Microalgae Of Mc- Murdo Sound, Antarctica: Evidence For Nutrient Stress During The Spring Bloom*. Antarct. Sci. **4**: 23-30.
- Loera-Quezada, Maribel M. Y Olguin, Eugenia J., 2010. *Las Microalgas Oleaginosas Como Fuente De Biodiesel: Retos Y Oportunidades*. Revista Latinoamericana De Biotecnología Ambiental, Algal. **1** : 91-116.
- Lohman, E.J., Gardner, R.D., Pedersen, T., Peyton, B.M., Cooksey, K.E. and Gerlach, R., 2015. *Optimized inorganic carbon regime for enhanced growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris*. Biotechnology for biofuels, **8**, 1.82.

- Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J. and Soudant, P., 2015. *Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: impact on their respective fates*. Marine Chemistry, **175**: 39-46.
- López-Archilla, A.I., Marín, I., Amils, R., 2001. *Microbial Community Composition And Ecology Of An Acidic Aquatic Environment: The Tinto River Spain*. Microb. Ecol. **41**: 20-35
- López-Caballero, M.E., Pérez-Mateos, M., Montero, P., Borderías. Oyster., 2000. *Preservation By High-Pressure Treatment*. A.J. Journal Of Food Protectio. **63**, 2: 196-201.
- Lopez-Garcia, P., Philippe, H., Gail, F., And Moreira, D., 2003. *Autochthonous Eukaryotic Diversity In Hydrother- Mal Sediment And Experimental Microcolonizers At The Mid-Atlantic Ridge*. Proc Natl Acad Sci Usa **100**: 697– 702.
- Lopez-Garcia, P., Rodriguez-Valera, F., Pedros-Alio, C., And Moreira, D., 2001. *Unexpected Diversity Of Small Eukary- Otes In Deep-Sea Antarctic Plankton*. Nature **409**: 603– 607.
- Lopez-Rodas Victoria, Fernando Marvá, Edo. Costas, Antonio Flores- Moya., 2008. *Microalgal Adaption To A Stressful Enviromental (Acídica, Metal-Rich Mine Waters) Could Be Due To Selection Of Pre-Selective Mutants Originating In Non-Extreme Enviroments*. Enviromental Ad Experimental Botany. **64**, 43-48.
- Lorenz, R. T., Cysewski, G. R., 2000. *Commercial Potential For Haematococcus Microalgae As A Natural Source Of Astaxanthin*. Trends In Biotechnology. **18**, 4:160–7.
- Louw, T.M., Griffiths, M.J., Jones, S.M. And Harrison, S.T. 2016. *Techno-Economics Of Algal Biodiesel*. In Algae Biotechnology. 111-141.
- Lovett G.M. Kinsman J.D. 1990. *Atmospheric Pollutant Deposition To High-Elevation Ecosystems*. Atmospheric Environment. Part A. General Topics. **24**,11: 2767–2786.
- Lu Fan., Avigad Vonshak., Sammy Boussiba., 1994. *Effect Of Temperature And Irradiance On Growth Of Haematococcus Pluvialis (Chlorophyceae)*. Journal Of Phycology Volume **30**,5: 829–833.
- Lubian, L. M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, I. E., Sobrino, C., Gonz, M., Par, G., 2000. *Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) As Source Of Commercially Valuable Pigments*. Journal of Applied Phycology. **12**,3: 249–255.
- Lukešová A, Jiří Komárek., 1987. *Succession Of Soil Algae On Dumps From Strip Coal-Mining In The Most Region (Czechoslovakia)* Folia Geobotanica Et Phytotaxonomica. **22**, 4: 355-362
- M.E. Martínez, J.M. Jiménez, F. El Yousfi. 1999. *Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga Scenedesmus obliquus*, Bioresource Technology, **67**,3: 233-240
- Ma, F. and Hanna, M. A. 1999. *Biodiesel Production: A Review*Journal Series #12109, Agricultural Research Division, Institute Of Agriculture And Natural Resources, University Of Nebraska–Lincoln. Bioresource Technology. **70**: 1–15.
- Maccario, Lorrie, Laura Sanguino, Timothy M. Vogel, And Catherine Larose. 2015. *Snow And Ice Ecosystems: Not So Extreme*. Research In Microbiology. **166**,10: 782–95.
- Macelroy R.D. 1974. *Some Comments On The Evolution Of Extremophiles*. Biosystems, **6**: 74-75.
- Maddox, I.S. and Richert, S.H., 1977. *Production of gibberellic acid using a dairy waste as the basal medium*. Applied and environmental microbiology. **33**, 1:201-202.
- Madern, D., Ebel, C., Zaccai, G., 2000. *Halophilic Adaptation Of Enzymes*. Extremophiles : Life Under Extreme Conditions. **4**,2: 91–8.
- Madigan M, T., 2003. *Anoxygenic Phototrophic Bacteria From Extreme Environments*. Photosynthesis Research **76**: 157–171.
- Magnuson, J.J., Robertson, D.M., Benson, B.J., Wynne, R.H., Livingstone, D.M., Arai, T., Assel, R.A., Barry, R.G., Card, V., Kuusisto, E., Granin, N.G., Prowse, T.D., Stewart K.M. And Vuglinski.

- V.S., 2000. *Historical Trends In Lake And River Ice Cover In The Northern Hemisphere*. Science, **289**: 1743-1746.
- Mallick, N., 2002. *Biotechnological Potential Of Immobilized Algae For Wastewater N, P And Metal Removal: A Review*. Biometals. **15**: 377–390
- Manchanda, T., Tyagi, R. And Sharma, D.K. 2016. *Application Of Nutrient Stress Conditions For Hydrocarbon And Oil Production By Botryococcus Braunii*. Biofuels. 1-10.
- Mandal, S. and Mallick, N., 2009. *Microalga Scenedesmus obliquus as a potential source for biodiesel production*. Applied microbiology and biotechnology. **84**, 2:281-291.
- Mandik, Y.I., Cheirsilp, B., Boonsawang, P. And Prasertsan, P. 2015. *Optimization Of Flocculation Efficiency Of Lipid-Rich Marine Chlorella Sp. Biomass And Evaluation Of Its Composition In Different Cultivation Modes*. Bioresource Technology. **182**: 89-97.
- Mandotra, S.K., Kumar, P., Suseela, M.R., Nayaka, S. And Ramteke, P.W. 2016. *Evaluation Of Fatty Acid Profile And Biodiesel Properties Of Microalga Scenedesmus Abundans Under The Influence Of Phosphorus, Ph And Light Intensities*. Bioresource Technology. **201**: 222-229.
- Mansour, M.P., Frampton, D.M., Nichols, P.D., Volkman, J.K. and Blackburn, S.I., 2005. *Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: applications and unusual C 24–C 28 polyunsaturated fatty acids*. Journal of Applied Phycology, **17**,4: 287-300.
- Mao, Y., Yin, Y., Zhang, L., Alias, S.A., Gao, B. and Wei, D., 2015. *Development of a novel Aspergillus uracil deficient expression system and its application in expressing a cold-adapted α -amylase gene from Antarctic fungi Geomyces pannorum*. Process Biochemistry. **50**,10: 1581-1590.
- Marande, W., López-García, P., Moreira, D., 2009. *Eukaryotic Diversity And Phylogeny Using Small- And Large-Subunit Ribosomal Rna Genes From Environmental Samples*. Environmental Microbiology. **11**,12: 3179–88.
- Maranesi, M., Barzanti, V., Carenini, G. And Gentili, P., 1983. *Nutritional Studies On Spirulina Maxima*. Acta Vitaminologica Et Enzymologica. **6**, 4: 295-304.
- Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., Marchetti, P., 2002. *Study Of Mitochondrial Membrane Potential, Reactive Oxygen Species, Dna Fragmentation And Cell Viability By Flow Cytometry In Human Sperm*. Human Reproduction (Oxford, England). **17**,5: 1257–65.
- Marek Stibal, Josef Elster, Marie Šabacká, Klára Kaštovská., 2007. *Seasonal And Diel Changes In Photosynthetic Activity Of The Snow Alga Chlamydomonas Nivalis (Chlorophyceae) From Svalbard Determined By Pulse Amplitude Modulation Fluorometry*. Fems Microbiology Ecology. **59**,2: 265–273.
- Margesin, R. and Schinner, F., 1999. In: *Biotechnological Applications of cold adopted organisms*. (Eds. Margesin, R. and Schinner, F. Springer. 271-289.
- Margesin, R., 2003. *Pedobacter Cryoconitis Sp. Nov., A Facultative Psychrophile From Alpine Glacier Cryoconite*. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. **53**,5 : 1291–1296.
- Margesin, R., Feller, G., Gerday, C. and Russell, N., 2002. In: *The Encyclopedia*
- Margesin, Rosa, And Vanya Miteva. 2011. *Diversity And Ecology Of Psychrophilic Microorganisms*. Research In Microbiology. **162**,3: 346–61.
- Margesin, Rosa., Vanya Miteva., 2010. *Diversity And Ecology Of Psychrophilic Microorganisms*. Research In Microbiology. **162**, 3: 346–361
- Martínez S, R., 1977. *Phytoplankton Species, Biomass And Diversity In Lake La Caldera (Spain)*. Acta Hydrobiologica **19**,2 : 95-107.
- Martinez, M E, Sanchez S. Jimenez.J.M, El Yousfi, F, Muñoz, L., 2000. *Nitrogen And Phosphorus Removal From Urban Wastewater By The Microalga Scenedesmus Obliquus*. Bioresource Technology. **73**: 263–272.

- Martínez, R. 1975. *First Report On The Limnology Of The Alpine Lake La Caldera In The Penibetic Mountains (Sierra Nevada, Granada, Spain)*. Verhandlungen Des Internationalen Verein. Limnologies, **19**: 1133-1139.
- Martínez-Roldán, A.J., Perales-Vela, H.V., Cañizares-Villanueva, R.O. and Torzillo, G., 2014. *Physiological response of Nannochloropsis sp. to saline stress in laboratory batch cultures*. Journal of applied phycology. **26**.1:115-121.
- Mata, T.M., Martins, A.A. And Caetano, N.S. 2010. *Microalgae For Biodiesel Production And Other Applications: A Review*. Renewable And Sustainable Energy Reviews. **14**, 1: 217–232.
- Matamoros, Víctor, And Yolanda Rodríguez. 2016. *Batch Vs Continuous-Feeding Operational Mode For The Removal Of Pesticides From Agricultural Run-Off By Microalgae Systems: A Laboratory Scale Study*. Journal Of Hazardous Materials. **309**: 126–32.
- Maurya, R. 2016. *Hydrolysate Of Lipid Extracted Microalgal Biomass Residue: An Algal Growth Promoter And Enhancer*. Bioresource Technology. **207**: 197–204.
- Maurya, R. 2016. *Lipid Extracted Microalgal Biomass Residue As A Fertilizer Substitute For Zea Mays L*. Frontiers In Plant Science. **6**: 1–10.
- Maxwell, D. P., Falk, S., Trick, C. G., & Huner, N. P. 1994. *Growth at low temperature mimics high-light acclimation in Chlorella vulgaris*. Plant Physiology, **105**,2: 535-543.
- McMullan, C.R. and Vaeth, C.L., 2015. *Lipid Content of Various Microalgal Species found in Lake Lanier*. Conferences. Ungarc. 20th Annual Arc. Dahlenega. **33**
- Medina-Sánchez, J. M., Villar-Argaiz, M., Cruz-Pizarro, L. And Carrillo, P. 1999. *Structure Changes In A Planktonic Food Web: Biotic And Abiotic Controls*. Journal Of Limnology. **58**: 213-222.
- Medina-Sánchez, J.M., Villar-Argaiz, M. and Carrillo, P., 2004. *Neither with nor without you: a complex algal control on bacterioplankton in a high mountain lake*. Limnology and Oceanography. **49**,5: 1722-1733.
- Medlin L. K., Lange M., Baumann M. E. M., 1994 - *Genetic Differ- Entiation Among Three Colony-Forming Species Of Phaeocystis: Further Evidence For The Phylogeny Of The Prymnesiophyta*. Phy- Cologia. **33**: 199-212.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., Sogin, M. L., 1988. *The Characterization Of Enzymatically Amplified Eukaryotic 16s-Like Rrna-Coding Regions*. Gene. **71**, 2: 491–499.
- Mehlitz, T.H., 2009. *Temperature influence and heat management requirements of microalgae cultivation in photobioreactors*. Doctoral dissertation, California Polytechnic State University, San Luis Obispo.
- Melinda Griffiths, Harrison, S.T.L. and Smit, M., 2016. *Algae Biotechnology*,
- Melis, A., Happe, T., 2001. *Update On Hydrogen Production Hydrogen Production . Green Algae As A Source Of Energy*. **1**: 740–748.
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P. and Palavra, A.F., 2003. *Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae*. Inorganica Chimica Acta. **356**: 328-334.
- Mendiola, J.A., Santoyo, S., Cifuentes, A., Reglero, G., Ibáñez, E. and Señoráns, F.J., 2008. *Antimicrobial activity of sub-and supercritical CO2 extracts of the green alga Dunaliella salina*. Journal of food protection. **71**,10: 2138-2143.
- Mendoza, P. H., Cedres, C. M., Jara, A. De, Nordström, L., Carmona, K. F. L., 2008. *Variación Cuantitativa Y Cualitativa De La Composición En Ácidos Grasos De Cryptocodium Cohnii En Condiciones De Supresión De Nitrógeno*. Grasas y Aceites. **59**,1 : 27–32.
- Meng, X., Yang, J. M., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. J. And Xian, M., 2009. *Biodiesel Production From Oleaginous Microorganisms*. Renew. Energy **34**, 1: 1-5.

- Mennaa, F, Z, Zouhayr Arbib, And José Antonio Perales. 2015. *Urban Wastewater Treatment By Seven Species Of Microalgae And An Algal Bloom: Biomass Production, N And P Removal Kinetics And Harvestability*. Water Research. **83**: 42–51.
- Mercer, P. And Armenta, R.E. 2011. *Developments In Oil Extraction From Microalgae*. European Journal Of Lipid Science And Technology. **113**, 5: 539–547.
- Metting F.B Jr., 1996. *Biodiversity And Application Of Microalgae*. Pacific, Battelle National, Northwest. 477–489.
- Meusnier, I., Valero, M., Olsen, J. L. Stam, W.T., 2004. *Analysis Of Rdna Its1 Indels In Caulerpa Taxifolia (Chlorophyta) Supports A Derived, Incipient Species Status For The Invasive Strain*. Eur. J. Phycol. **39**: 83–92.
- Miandoob Z, L., Bagherieh-Najjar, M.B., Hejazi, M.A. And Chaparzadeh, N. 2015. *Expression Analysis Of Dunaliella Salina Key Genes Involved In B-Carotene Biosynthesis Under Various Salinity And Light Conditions*. Journal Of Plant Process And Function. **4**, 12: 85-93.
- Miao, X. and Wu, Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource technology. **97**, 6: 841-846.
- Michel Gosselin, Louis Legendre, Jean-Claude Therriault, Serge Demers., 2004. *Light And Nutrient Limitation Of Sea-Ice Microalgae (Hudson Bay, Canadian Arctic)*. Journal Of Phycology. **26**, 2: 220–232.
- Michelon, W., Da Silva, M.L.B., Mezzari, M.P., Pirolli, M., Prandini, J.M. And Soares, H.M.2015. *Effects Of Nitrogen And Phosphorus On Biochemical Composition Of Microalgae Polyculture Harvested From Phycoremediation Of Piggery Wastewater Digestate*. Applied Biochemistry And Biotechnology. 1-13.
- Milano, J. 2016. *Microalgae Biofuels As An Alternative To Fossil Fuel For Power Generation*. Renewable And Sustainable Energy Reviews. **58**: 180–197.
- Millao, S. & Uquiche, E., 2016. *Extraction of oil and carotenoids from pelletized microalgae using supercritical carbon dioxide*. The Journal of Supercritical Fluids. **116**: 223-231.
- Miller, A. Z., Laiz, L., Dionísio, A., Macedo, M. F., Saiz-Jimenez, C., 2009. *Growth Of Phototrophic Biofilms From Limestone Monuments Under Laboratory Conditions*. International Biodeterioration Biodegradation. **63**,7: 860–867.
- Miller, A. Z., Laiz, L., Gonzalez, J. M., Dionísio, A., Macedo, M. F., Saiz-Jimenez, C., 2008. *Reproducing Stone Monument Photosynthetic-Based Colonization Under Laboratory Conditions*. The Science Of The Total Environment. **405**, 1-3: 278–85.
- Minhas, Amritpreet Kaur, Peter Hodgson, Colin J. Barrow, Burla Sashidhar, And Alok Adholeya. 2016. *The Isolation And Identification Of New Microalgal Strains Producing Oil And Carotenoid Simultaneously With Biofuel Potential*. Bioresource Technology. **211**: 556–65.
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C. And Gouveia, L. 2012. *Bioethanol Production From Scenedesmus Obliquus Sugars: The Influence Of Photobioreactors And Culture Conditions On Biomass Production*. Applied Microbiology And Biotechnology. **96**,2: 555–564.
- Mladenov, N.; Sommaruga, R.; Morales-Baquero, R.; Laurion, I.; Camarero, L.; Dieguez, M.C.; Camacho, A.; Delgado, A.; Torres, O.; Chen, Z.; Felip, M. Reche, I., 2011. *Dust Inputs And Bacteria Influence Dissolved Organic Matter In Clear Alpine Lakes*. Nature Communications. **2**, 405: 1-7.
- Moal, J., Martin-Jezequel, V., Harris, R.P., Samain, J.F. and Poulet, S.A., 1987. *Interspecific and intraspecific variability of the chemical-composition of marine-phytoplankton*. Oceanologica acta. **10**, 3: 339-346.
- Moal, J., Samain, J.-F., Le Oz, J.R., 1979. *C:N Et Controle De La Physiologie Des Cultures De Phytoplankton*, 2: 393.

- Mock T, Hock H., 2005. *Long-Term Temperature Acclimation Of Photosynthesis In Steady-State Cultures Of The Polar Diatom Fragilariopsis Cylindrus*. *Photosyn Res.* **85**: 307–317.
- Moheimani, N. 2013. *Long-Term Outdoor Growth And Lipid Productivity Of Tetraselmis Suecica, Dunaliella Tertiolecta And Chlorella Sp. (Chlorophyta) In Bag Photobioreactors*. *J. Appl. Phycol.* **25**, 1: 167–176.
- Moheimani, N.R., 2016. Tetraselmis suecica culture for CO₂. *Journal of Applied Phycology.* **28**, 4: 2139–2146.
- Monisha, L.M., Raj, R.E., Kings, A.J. and Visvanathan, M.A., 2016. *Identification and characterization of a novel biodiesel producing halophilic Aphanothece halophytica and its growth and lipid optimization in various media*. *Energy Conversion and Management. In press*
- Montiel-Martínez, A., Ciro-Pérez, J. and Corkidi, G., 2015. *Littoral zooplankton–water hyacinth interactions: habitat or refuge?*. *Hydrobiologia*, **755**, 1: 173-182.
- Morais, M. De, Vaz, B. And Morais, E. De, 2015. *Biologically Active Metabolites Synthesized By Microalgae*. Biomed Research. 2015.
- Morales-Baquero R. Y Conde-Porcuna, J.M.. 2000. *Effect Of The Catchment Areas On The Abundance Of Zooplankton In High Mountain Lakes Of The Sierra Nevada (Spain)*. *Verhandlungen Des Internationalen Verein. Limnologies.* **27**: 1804-1808.
- Morales-Baquero, R. and Conde-Porcuna, J.M., 2001. *Effect of the catchment areas on the abundance of zooplankton in high mountain lakes of the Sierra Nevada (Spain)*. *Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen.* **27**, 4: 1804-1808.
- Morales-Baquero, R., Carrillo, P., Reche, I. And Sanchez-Castillo, P. 1999. *The Nitrogen : Phosphorus Relationship In High Mountain Lakes: Effects Of The Size Of Catchment Basins*. *Canadian Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences.* **56**: 1809–1817.
- Morales-Baquero, R., Carrillo, P., Cruz-Pizarro, L. Y Sánchez-Castillo, P. 1992. *Southernmost High Mountain Lakes In Europe (Sierra Nevada) As Reference Sites For Pollution And Climate Change Monitoring*. *Limnetica.* **8**: 39-47.
- Morales-Baquero, R., Pulido-Villena, E., Reche, I. 2006. *Atmospheric Inputs Of Phosphorus And Nitrogen To The Southwest Mediterranean Region: Biogeochemical Responses Of High Mountain Lakes*. *Limnology And Oceanography.* **51**,2: 830-837.
- Morgan-Kiss Rm, Priscu Jc, Pocock T, Gu Dynaite-Savitch L, Hüner Np. 2006. *Adaptation And Acclimation Of Photosynthetic Microorganisms To Permanently Cold Environments*. *Microbiol Mol Biol R.* **70**: 222-252
- Morgan-Kiss, R. M., Ivanov, A. G., Modla, S., Czymbek, K., Hüner, N. P. A, Priscu, J. C., Lisle, J. T., 2008. *Identity And Physiology Of A New Psychrophilic Eukaryotic Green Alga, Chlorella Sp., Strain Bi, Isolated From A Transitory Pond Near Bratina Island, Antarctica*. *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions.* **12**,5: 701–11.
- Morgan-Kiss, R.M., Ivanov, A.G., Pocock, T., Król, M., Gudynaite-Savitch, L. and Hüner, N., 2005. *The Antarctic Psychrophile, Chlamydomonas Raudensis Ettl (Uwo241)(Chlorophyceae, Chlorophyta), Exhibits A Limited Capacity To Photoacclimate To Red Light*. *Journal of phycology.* **41**, 4: 791-800.
- Morgan-Kiss, Rachael M., Alexander G. Ivanov, Shannon Modla, Kirk Czymbek, Norman P, John C. Priscu, John T. Lisle, and Thomas E. Hanson. 2008. *Identity And Physiology Of A New Psychrophilic Eukaryotic Green Alga, Chlorella Sp., Strain Bi, Isolated From A Transitory Pond Near Bratina Island, Antarctica*. *Extremophiles.* **12**,5 : 701–11.
- Moriarty, D.J. Y A.C. Hayward., 1982. *Ultrastructure Of Bacteria And The Proportion Of Gram-Negative Bacteria In Marine Sediments*. *Microb. Ecol.* **8**: 1-14.

- Moronta, R., Morales, R. M. E., 2006. *Respuesta de la microalga Chlorella sorokiniana al Ph, Salinidad Y Temperatura En Condiciones Axénicas Y No Axénicas*. Resumen Introducción. Rev. Fac. Agron. **23**, 1: 27–41.
- Morris, H.J., Carrillo, O.V., Alonso, M.E., Bermúdez, R.C., Almarales, Á., Llauradó, G., Lebeque, Y. and Fontaine, R., 2011. *Oral administration of an enzymatic protein hydrolysate from the green microalga Chlorella vulgaris enhances the nutritional recovery of malnourished mice*. Journal of medicinal food. **14**, 12: 1583-1589.
- Mortezaeikia, V, R Yegani, M A Hejazi, and S Chegini. 2016. *CO₂ Biofixation By Dunaliella Salina In Batch And Semi-Continuous Cultivations, Using Hydrophobic And Hydrophilic Poly Ethylene (Pe) Hollow Fiber Membrane Photobioreactors*. Iranian Journal of Chemical Engineering. **13**,1 : 47–59.
- Mosé, R., Ciaramella, M., Cannio, R., Pisani, F.M., Moraca, M. And Batolucci, S., 2002. *Extremophiles*. J. Bacteriol. **185**: 3683-3689.
- Mosqueda-Cano, G. and Gutiérrez-Corona, J.F., 1995. Environmental and developmental regulation of carotenogenesis in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Current Microbiology*, **31**, 3: 141-145.
- Moulin C, Chiapello I. 2006. *Impact Of Human-Induced Desertification On The Intensification Of Sahel Dust Emission And Export Over The Last Decades*. Geophysical Research Letters. **33**: 1-5.
- Muntean, E., Muntean, N., Dragoş, N., Bercea, V., 2007. *Carotenoids As Biomarkers In Botryococcus Braunii Algae Carotenoid - Biomarkeri În Alga Botryococcus Braunii*. 49–54.
- Muntyan M, Popova I, Bloch D, Skripnikova E, Ustiyan V., 2005. *Energetics Alkalophilic Representatives Of The Genus Bacillus*. Biochemistry. **70**: 137-142.
- Muradov, N., Taha, M., Miranda, A.F., Wrede, D., Kadali, K., Gujar, A., Stevenson, T., Ball, A.S. And Mouradov, A. 2015. *Fungal-Assisted Algal Flocculation: Application In Wastewater Treatment And Biofuel Production*. Biotechnology For Biofuels. **8**,1: 1.
- Muyzer, G., 1999. *DGGE-TGGE A Method For Identifying Genes From Natural Ecosystems*. Curr Opin Microbiol. **2**,3: 317-22.
- Naciones Unidas, 1992. *Convención Marco De Las Naciones Unidas Sobre El Cambio Climático*.
- Nagai, Satoshi, Kohsuke Hida, Shingo Urusizaki, Yoshihito Takano, Yuki Hongo, Takahiko Kameda, And Kazuo Abe. 2015. *Massively Parallel Sequencing-Based Survey Of Eukaryotic Community Structures In Hiroshima Bay And Ishigaki Island*. Gene. **576**,2 : 681–89.
- Naghdi, F.G., 2015. *Enhancement Of Microalgae Lipid Extraction Efficiency For Biodiesel Production*. Tesis Doctoral. School of Agriculture and Food Sciences. The University of Queensland.
- Naira Jg. , 1991. *Solutions, Emulsions, Suspensions And Extractives*. Remington'S Pharmaceutical Sciences. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1492-1517.
- Najafabadi, A.H., Malekzadeh, M., Jalilian, F., Vossoughi, M., And Pazuki, G. 2015. *Effect Of Various Carbon Sources On Biomass And Lipid Production Of Chlorella Vulgaris During Nutrient Sufficient And Nitrogen Starvation Conditions*. Bioresour. Technol. **180**: 311–317.
- Nakada, Takashi, Masaru Tomita, Jiunn-Tzong Wu, And Hisayoshi Nozaki. 2016. *Taxonomic Revision Of Chlamydomonas Subg. Amphichloris (Volvocales, Chlorophyceae), With Resurrection Of The Genus Dangeardinia And Descriptions Of Ixipapillifera Gen. Nov. And Rhysamphichloris Gen. Nov.* Journal Of Phycology. **52**, 2: 283–304.
- Nalder, T.D., Miller, M.R. And Packer, M.A. 2015. *Changes In Lipid Class Content And Composition Of Isochrysis Sp. (T-Iso) Grown In Batch Culture*. Aquaculture International. **23**, 5: 1293–1312.
- Nam, Sun Hwa, And Youn Joo An. 2015. *Cell Size And The Blockage Of Electron Transfer In Photosynthesis: Proposed Endpoints For Algal Assays And Its Application To Soil Alga Chlorococcum Infusioformis*. Chemosphere. **128**: 85–95.
- Nancuqueo, I., Barrie Johnson, D., 2012. *Acidophilic Algae Isolated From Mine-Impacted Environments And Their Roles In Sustaining Heterotrophic Acidophiles*. Frontiers In Microbiology. **3**: 325.

- Nancuqueo, I., Johnson, D. B., 2012. *Selective Removal Of Transition Metals From Acidic Mine Waters By Novel Consortia Of Acidophilic Sulfidogenic Bacteria*. Microbial Biotechnology. **5**,1: 34–44.
- Nauwerck, A. 1994. *A Survey On Water Chemistry And Plankton In High Mountain Lakes In Northern Swedish Lapland*. Hydrobiologia, **274**: 91-100.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., 2001. *Taxonomic Study Of Aerobic Thermophilic Bacilli : Descriptions Of Geobacillus Subterraneus Gen . Nov ., Sp . Nov . And Geobacillus Uzenensis Sp . Nov . From Petroleum Reservoirs And Transfer Of Bacillus Stearothermophilus , Bacillus Thermo-Catenulatus , Bacillus Thermoleovorans , Bacillus Kaustophilus , Bacillus Thermoglucosidasius And Bacillus Thermodenitrificans To Geobacillus As The New Combinations G . Stearothermophilus , G . Thermocatenulatus , G . Thermoleovorans , G . Kaustophilus , G . Thermoglucosidasius And G . Thermodenitrificans*. Int J. Syst Evol Microbiol. **51**, 2: 433–446.
- Neidhardt, F.C. ed., 1987. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington, DC: American Society for Microbiology. **2**: 1334-1345.
- Neves, V.T.D.C., Andrade, E. And Perelo, L.W. 2016. *Influence Of Lipid Extraction Methods As Pre-Treatment Of Microalgal Biomass For Biogas Production*. Renewable And Sustainable Energy Reviews. **59**: 160–165.
- Nguyen, A., Tran, D., Ho, M., Louime, C., Tran, H. and Tran, D., 2016. High light stress regimen on Dunaliella salina strains for carotenoids induction.
- Niro, E., R. Marzaioli, S. De Crescenzo, B. D'abrosca, S. Castaldi, A. Esposito, A. Fiorentino, And F. A. Rutigliano. 2016. *Effects Of The Allelochemical Coumarin On Plants And Soil Microbial Community*. Soil Biology And Biochemistry. **95**. 30–39.
- Nishiguchi, M. K., Doukakis, P., Egan, M., Kizirian, D., Phillips, A., Prendini, L., Rosenbaum, H. C., 2002. *Dna Isolation Procedures*.
- Nogi, Yuichi, And Chiaki Kato. 1999. *Taxonomic Studies Of Extremely Barophilic Bacteria Isolated From The Mariana Trench And Description Of Moritella Yayanosii Sp. Nov., A New Barophilic Bacterial Isolate*. Extremophiles **3**,1: 71–77.
- Nogueira, M. G., 2001. *Zooplankton Composition , Dominance And Abundance As Indicators Of Environmental Compartmentalization In Jurumirim Reservoir (Paranapanema River)*, São Paulo , Brazil, 1–18.
- Nozomu T, Kohshima. S., 2004. *A Snow Algal Community On Tyndall Glacier In The Southern Patagonia Icefield, Chile*. Arctic, Antarctic, and Alpine Research Volume **36**: 92-99
- Odate, T. and Fukuchi, M., 2004. *Temporal changes in chlorophyll a and nitrate concentrations under fast ice near Syowa Station, Antarctica, in austral summer*. Antarctic Record. **48**,3:157-164.
- Oeding, Sue, And Kathryn H. Taffs. 2015. *Are Diatoms A Reliable And Valuable Bio-Indicator To Assess Sub-Tropical River Ecosystem Health?* Hydrobiologia. **758**, 1: 151–69.
- Okauchi M., 1991. *The Status Of Phytoplankton Production In Japan*. Rotifiers And Microalgae Culture Systems, Proceedings Of Aus E Asia Workshop. Honolulu, Hi: The Oceanic Institute: 247-256.
- Okibe, N., Koga, M., Sasaki, K., Hirajima, T., Heguri, S., Asano, S., 2012. *Simultaneous Oxidation And Immobilization Of Arsenite From Refinery Waste Water By Thermoacidophilic Iron-Oxidizing Archaeon, Acidianus Brierleyi*. Minerals Engineering. **48**: 126–134
- Oren, A., 2002. *Molecular Ecology Of Extremely Halophilic Archaea And Bacteria*. Fems Microbiology Ecology. **39**,1 : 1–7.
- Ortiz Montoya, E.Y., Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Perego, P., Converti, A. and de Carvalho, J.C.M., 2014. *Production of Chlorella vulgaris as a source of essential fatty acids in a tubular photobioreactor continuously fed with air enriched with CO2 at different concentrations*. Biotechnology progress. **30**,4: 916-922.

- Otero, A., Garcia, D., Morales, E.D., Aran, J., Fabregas, J., 1997. *Manipulation Of The Biochemical Composition Of Eicosapentaenoic Acid-Rich Microalga Isochrysis Galbana In Semicontinuous Cultures*. *Biotechnol. Appl. Bioc.* **26**: 171–177.
- Paau, A.S., Cowles, J.R. and Oro, J., 1977. *Flow-microfluorometric analysis of Escherichia coli, Rhizobium meliloti, and Rhizobium japonicum at different stages of the growth cycle*. *Canadian journal of microbiology*. **23**,9: 1165-1169.
- Pacheco, Juan Manuel, Cadena, M. A., Sanchez, M., Tovar, D., Rangel, C., 2010. *Effect Of Culture Medium And Nutrient Concentration On Fatty Acid Content Of Chaetoceros Muelleri* . *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* **1**:6-15
- Padmanabhan, A. R. M., Stanley, S. A., 2012. *Microalgae As An Oil Producer For Biofuel Applications*. **1**,3: 57–62.
- Paes, C.R., Faria, G.R., Tinoco, N.A., Castro, D.J., Barbarino, E. and Lourenço, S.O., 2016. *Growth, nutrient uptake and chemical composition of Chlorella sp. and Nannochloropsis oculata under nitrogen starvation/Crecimiento, absorción de nutrientes y composición química de Chlorella sp. y Nannochloropsis oculata bajo carencia de nitrógeno*. *Latin American Journal of Aquatic Research*. **44**, 2: 275.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. and Boussiba, S., 2011. *The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by Nannochloropsis sp.* *Applied microbiology and biotechnology*. **90**,4: 1429-1441.
- Palou, E., Swanson, B. G., Lo, A., 1997. *High Hydrostatic Pressure As A Hurdle For Zygosaccharomyces Bailii Inactivation*. **62**,4: 855–857
- Pan, H., Culp, R.A. and Sun, M.Y., 2017. *Influence of physiological states of Emiliana huxleyi cells on their lipids and associated molecular isotopic compositions during microbial degradation*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **488**: 1-9.
- Pan, Y. And A.D. Cembella., 1998. *Flow Cytometric Determination Of Cell Cycles And Growth Rates Of Prorocentrum Spp.* *Harmful Algae. Xunta De Galicia And Intergovernmental Oceanographic Commission Of Unesco*. 173-176
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S.K., Ghosh, A. And Mishra, S. 2015. *Salinity Induced Oxidative Stress Enhanced Biofuel Production Potential Of Microalgae Scenedesmus Sp. Ccnm 1077*. *Bioresource Technology*. **189**: 341-348.
- Paranjape, K., Leite, G.B. And Hallenbeck, P.C. 2016. *Strain Variation In Microalgal Lipid Production During Mixotrophic Growth With Glycerol*. *Bioresource Technology*, **204**: 80–88.
- Pascale Mentré, Gaston Hui Bon Hoa., 2001. *Effects Of High Hydrostatic Pressures On Living Cells: A Consequence Of The Properties Of Macromolecules And Macromolecule-Associated Water*. *International Review Of Cytology* **201**: 1–84.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H. R., 2006. *Fatty Acid Composition Of 12 Microalgae For Possible Use In Aquaculture Feed*. *Aquaculture International*, **15**,1: 1–9.
- Pedrés-Alió, Carlos, Marianne Potvin, And Connie Lovejoy. 2015. *Diversity Of Planktonic Microorganisms In The Arctic Ocean*. *Progress In Oceanography*. **139**: 233–43.
- Pedroza, A. M., 2001. *Aislamiento Y Caracterización De Dos Cepas De Thermus Sp. Con Actividad Amilolítica Termoestable*. Tesis De Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad De Ciencias. Departamento De Microbiología. Bogotá. Colombia.
- Pedrozo, Fernando And, Mónica Mabel Diaz, P. F. Temporetti, Gustavo Daniel Baffico, And Sara Guadalupe Beamud. 2010. *Características Limnológicas De Un Sistema Ácido: Río Agrío-Lago Caviahue, Provincia Del Neuquén, Argentina*. *Ecologia Austral* **20**,2 : 173–84.
- Pelczar, M. J., E. Chan, And N. R. Krieg., 1986. *Microbiology*, 5th Ed. Mcgraw-Hill Publishing Company, New York, N.Y.

- Pelin, Marco, Silvio Sosa, Sabrina Pacor, Aurelia Tubaro, And Chiara Florio. 2014. *The Marine Toxin Palytoxin Induces Necrotic Death In Hacat Cells Through A Rapid Mitochondrial Damage*. Toxicology Letters. **229**: 440–50.
- Pembroke, J Tony, Balakrishnan Naveena, And Patricia Armshaw., 2016. *The Potential Of The Photoautotroph Synechocystis For Metal Bioremediation*. Advances In Bioremediation Of Wastewater And Polluted Soil. **3,5** :51–72.
- Peng, L.H., Unnikrishnan, B., Shih, C.Y., Hsiung, T.M., Chang, J., Hsu, P.H., Chiu, T.C. and Huang, C.C., 2016. *Identification of Microalgae by Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Coupled with Multiple Nanomatrices*. Marine Biotechnology. **18**, 2: 283-292.
- Pérez, L., Salgueiro, J.L., Maceiras, R., Cancela, Á. And Sánchez, Á. 2016. *Study Of Influence Of Ph And Salinity On Combined Flocculation Of Chaetoceros Gracilis Microalgae*. Chemical Engineering Journal. **286**: 106-113.
- Pérez, L.D.V., Macías Abraham, C., Torres Leyva, I., Socarrás Ferrer, B.B., Marsán Suárez, V. And Sánchez Segura, M. 2002. *Efecto In Vitro De La Espirulina Sobre La Respuesta Inmune*. Revista Cubana De Hematología, Inmunología y Hemoterapia, **18**, 2.
- Pérsico, M. M., Moris, M., Tranier, E. D., Zanazzi, A. N., Arturo, A., Beligni, M., Nacional, U. T., Et Al., 2011. *Evaluación De Un Sistema Exterior De Cultivo Masivo De La Microalga Marina Nannochloropsis Oculata , En Una Zona Templada Oceánica De Argentina*. Resumen Evaluation Of An Outdoor Mass Culture System Of The Marine Microalga Abstract N° 2.
- Petrescu, C.M., Turcus, V., Mihali, C.V., Stana, I.O. and Bratosin, D., 2016. DEVELOPMENT BY FLOW CYTOMETRY OF BIOASSAYS BASED ON CHLORELLA FOR ENVIRONMENTAL MONITORING. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*, **26**: 2.
- Philippis, R. De, Sili, C., Paperi, R., Vincenzini, M., 2001. *Exopolysaccharide-Producing Cyanobacteria And Their Possible Exploitation : A Review*. Journal of Applied Phycology **13,4** :293–299.
- Philippis, R., Vincenzini, M., 1998. *Exocellular Polysaccharides From Cyanobacteria And Their Possible Applications*. Fems Microbiology Reviews, **22**, 3: 151–175.
- Phillips, N., Smith, C.M. Morden, C.W., 2001. *An Effective DNA Extraction Protocol For Brown Algae*. Phycol. Res. **49** :97–102.
- Pickard, G., 2015. *Growing Biofuel Outdoors In Seattle: Effects Of Natural Light Level And Temperature On Marine Microalgal Culture Density And Lipid Content In Contained Natural Exposure Systems*. Tesis Doctoral. University Of Washington. School Of Oceanography.USA.
- Piemonte, V., Di Paola, L., Iaquaniello, G. And Prisciandaro, M. 2016. *Biodiesel Production From Microalgae: Ionic Liquid Process Simulation*. Journal Of Cleaner Production. **111**: 62-68.
- Piorreck, M., Baasch, K.-H., Pohl, P., 1984. *Biomass Production, Total Protein, Chlorophylls, Lipids And Fatty Acids Of Freshwater Green And Blue-Green Algae Under Different Nitrogen Regimes*. Phytochemistry. **23**, 2: 207–216.
- Plum, C., Hüsener, M. and Hillebrand, H., 2015. Multiple vs. single phytoplankton species alter stoichiometry of trophic interaction with zooplankton. *Ecology*. **96**, 11: 3075-3089.
- Pocock, T. H., Koziak, A., Rosso, D., Falk, S., Hüner, N. P. A., 2007. *Chlamydomonas Raudensis (Uwo 241), Chlorophyceae, Exhibits The Capacity For Rapid D1 Repair In Response To Chronic Photoinhibition At Low Temperature*. 1. Journal Of Phycology. **43**, 5 : 924–936.
- Pocock, T., Lachance, M.-A., Pröschold, T., Priscu, J. C., Kim, S. S., Huner, N. P. A., 2004. *Identification Of A Psychrophilic Green Alga From Lake Bonney Antarctica: Chlamydomonas Raudensis Ettl. (Uwo 241) Chlorophyceae*. Journal Of Phycology. **40**, 6: 1138–1148.
- Pocock, Tessa H., Alexandra Koziak, Dominic Rosso, Stefan Falk, And Norman P A Hüner. 2007. *Chlamydomonas Raudensis (Uwo 241), Chlorophyceae, Exhibits The Capacity For Rapid D1*

- Repair In Response To Chronic Photoinhibition At Low Temperature*. Journal Of Phycology. **43**, 5 : 924–36.
- Pocock, Tessa, Adrien Vetterli, And Stefan Falk. 2011. *Evidence For Phenotypic Plasticity In The Antarctic Extremophile Chlamydomonas Raudensis Ettl. Uwo 241*. Journal Of Experimental Botany. **62**, 3: 1169–77.
- Pocock, Tessa., Vetterli, A., Huner, N.P.A., Falk, Stefan., 2005. *Changes In Salinity Impacts Growth, Photochemistry And Photoinhibition In The Antarctic Psychrophile Chlamydomonas Raudensis Uwo 241*. Proceedings Of The 3rd International Conference On Plants And Environmental Pollution. Lucknow, India.
- Ponomarenko, L. P., Stonik, I. V, Aizdaicher, N. A, Orlova, T. Y., Popovskaya, G. I., Pomazkina, G. V, Stonik, V. A., 2004. *Sterols Of Marine Microalgae Pyramimonas Cf. Cordata (Prasinophyta), Attheya Ussurensis Sp. Nov. (Bacillariophyta) And A Spring Diatom Bloom From Lake Baikal. Comparative Biochemistry And Physiology*. Part B, Biochemistry & Molecular Biology. **138**, 3: 65–70.
- Pratoomyot, J., Srivilas, P. And Noiraksar, T. 2005. *Fatty Acids Composition Of 10 Microalgal Species*. Songklanakarin Journal Of Science And Technology. **27**: 1179–1187.
- Pratoomyot, J., Srivilas, P., Noiraksar, T., 2005. *Fatty Acids Composition Of 10 Microalgal Species*. Songklanakarin Journal Science Technology. **27**, 6.
- Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M.A. and Thajuddin, N., 2012. *Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga Chlorella sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production*. Biomass and Bioenergy. **37**: 60-66.
- Prospero J.M., Blades E., Mathison G. Naidu R. 2005. *Interhemispheric Transport Of Viable Fungi And Bacteria From Africa To The Caribbean With Soil Dust*. Aerobiologia, **21**: 1-19.
- Provasoli L., J.J.A. Mclaughlin M.R. Droop., 1975. *The Development Of Artificial Media For Merine Algae*. Anch. Microbiol. **25**. 392–428.
- Pulido-Villena, E. Reche, I. 2003. *Exploring Bacterioplankton Growth And Protein Synthesis To Determine Conversion Factors Across A Gradient Of Dissolved Organic Matter*. Microbial Ecology. **46**: 33-42.
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, **57**, 3: 287-293.
- Pulz, O., Gross, W., 2004. *Valuable Products From Biotechnology Of Microalgae*. Applied Microbiology And Biotechnology. **65**, 6 : 635–648.
- Pushkareva, Ekaterina, Igor S. Pessi, Annick Wilmotte, And Josef Elster. 2015. *Cyanobacterial Community Composition In Arctic Soil Crusts At Different Stages Of Development*. *Fems Microbiology Ecology* **91**, 12.
- Quevedo, C., P., S., Morales, V., C, A. A., 2000. *Scenedesmus Sp Growth In Different Culture Mediums*. Vitae, Revista De La Fac. De Medicina Farmaceutica, **15**, 1: 25–31.
- Quevedo, H., Quintana, M. M., Almarales, A., Hernandez, L., 1999. *Composición Bioquímica Y Evaluación De La Calidad Proteica De La Biomasa Autotrófica De Chlorella Vulgaris*. Rev Cubana Aliment Nutr. **13**, 2 :123-128
- Quinn, J.C. And Davis, R. 2015. *The Potentials And Challenges Of Algae Based Biofuels: A Review Of The Techno-Economic, Life Cycle, And Resource Assessment Modeling*. Bioresource Technology. **184**: 444–452.
- Quintana, M., Nazario, L. H., Morris, H., Fernandez Gonzalez, M., 1999. *Contenido De Algunas Vitaminas En Cultivos De Microalga Chlorella Sp*. Revista Cubana De Alimentacion Y Nutricion. **13**, 1: 9–13.
- Qureshi., 1991. *Purification And Some Enzymatic Features Of Cytochrome-C-Oxidase From Facultative Alkalophilic Bacillus Yn-2000 Grown At Ph-8*. Journal. Soc.Che.Fak. **13**, N°2.

- Raesossadati, M.J., Ahmadzadeh, H., McHenry, M.P. and Moheimani, N.R., 2015. CO₂ environmental bioremediation by microalgae. In *Biomass and Biofuels from Microalgae*: 117-136.
- Raja, R., Hema Iswarya, S., Balasubramanyam, D., Rengasamy, R., 2007. Pcr-Identification of *Dunaliella Salina* (Volvocales, Chlorophyta) And Its Growth Characteristics. *Microbiological Research*. **162**, 2 :168–176.
- Rajagopal, D., Sexton, S., Hochman, G. And Zilberman, D. 2009. *Recent Developments In Renewable Technologies: Rand D Investment In Advanced Biofuels*. *Annu. Rev. Resour. Econ.*, **1**, 1: 621-644.
- Ralph E. H. Smith, Lynn C. Stapleford, Richard S. Ridings., 1994. *The Acclimated Response Of Growth, Photosynthesis, Composition, And Carbon Balance To Temperature In The Psychrophilic Ice Diatom Nitzschia Seriata*. *Journal Of Phycology* **30**, 1: 8–16.
- Ralph Pj, Mcmin A, Ryan Kg, Ashworth C., 2005. *Short-Term Effect Of Temperature On The Photokinetics Of Microalgae From The Surface Layers Of Antarctic Pack Ice*. *J Phycol* **41**: 763–769
- Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Oh, H.M. and Kim, H.S., 2016. Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology advances*, **34**, 1: 14-29.
- Ramette A. Tiedje J.M. 2007. *Multiscale Responses Of Microbial Life To Spatial Distance And Environmental Heterogeneity In A Patchy Ecosystem*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. **104**: 2761-2766.
- Ramirez, Ninfa. 2006. *Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **37**: 3.
- Ramli, A. N. M., Mahadi, N. M., Shamsir, M. S., Rabu, A., Joyce-Tan, K. H., Murad, A. M. A., Illias, R. M., 2012. *Structural Prediction Of A Novel Chitinase From The Psychrophilic Glaciozyma Antarctica Pi12 And An Analysis Of Its Structural Properties And Function*. *Journal Of Computer-Aided Molecular Design*. **26**, 8: 947–61.
- Ramli, Aizi Nor Mazila, Nor Muhammad Mahadi, Mohd Shahir Shamsir, Amir Rabu, Kwee Hong Joyce-Tan, Abdul Munir Abdul Murad, And Rosli Md. Illias. 2012. *Structural Prediction Of A Novel Chitinase From The Psychrophilic Glaciozyma Antarctica Pi12 And An Analysis of Its Structural Properties And Function*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **26**, 8: 947–61.
- Rangel-Yagui, C. D. O., Danesi, E. D. G., De Carvalho, J. C. M., Sato, S., 2004. *Chlorophyll Production From Spirulina Platensis: Cultivation With Urea Addition By Fed-Batch Process*. *Bioresource Technology*. **92**, 2: 133–141.
- Rao Yv, Das Bk, Pradhan J And Chakrabarti R. 2006. *Effect of On The Immunity And Survival Of Labeo Rohita Infected With Aeromonas Hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*. **20**: 263-273
- Rao, A R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R., Ravishankar, G. A., 2007. *Effect Of Salinity On Growth Of Green Alga Botryococcus Braunii And Its Constituents*. *Bioresource Technology*, **98**, 3: 560–4.
- Rasala, B.A. And Mayfield, S.P. 2015. *Photosynthetic Biomanufacturing In Green Algae; Production Of Recombinant Proteins For Industrial, Nutritional, And Medical Uses*. *Photosynthesis Research*. **123**, 3 : 227–239.
- Raven, J.A. and Geider, R.J., 1988. Temperature and algal growth. *New phytologist*, **110**, 4: 441-461.
- Reche I., Pulido-Villena E., Morales-Baquero R. Casamayor E.O. 2005. *Does Ecosystem Size Determine Aquatic Bacterial Richness?*. *Ecology*. **86**: 1715–1722.
- Reche, I., Carrillo, P. And Cruz-Pizarro, L. 1997. *Influence Of Metazooplankton On Interactions of Bacteria And Phytoplankton In An Oligotrophic Lake*. *Journal Of Plankton Research*, **19**, 5: 631-646.

- Reis, A., da Silva, T.L., Kent, C.A., Kosseva, M., Roseiro, J.C. and Hewitt, C.J., 2005. *Monitoring population dynamics of the thermophilic Bacillus licheniformis CCMI 1034 in batch and continuous cultures using multi-parameter flow cytometry*. Journal of biotechnology, **115**, 2: 199-210.
- Reisenman P.J. Nicholson W.L. 2000. *Role Of The Spore Coat Layers In Bacillus Subtilis Spore Resistance To Hydrogen Peroxide, Artificial Uv-C, Uv-B, And Solar Uv Radiation*. Applied And Environmental Microbiology, **66**: 620–626.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. and Olsen, Y., 1994. *Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae*. Journal of Phycology. **30**, 6: 972-979.
- Rekha, V., Devi, A. S., 2012. *Culture And Biofuel Production Efficiency Of Marine Microalgae Chlorella Marina And Skeletonema Costatum*, **41**, 152–158.
- Renaud, S. M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G., Parry, D. L., 2002. *Effect Of Temperature On Growth, Chemical Composition And Fatty Acid Composition Of Tropical Australian Microalgae Grown In Batch Cultures*. Aquaculture, **211**, 1-4: 195–214.
- Renaud, S. M., Zhou, H. C., Parry, D. L., Thinh, L., Woo, K. C., 1995. *Effect Of Temperature On The Growth , Total Lipid Content And Fatty Acid Composition Of Recently Isolated Tropical Microalgae Isochrysis Sp. , Nitzschia Closterium , Nitzschia Paleace , And Commercial Species Isochrysis Sp .* Aquaculture International **23**, 5: 595–602.
- Renaud, S.M., Parry, D.L., Thinh, L.V., Kuo, C., Padovan, A. And Sammy, N. 1991. *Effect Of Light Intensity On The Proximate Biochemical And Fatty Acid Composition Of Isochrysis Sp. And Nannochloropsis Oculata For Use In Tropical Aquaculture*. Journal Of Applied Phycology. **3**, 1: 43-53.
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M., 2011. *Microbiological Food Safety Assessment Of High Hydrostatic Pressure Processing: A Review*. Lwt - Food Science And Technology. **44**, 5: 1251–1260.
- Renuka, Nirmal, Radha Prasanna, Anjuli Sood, Amrik S. Ahluwalia, Radhika Bansal, Santosh Babu, Rajendra Singh, Yashbir S. Shivay, And Lata Nain. 2015. *Exploring The Efficacy Of Wastewater-Grown Microalgal Biomass As A Biofertilizer For Wheat*. Environmental Science And Pollution Research. 1–13.
- Rezanka, T., Vyhnalek, O., Podojil, M., 1986. *Identification Of Sterols And Alcohols Produced By Green Algae Of The Genera Chlorella And Scenedesmus By Means Of Gas Chromatography Mass Spectrometry*. **9**: 3–8.
- Riisgard Hv, Nielsen Kn, Sogaard-Jensen B., 1980. *Further Studies On Volume Regulation And Effects Of Copper In Relation To Ph And Edta In The Naked Marine Flagellater Dunuiella*. Mar Biol. **56**: 267-276.
- Riquelme, C. E., Avendaño-Herrera, R. E., 2003. *Interacción Bacteria-Microalga En El Ambiente Marino Y Uso Potencial En Acuicultura*. Revista Chilena De Historia Natural. **76**, 4: 725–736.
- Robb G, A. And James D.F. Robinson., 1995. *Acid Drainage From Mines*. The Geographical Journal . **161**, 1: 47-54
- Rocca, N., Andreoli, C., Giacometti, G. M., Rascio, N., Moro, I., 2009. *Responses Of The Antarctic Microalga Koliella Antarctica (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) To Cadmium Contamination*. Photosynthetica. **47**, 3: 471–479.
- Rodica, P., 2007. *The Romanian Marine Ecosystem- An Important Source For The Pharmaceutical Industry*. Ocean 2007: 1- 10.
- Rodicio, María Del Rosario; Mendoza, María Del Carmen., 2004. *Identificación Bacteriana Mediante Secuenciación Del Arnr 16s*. Fundamento, Metodología Y Aplicaciones en Microbiología Clínica. **22**, 4: 238–245.

- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. R., 2009. *Microalgae For Oil: Strain Selection, Induction Of Lipid Synthesis And Outdoor Mass Cultivation In A Low-Cost Photobioreactor*. *Biotechnology And Bioengineering*. **102**, 1 : 100–12.
- Rodríguez, J., Echevarría, F. Jiménez-Gómez, F., 1990. *Physiological And Ecological Scaling Of Body Size In An Oligotrophic, High Mountain (La Caldera, Sierra Nevada, Spain)*. *Journal Of Plankton Research*. **12**. 593-599.
- Rodríguez-Lopez, M., 1964. *Influence Of The Inoculum And The Medium On The Growth Of Chlorella Pyrenoidosa*. *Nature*. **203**: 666–667
- Rodríguez-Sánchez, R., Ortiz-Butrón, R., Blas-Valdivia, V., Hernández-García, A. And Cano-Europa, E. 2012. *Phycobiliproteins Or C-Phycocyanin Of Arthrospira (Spirulina) Maxima Protect Against Hgcl 2-Caused Oxidative Stress And Renal Damage*. *Food Chemistry*. **135**, 4: 2359-2365.
- Roessler, P.G., 1990. *Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions*. *Journal of Phycology*. **26**, 3: 393-399.
- Rogora, M., Mosello, R. And Arisci, S. 2003. *The Effect Of Climatewarming On The Hydrochemistry Of Alpine Lakes*. *Water Air & Soil Pollution*. **148**: 347-361.
- Rose, J. M., Caron, D. A. Sieracki, M. E. and Poulton., N. 2004. *Counting Heterotrophic Nanoplanktonic Protists In Cultures And Aquatic Communities By Flow Cytometry*. *Aquatic Microbial Ecology*. **34**, 3: 263–77.
- Rosenzweig, C., Major, D.C., Demong, K., Stanton, C., Horton, R., Stults, M. 2007. *Managing Climate Change Risks In New York City's Water System: Assessment And Adaptation Planning*. *Mitigation And Adaptation Strategies For Global Change*, **12**: 1391-1409.
- Round F.E. 1973. *The Biology Of The Algae*. 2nd Ed. Edward Arnold, London. 278.
- Ruangsomboon, S. 2015. *Effects of Different Media And Nitrogen Sources And Levels On Growth And Lipid Of Green Microalga Botryococcus Braunii Kmitl And Its Biodiesel Properties Based On Fatty Acid Composition*. *Bioresource Technology*. **191**: 377–384.
- Ruangsomboon, S., 2012. *Effect of Light, Nutrient, Cultivation Time And Salinity On Lipid Production Of Newly Isolated Strain Of The Green Microalga, Botryococcus Braunii Kmitl 2*. *Bioresource Technology*. **109**: 261–5.
- Ruangsomboon, S., 2012. *Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, Botryococcus braunii KMITL 2*. *Bioresource Technology*. **109**: 261-265.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G., Stephenson, T., 2010. *Growth And Nutrient Removal In Free And Immobilized Green Algae In Batch And Semi-Continuous Cultures Treating Real Wastewater*. *Bioresource Technology*. **101**,1 : 58–64.
- Russell, N. J. 1990. *Cold Adaptation of Microorganisms*. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci*. **326**: 595–608.
- Russell, N.J., 2003. Psychrophily and resistance to low temperature. *Extremophiles (Life under extreme environmental Condition)*, *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. *Eolss Publishers, Oxford*.
- Russell, N.J., Harrison, P., Johnston, I.A., Jaenicke, R., Zuber, M., Franks, F. And Wynn-Williams, D., 1990. *Cold Adaptation Of Microorganisms [And Discussion]*. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London B: Biological Sciences*. **326**, 1237: 595-611.
- Ryther, J.H. and Guillard, R.R.L., 1959. Enrichment experiments as a means of studying nutrients limiting to phytoplankton production. *Deep Sea Research*. **6**, 65-69.

- Ryu, Byung Gon, Woong Kim, Kibok Nam, Sungwhan Kim, Bongsoo Lee, Min S. Park, And Ji Won Yang. 2015. *A Comprehensive Study On Algal-Bacterial Communities Shift During Thiocyanate Degradation In A Microalga-Mediated Process*. *Bioresource Technology*. **191**: 496–504.
- Sakarika, M. and Kornaros, M., 2016. Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*. **219**: 694-701.
- San Pedro, A., González-López, C. V, Acién, F. G., Molina-Grima, E. 2013. *Marine Microalgae Selection And Culture Conditions Optimization For Biodiesel Production*. *Bioresource Technology*. **134c**: 353–361.
- Sánchez Castillo, P. M. Y J. A. Gil., 1982. *Vegetación Criptogámica De Las Tobas De La Provincia De Granada (España)*. *Coll. Bot.* **13**, 1: 231-245.
- Sánchez Castillo, P. M., 1982. *Estudio Limnológico De Dos Ecosistemas Hídricos De La Provincia De Almería*. Instituto De Estudios Almerienses, Diputación De Almería.
- Sánchez Castillo, P. M., 1983. *Clorofitas De La Ciudad De Granada*. *Trabajos Del Departamento De Botánica De La Universidad De Granada* **3**: 63-79
- Sánchez Castillo, P. M., 1986. *Estudio De Las Comunidades Fitoplanctónicas De Las Lagunas De Alta Montaña De Sierra Nevada*. Tesis Doctoral. Universidad De Granada, Granada. 246pp.
- Sánchez Castillo, P. M., 1980. *Algas Verdes y Azules De Los Estanques y Fuentes De Granada*. Tesina De Licenciatura. Facultad De Ciencias. Universidad De Granada.
- Sanchez Castillo, P. M., 1984. *Estudio ficológico de la vegetación reófila de Sierra Nevada (Granada)*. *Limnética*, **1**: 136-140.
- Sánchez Castillo, P. M., 1987a. *Influencia De La Salinidad Sobre Las Poblaciones Algales De Tres Lagunas Litorales (Albuferas De Adra, Almería)*. *Limnetica* **3**: 47-53.
- Sánchez Castillo, P. M., 1987b. *Estudio Del Ciclo Biológico De Korshikoviella Gracilipes (Lambert) Silva (Chlorococcales, Chlorophyta)*. *Phycologia* **26**: 496-500
- Sánchez Castillo, P. M., 1988. *Algas De Las Lagunas De Alta Montaña De Sierra Nevada (Granada, España)*. *Acta Bot. Malacitana*. **13**: 21-52.
- Sánchez Castillo, P.M., Cruz-Pizarro, L.; Carillo, P. 1989. *Caracterización Del Fitoplancton De Las Lagunas De Alta Montaña De Sierra Nevada (Granada, España) En Relación Con Las Características Físico-Químicas Del Medio*. *Limnetica*, **5**: 37-50.
- Sanchez, E., 2012. *Perspectivas Del Proceso De Producción De Biodiesel De Tercera Generación*, **30**, 108–124.
- Sánchez, J.F., Fernández-Sevilla, J.M., Acién, F.G., Cerón, M.C., Pérez-Parra, J. and Molina-Grima, E., 2008. *Biomass and lutein productivity of Scenedesmus almeriensis: influence of irradiance, dilution rate and temperature*. *Applied microbiology and biotechnology*. **79**, 5: 719-729.
- Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C. and Rodríguez, I., 2003. *Spirulina (Arthrospira): an edible microorganism: a review*. *Universitas Scientiarum*, **8**,1: 7-24.
- Sanchez-Castillo, P.M., LINARES-CUESTA, E.J. and Fernández-Moreno, D., 2008. *Changes in epilithic diatom assemblages in a Mediterranean high mountain lake (Laguna de La Caldera, Sierra Nevada, Spain) after a period of drought*. *Journal of Limnology*. **67**, 1: 49-55.
- Santamaría, M. And Azqueta, D. 2015. *Promoting Biofuels Use In Spain: A Cost-Benefit Analysis*. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*. **50**: 1415–1424.
- Sarada, R., Tripathi, U., Ravishankar, G. A., 2002. *Influence Of Stress On Astaxanthin Production In Haematococcus Pluvialis Grown Under Different Culture Conditions*. *Process Biochemistry*. **37**: 623–627.
- Sarethy, I. P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S. K., Gupta, V., Gupta, S., 2011. *Alkaliphilic Bacteria: Applications In Industrial Biotechnology*. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **38**, 7: 769–90.

- Sathe, P., Myint, M.T.Z., Dobretsov, S. and Dutta, J., 2016. *Removal and regrowth inhibition of microalgae using visible light photocatalysis with ZnO nanorods: A green technology*. Separation and Purification Technology, **162**: 61-67.
- Sato, T., Yamada, D. and Hirabayashi, S., 2010. *Development of virtual photobioreactor for microalgae culture considering turbulent flow and flashing light effect*. Energy Conversion and Management. **51**, 6: 1196-1201.
- Sato, V., 1991. *Development Of A Phytoplankton Production System As A Support Base For Finfish Larval Rearing Research*. Rotifer And Micro-Algae Culture System. Proc. Us- Asia Works, Ocean Inst. Hawaii, USA. 257-274.
- Satyantini, W. And Pascasarjana, S. 2013. *Production technology and utilization of phycocyanin of spirulina platensis as an immunostimulant in humpback grouper (Cromileptes altivelis)*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Indonesia
- Schanz, F., Zahler, U., 1981. *Prediction Of Algal Growth In Batch Cultures*. Schweizerische Zeitschrift Für Hydrologie. **43**, 1 : 103–113.
- Schenk, P. Thomas-Hall, S. Stephens, E. Marx, U. Mussgnug, J. Posten, C. Kruse, O. Hankamer, B. 2008. *Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae For Biodiesel Production*. Bioenerg. Res. **1**: 20–43.
- Schindler, D. W., Bayley, S.E., Parker, B.R., Beaty, K.G., Cruikshank, D.R., Fee, E.J., Schindler, E.U. And Stainton, M.P. 1996. *The Effects Of Climatic Warming On The Properties of Boreal Lakes And Streams At The Experimental Lakes Area, Northwestern Ontario*. Limnology And Oceanography, **41**: 1004–1017.
- Schleper, C, E F Delong, C M Preston, R A Feldman, K Y Wu, And R V Swanson. 1998. *Genomic Analysis Reveals Chromosomal Variation In Natural Populations of The Uncultured Psychrophilic Archaeon Cenarchaeum Symbiosum*. Journal of Bacteriology. **180**, 19: 5003–9.
- Schlesinger P., Mamane Y. Grishkan I. 2006. *Transport of Microorganisms To Israel During Saharan Dust Events*. Aerobiologia, **22**, 259-273.
- Schöne H.K. A. Schöne., 1982. *Met 44: A Weekly Enriched-Sea Water Medium For Ecological Studies On Marine Plankton Algae, And Some Examples Of Its Application*. Botánica Marina. **25**: 117–122
- Seckbach, J. 1994. *The Natural History Of Cyanidium (Geitler 1933): Past And Present Perspectives*. Evolutionary Pathways And Enigmatic Algae: Cyanidium Caldarium (Rhodophyta) And Related Cells, J. Seckbach. 99–112.
- Seckbach, Joseph. 2015. *The Algae World*. **26**: 307–15
- Segawa, Takahiro, Koji Miyamoto, Kazunari Ushida, Kiyokazu Agata, Norihiro Okada, And Shiro Kohshima. 2005. *Seasonal Change In Bacterial Flora And Biomass In Mountain Snow From The Tateyama Mountains, Japan, Analyzed By 16s Rrna Gene Sequencing And Real-Time Pcr*. Applied And Environmental Microbiology. **71**, 1: 123–30.
- Seguineau, C., Laschi-Loquerie, A., Moal, J., Samain, F., 1996. *Vitamin Requirements In Great Scallop Larvae*. Aquaculture International. **4**: 315–324.
- Servel, M.-O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L., Roeck-Holtzhauer, D., 1994. *Fatty Acid Composition*. Phytochemistry. **36**: 691–693.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., Schenk, P. M., 2012. *High Lipid Induction In Microalgae For Biodiesel Production*. Energies, **5**, 5: 1532–1553.
- Sharma, Y. C., Singh, B., Upadhyay, S. N., 2008. *Advancements In Development And Characterization Of Biodiesel: A Review*. Fuel. **87**, 12: 2355–2373.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. And Roessler, P., 1998. *Look Back At The U.S. Department Of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel From Algae; Close-Out Report*: Size: 325 Pp.

- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z. 2010. *Heterotrophic Culture of Chlorella protothecoides in Various Nitrogen Sources for Lipid Production*. Appl Biochem Biotechnol. **6**: 1674–1684
- Shivakumar Srividya., 2012. *Co-Production Of Alkaline Protease And Amylase of Bacillus Sp Y In Solid State Cultivations In Solid State Cultivations*. Research Journal of Biotechnology. **7**, 2.
- Shukla, S. P., Kviderová, J., Elster, J. 2011. *Nutrient Requirements of Polar Chlorella-Like Species*, **1**, 1: 1–10.
- Sieracki, M. E., Gobler, C. J., Cucci, T. L., Thier, E. C., Gilg, I. C., Keller, M. D., 2004. *Pico- And Nanoplankton Dynamics During Bloom Initiation Of Aureococcus In A Long Island, Ny Bay*. Harmful Algae. **3**, 4: 459–470.
- Signori, L., Ami, D., Posteri, R., Giuzzi, A., Mereghetti, P., Porro, D. and Branduardi, P., 2016. *Assessing an effective feeding strategy to optimize crude glycerol utilization as sustainable carbon source for lipid accumulation in oleaginous yeasts*. Microbial cell factories. **15**, 1: 75.
- Silva, F. V. ., Gibbs, P., 2001. *Alicyclobacillus Acidoterrestris Spores In Fruit Products And Design Of Pasteurization Processes*. Trends In Food Science & Technology. **12**, 2: 68–74.
- Silvi, S., Barghini, P., Aquilantri, A., Juarez-Jimenez, B. and Fenice, M. 2013. *Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of Pantoea sp. producing high levels of exopolysaccharide*. Microbial Cell Factories. **12**:10
- Simionato, D., Sforza, E., Carpinelli, E.C., Bertucco, A., Giacometti, G.M. and Morosinotto, T., 2011. *Acclimation of Nannochloropsis gaditana to different illumination regimes: effects on lipids accumulation*. Bioresource technology. **102**, 10: 6026-6032.
- Simon, N., Lebot, N., Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D., Simon, N., Bot, N. L. E., 1995. *Fluorescent In Situ Hybridization With Rrna-Targeted Oligonucleotide Probes To Identify Small Phytoplankton By Flow Cytometry*. Applied And Environmental Microbiology. **61**, 7: 2506–2513
- Sing, S.F., Isdepsky, A., Borowitzka, M.A. and Lewis, D.M., 2014. *Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant Tetraselmis sp. in raceway ponds under increasing salinity: a novel protocol for commercial microalgal biomass production*. Bioresource technology, **161**: 47-54.
- Singh, G., Thomas, P. B. 2012. *Nutrient Removal From Membrane Bioreactor Permeate Using Microalgae And In A Microalgae Membrane Photoreactor*. Bioresource Technology. **117**: 80–85.
- Singh, P., Kumari, S., Guldhe, A., Misra, R., Rawat, I. And Bux, F. 2016. *Trends And Novel Strategies For Enhancing Lipid Accumulation And Quality In Microalgae*. Renewable And Sustainable Energy Reviews. **55**: 1-16.
- Sisffa., 1964. *Cultivation Of Live Food Organisms In The Yashima Station I. Fertilizers For Marine Phytoplankton Culture*. Saibai-Gyogyo News. **3**, 4: 1–8.
- Slininger, P.J., Dien, B.S., Kurtzman, C.P., Moser, B.R., Bakota, E.L., Thompson, S.R., O'bryan, P.J., Cotta, M.A., Balan, V., Jin, M. And Sousa, L.D. 2016. *Comparative Lipid Production By Oleaginous Yeasts In Hydrolyzates Of Lignocellulosic Biomass And Process Strategy For High Titer*s. Biotechnology And Bioengineering. **113**, 8: 1676-1690.
- Slonczewski, J.L. Y Foster, J.W., 1987. En: *Escherichia Coli And Salmonel Typhimorium*, Cellular And Molecular Biology, Ingraham J.L. Et Al., American Society For Microbiology. **96**: 1539-1549
- Smith F.W., Thompson, John F. 1971 *Regulation Of Nitrate Reductase In Chlorella Vulgaris*. Plant Physiology. **48**, 2.
- Smith, R.E., Stapleford, L.C. and Ridings, R.S., 1994. *The Acclimated Response Of Growth, Photosynthesis, Composition, And Carbon Balance To Temperature In The Psychrophilic Ice Diatom Nitzschia Seriatal*. Journal of phycology, **30**, 1: 8-16.

- Smith, T. And Piccin, T., 2004. *Algal Taxonomic Survey Of Zion National Park And Cedar Breaks National Monument, Utah, And Pipe Spring National Monument, Arizona*. The Southwestern Naturalist. 395-406.
- Smith, T., and Piccin, T. 2004. *Algal Taxonomic Survey Of Zion National Park And Cedar Breaks National Monument, Utah, And Pipe Spring National Monument, Arizona*. The Southwestern Naturalist. **49**, 3: 395-406.
- Soeder And Stengel., 1974 C. *Physico-Chemical Factors Affecting Metabolism And Growth Rate*. Algal Physiology And Biochemistry, Blackwell, London.
- Sommaruga R. 2001. *The Role Of Uv Radiation In The Ecology Of Alpine Lakes*. *Journal Of Photochemistry And Photobiology. B: Biology*, **62**: 35-42.
- Sommaruga R. 2003. *Ultraviolet Radiation And Its Effects On Species Interactions*. In: *Uv Effects In Aquatic Organisms And Ecosystems*. Comprehensive Series In Photosciences, Esp, Royal Society Of Chemistry. 485–508., London.
- Sommaruga R. Augustin G. 2006. *Seasonality In Uv Transparency Of An Alpine Lake Is Associated To Changes In Phytoplankton Biomass*. *Aquatic Sciences*. **68**: 129-141.
- Sommaruga R., Obernosterer I., Herndl G.J. Psenner R. 1997. *Inhibitory Effect Of Solar Radiation On Thymidine And Leucine Incorporation By Freshwater And Marine Bacterioplankton*. *Applied And Environmental Microbiology*, **63**: 4178-4184.
- Sommaruga, R. And Casamayor, E.O. 2009. *Bacterial 'Cosmopolitanism' And Importance Of Local Environmental Factors For Community Composition In Remote High-Altitude Lakes*. *Freshwater Biology*, **55**, 5: 994-1005.
- Song D., Fu J., Shi D., 2008. *Exploitation of Oil-Bearing Microalgae For Biodiesel*. *Chin. Jour. Biotech.* **24**: 341-348.
- Song, D., Xi, B. And Sun, J. 2016. *Characterization of The Growth, Chlorophyll Content And Lipid Accumulation In A Marine Microalgae Dunaliella Tertiolecta Under Different Nitrogen To Phosphorus Ratios*. *Journal of Ocean University Of China*. **15**, 1: 124–130.
- Sousa, I., Gouveia, L., Batista, A.P., Raymundo, A. And Bandarra, N.M., 2008. *Microalgae In Novel Food Products*. *Food Chemistry Research Developments*, 75-112.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., Génie, L. De, Paris, E. C., 2006. *Commercial Applications Of Microalgae*, **101**, 2: 87–96.
- Starich, M. R., Sandman, K., Reeve, J. N., Summers, M. F., 1996. *Nmr Structure Of HmfB From The Hyperthermophile, Methanothermus Fervidus, Confirms That This Archaeal Protein Is A Histone*. *Journal Of Molecular Biology*. **255**, 1: 187–203.
- Stauber, J. L., Franklin, N. M., Adams, M. S., 2002. *Applications Of Flow Cytometry To Ecotoxicity Testing Using Microalgae*. *Trends In Biotechnology*. **20**, 4: 141–143.
- Stauber, J.L. and Davies, C.M., 2000. Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environmental Reviews*. **8**, 4: 255-301.
- Steinberg, C E W, H Schaefer, And W Beisker. 1998. *Do Acid-Tolerant Cyanobacteria Exists?*. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*. **26**: 13–19.
- Stengel, D.B. And Walker, J.M. 2015. *Natural Products From Marine Algae*,
- Stetter, K. O., 1999. *Extremophiles And Their Adaptation To Hot Environments*. *Febs Letters*, **452**, 1-2: 22–5.
- Stoeck, T., And Epstein, S., 2003. *Novel Eukaryotic Lineages Inferred From Small-Subunit Rrna Analyses Of Oxygen- Depleted Marine Environments*. *Appl Environ Microbiol*. **69**: 2657–2663.
- Stoeck, T., Schwarz, M. V. J., Boenigk, J., Schweikert, M., Von Der Heyden, S., Behnke, A., 2005. *Cellular Identity Of An 18s Rrna Gene Sequence Clade Within The Class Kinetoplastea: The Novel Genus Actuariola Gen. Nov. (Neobodonida) With Description Of The Type Species*

- Actuariola Framvarensis Sp. Nov.* International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. **55**, 6: 2623–2635.
- Strillinger E, Grötzinger SW, Allers T, Eppinger J., Weuster-Botz D. 2015. *Production Of Halophilic Proteins Using Haloferax Volcanii H1895 In A Stirred-Tank Bioreactor.* Applied Microbiology And Biotechnology. **100**: 1183–1195.
- Struvay, C., Feller, G., 2012. *Optimization To Low Temperature Activity In Psychrophilic Enzymes.* International Journal Of Molecular Sciences. **13**, 9: 11643–11665.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H.H. And Renganathan, S. 2016. *Macroalgae And Microalgae As A Potential Source For Commercial Applications Along With Biofuels Production: A Biorefinery Approach.* Renewable And Sustainable Energy Reviews. **55**: 909-941.
- Suh, W.I., Mishra, S.K., Kim, T.H., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M.S. And Yang, J.W. 2015. *Direct Transesterification Of Wet Microalgal Biomass For Preparation Of Biodiesel.* Algal Research. **12**: 405-411.
- Sukacova, Katerina, Martin Trtilek, And Tomas Rataj. 2015. *Phosphorus Removal Using A Microalgal Biofilm In A New Biofilm Photobioreactor For Tertiary Wastewater Treatment.* Water Research. **71**: 55–63.
- Sullivan M. J., Carolyn A. Currin., 2002. *Community Structure And Functional Dynamics Of Benthic Microalgae In Salt Marshes. Concepts And Controversies.* Tidal Marsh Ecology. 81-106.
- Suman, T. Y., S. R. Radhika Rajasree, And R. Kirubakaran. 2015. *Evaluation Of Zinc Oxide Nanoparticles Toxicity On Marine Algae Chlorella Vulgaris Through Flow Cytometric, Cytotoxicity And Oxidative Stress Analysis.* Ecotoxicology And Environmental Safety. **113**: 23–30.
- Sun Dou, X., Wu, J., He, B., Wang, Y., Chen, Y.-F., Z. 2016. *Enhanced Lipid Accumulation Of Photoautotrophic Microalgae By High-Dose CO₂ Mimics A Heterotrophic Characterization.* World Journal Of Microbiology And Biotechnology. **32**, 1: 1–11.
- Sushchik, N.N., Kalacheva, G.S., Zhila, N.O., Gladyshev, M.I., Volova, T.G., 2003. *Temperature Dependence Of The Intra- And Extracellular Fatty-Acid Composition Of Green Algae And Cyanobacterium.* Russ. J. Plant Physiol. **50**: 374–380.
- Suttle Ca, Am Chan Mt Cottrell., 1990. *Infection Of Phytoplankton By Viruses And Reduction Of Primary Productivity.* Nature. **347**: 467-469.
- Szyszkka-Mroz, Beth, Paula Pittock, Alexander G. Ivanov, Gilles Lajoie, And Norman P.A. Hüner. 2015. *The Antarctic Psychrophile Chlamydomonas Sp. Uwo 241 Preferentially Phosphorylates A Photosystem I-Cytochrome B₆/F Supercomplex.* Plant Physiology **169**, 1: 717–36.
- Taha, O., El-Kheir, W. A., Hammouda, F., El-Hady, H. A., 2012. *Production Of β -Carotene And Glycerol Isolated From The Egyptian Wet -Lands Qarun And Bardawil.* International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences. ICEEBS'2012: 369–373.
- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A.H., Haik, Y. And Farid, M. 2014. *Effective Extraction Of Microalgae Lipids From Wet Biomass For Biodiesel Production.* Biomass and Bioenergy **66**: 159-167.
- Takagi, M., Karseno, S., Yoshida, T., 2006. *Effect Of Salt Concentration On Intracellular Accumulation Of Lipids And Triacylglyceride In Marine Microalgae Dunaliella Cells.* J Biosci Bioeng. **101**, 3: 223-226.
- Takeuchi, N., Kohshima, S., 2004. *A Snow Algal Community On Tyndall Glacier In The Southern Patagonia Icefield, Chile.* Arct. Antarct. Alp. Res. **36**: 92-99.
- Takizawa, K., Takahashi, S., Hüner, N. P. A, Minagawa, J., 2009. *Salinity Affects The Photoacclimation Of Chlamydomonas Raudensis Ettl Uwo241.* Photosynthesis Research, **99**, 3:195–203.
- Talukdar, J., Kalita, M. C., Goswami, B. C. 2012. *Influence Of Dissolved Inorganic Carbon And Nitrogen Sources On Growth , Total Lipid Content And Calorific Value Of The Freshwater Oleaginous*

- Microalgae *Ankistrodesmus Falcatus* (Corda) Ralfs, Environmental Research, Engineering and Management. **3**, 61:14–25.
- Tam, N. F. ., Wong, Y., 1996. *Effect Of Ammonia Concentrations On Growth Of Chlorella Vulgaris and Nitrogen Removal From Media*. Bioresource Technology. **57**, 1: 45–50
- Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1996). Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. Bioresource Technology, **57**, 1: 45–50.
- Tan, L., Meesapyodsuk, D. and Qiu, X., 2011. Molecular analysis of $\Delta 6$ desaturase and $\Delta 6$ elongase from *Conidiobolus obscurus* in the biosynthesis of eicosatetraenoic acid, a $\omega 3$ fatty acid with nutraceutical potentials. *Applied microbiology and biotechnology*, **90**, 2: 591-601.
- Tang, E.P.Y., Tremblay, R., Vincent, W.F., 1997. *Cyanobacterial Dominance Of Polar Freshwater Ecosystems: Are High-Latitude Mat-Formers Adapted To Low Temperature?*. Journal Of Phycology. **33**: 171-181
- Tang, H., Chen, M., Ng, K. Y. S., Salley, S. O. 2012. *Continuous Microalgae Cultivation In A Photobioreactor*. Biotechnology And Bioengineering. **109**, 10: 2468–2474.
- Tang, Shu Kun, Yun Wang, Man Cai, Kai Lou, Pei Hong Mao, Xiang Jin, Cheng Lin Jiang, Li Hua Xu, And Wen Jun Li. 2008. *Microbulbifer Halophilus Sp. Nov., A Moderately Halophilic Bacterium From North-West China*. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. **58**, 9: 2036–2040.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Van-Moppes, D., Grossman, S., Arad, S., 2005. *Antioxidant Activity Of The Polysaccharide Of The Red Microalga Porphyridium Sp.* Journal Of Applied Phycology. **17**, 3: 215–222.
- Tchigvintsev, Anatoli, Hai Tran, Ana Popovic, Filip Kovacic, Greg Brown, Robert Flick And Mahbod Hajighasemi. 2015. *The Environment Shapes Microbial Enzymes: Five Cold-Active And Salt-Resistant Carboxylesterases From Marine Metagenomes*. Applied Microbiology And Biotechnology. **99**, 5: 2165–78.
- Tempest Dw., 1978. *The Biochemical Significance Of Microbial Growth Yields: A Reassessment*. Tibs. **3**: 180-184.
- Teoh, M L, W L Chu, And S M Phang. 2010. *Effect Of Temperature Change On Physiology And Biochemistry Of Algae: A Malaysian Journal Of Science*. **29**, 2: 82–97.
- Thompson, Anne W., And Ger Van Den Engh. 2015. *A Multi-Laser Flow Cytometry Method To Measure Single Cell And Population-Level Relative Fluorescence Action Spectra For The Targeted Study And Isolation Of Phytoplankton In Complex Assemblages*. Limnology And Oceanography. Methods.
- Thompson, P. A., Levasseur, M. E., Harrison, P. J., 1989. *Light-Limited Growth On Ammonium Vs. Nitrate: What Is The Advantage For Marine Phytoplankton?*. Limnology And Oceanography. **34**, 6: 1014–1024.
- Tindall, B. J., 1988. *Prokaryotic Life In The Alkaline, Saline, Athalassic Environment. In Halophilic Bacteria*. 31-67.
- Tindall, B.J., 2004. *Prokaryotic Diversity In The Antarctic: The Tip Of The Iceberg*. Microbial Ecology. **47**: 271-283.
- Tjahjono Ae, Hayama Y, Kakizono T, Tereda Y, Nishio N, Nagai S., 1994. *Hyper Accumulation Of Astaxanthin In A Green Alga Haematococcus Plutialis At Elevated Temperatures*. Biotech Lett. **16**: 133–8.
- Tornabene, T. G., Holzer, G., Peterson, S. L., 1980. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. **96**, 3: 1349–1356.

- Torzillo, G., Scoma, A., Faraloni, C. And Giannelli, L. 2015. Advances In The Biotechnology Of Hydrogen Production With The Microalga *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Critical Reviews In Biotechnology*, **35**, 4: 485-496.
- Tran, D.T., Yeh, K.L., Chen, C.L. And Chang, J.S. 2012. *Enzymatic Transesterification Of Microalgal Oil From Chlorella Vulgaris Esp-31 For Biodiesel Synthesis Using Immobilized Burkholderia Lipase*. *Bioresource Technology*. **108**: 19-127.
- Tran, D.T., Yeh, K.L., Chen, C.L. and Chang, J.S., 2012. *Enzymatic transesterification of microalgal oil from Chlorella vulgaris ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized Burkholderia lipase*. *Bioresource technology*. **108**: 119-127.
- Travieso, L.; Benitez Echegoyen, F., 1998. *Cultivo De Arthrospira Sp: Del Laboratorio A Planta Piloto. Curso: Tecnología Y Aprovechamiento Del Cultivo Heterotrófico De Microalgas*. Centro De Investigaciones Pesqueras. La Habana. Cuba.
- Tredici, M.R., 2014. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels*, **1**,1: 143-162.
- Triadó-Margarit, Xavier, And Emilio O. Casamayor. 2015. *High Protists Diversity In The Plankton Of Sulfurous Lakes And Lagoons Examined By 18s Rrna Gene Sequence Analyses*. *Environmental Microbiology Reports*. **7**: 908-917.
- Trider Dj, Castell Jd., 1980. *Effect of Dietary Lipids On Growth, Tissue Composition And Metabolism Of The Oyster (Crassostrea Tirginica)*. *Journal Of Nutrition*. **110**: 1303–1309
- Tronholm, A., Leliaert, F., Sansón, M., Afonso-Carrillo, J., Tyberghein, L., Verbruggen, H., De Clerck, O., 2012. *Contrasting Geographical Distributions As A Result Of Thermal Tolerance And Long-Distance Dispersal In Two Allegedly Widespread Tropical Brown Algae*. *Plos One*. **7**, 1: 308-313.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K. And Hoadley, A.F. 2010. *Marine Microalgae Flocculation And Focused Beam Reflectance Measurement*. *Chemical Engineering Journal*. **162**, 3: 935-940.
- Ueda, Hiroyuki, Shigeto Otsuka, And Keishi Senoo. 2010. *Bacterial Communities Constructed In Artificial Consortia Of Bacteria And Chlorella Vulgaris*. *Microbes And Environments / Jsme*. **25**, 1: 36–40.
- Uemori, T, Y Ishino, H Doi, And I Kato., 1995. *The Hyperthermophilic Archaeon Pyrodictium Occultum Has Two Alpha-Like Dna Polymerases*. *Journal Of Bacteriology*. **177**, 8: 2164–2177.
- Uetake, J., Naganuma, T., Hebsgaard, M. B., Kanda, H., Kohshima, S., 2010. *Communities Of Algae And Cyanobacteria On Glaciers In West Greenland*. *Polar Science*. **4**, 1: 71–80.
- Ulukanli, Z., Rak, M. D. I., 2002. *Alkaliphilic Micro-Organisms And Habitats*. **26**: 181–191.
- Ürek, R. Ö., Tarhan, L., 2012. *The Relationship Between The Antioxidant System And Phycocyanin Production In Spirulina Maxima*. *Turkish Journal of Botany* **36**: 369–377.
- Uribe, Paulina., 2009. *Diatomeas Antárticas : Vida En Las Sombras Y El Frío*. *Boletín Antártico Chileno*. **8**,1.
- Urtasun, R., Villoslada, P., 2005. *Conceptos Básicos De Genética Molecular*. *Neurol. Supl*, **1**, 3: 4–13.
- Utturkar, Sagar M, Harald Huber, Sebastian Leptihn, Belinda Loh, Steven D Brown, And Karl O Stetter. 2016. *Draft Genome Sequence Of Pyrodictium Occultum P119 T, A Marine Hyperthermophilic Species Of Archaea That Grows Optimally At 105 ° C*. *Genome Announcements*. **4**, 1: 1982–1983.
- Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G., Yilmaz, E. I., 2011. *Optimal Conditions For Production Of Extracellular Protease From Newly Isolated Bacillus Cereus Strain Ca15*. *Eurasian Journal Of Biosciences*. **9**: 1–9.
- Valverde, F., Romero-Campero, F. J., León, R., Guerrero, M. G., & Serrano, A. (2016). New challenges in microalgae biotechnology. *European Journal of Protistology*. **55**: 95–101.

- Van Baalen, C., 1985. *Photosynthetic And Respiratory Rates Of Two Psychrophilic Diatoms*. Plant Physiology. **78**, 4: 799–802.
- Van Bleijswijk, J.D.L. And M.J.W. Veldhuis., 1995. *In Situ Gross Growth Rates Of *Emiliana Huxleyi* In Enclosures With Different Phosphate Loadings Revealed By Diel Changes In Dna Content*. Mar. Ecol. Prog. Ser. **121**: 271-277.
- Van den Burg, B., 2003. *Extremophiles As A Source For Novel Enzymes*. Current Opinion In Microbiology. **6**, 3: 213–218.
- Varol, A. And Ugurlu, A., 2016. *Biogas Production From Microalgae (*Spirulina Platensis*) In A Two Stage Anaerobic System*. Waste And Biomass Valorization. **7**, 1:1–8.
- Varshney, Prachi, Paulina Mikulic, Avigad Vonshak, John Beardall, And Pramod P. Wangikar. 2015. *Extremophilic Micro-Algae And Their Potential Contribution In Biotechnology*. Bioresource Technology. **184**: 363–72.
- Vasudevan, P.T., Briggs, M., 2008. *Biodiesel Production – Current State Of The Art And Challenges*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **35**: 421–430.
- Vaz, B. Da S. 2016. *Microalgae As A New Source Of Bioactive Compounds In Food Supplements*. Current Opinion In Food Science. **7**: 73–77.
- Velázquez, D., Quesada, A., 2011. *Las Cianobacterias En Ambientes Polares*. **20**, 1: 14–22.
- Veldhuis, M. J. W., Kraay, G. W., 2000. *Application Of Flow Cytometry In Marine Phytoplankton Research : Current Applications And Future Perspectives*. Scientia Marina. **64**, 2: 121–134.
- Velu, P., Peter, M.J. And Sanniyasi, E. 2015. *Effect Of Various Carbon Sources On Biochemical Production In Marine Microalgae *Nannochloropsis Salina* (*Eustigmatophyceae*), *Dunaliella Tertiolecta* (*Chlorophyceae*) And *Tetraselmis Suecica* (*Chlorodendrophyceae*)*. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. **4**, 3: 207-215.
- Verburg, P., And Hecky, R.E. 2003. *Wind Patterns, Evaporation And Related Physical Variables In Lake Tanganyika, East Africa*. Journal Of Great Lakes Research. **29**, 2: 48-61.
- Veron., B., Dauguet, J., Billard, C., 1998. *Sterolic Biomarkers In Marine Phytoplankton . Ii . Free And Conjugated Sterols Of Seven Species Used In Mariculture*. Journal Of Phycology. **34**: 273–279.
- Víctor J Nuñez, Domenico Voltolina, Mario Nieves, Pablo Piña, Alejandra Medina, Martín Guerrero, *Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater*, Bioresource Technology. **78**, 2: 161-164.
- Vidyashankar, S., Venugopal, K.S., Chauhan, V.S., Muthukumar, S.P. And Sarada, R. 2015. *Characterisation Of Defatted *Scenedesmus Dimorphus* Algal Biomass As Animal Feed*. Journal Of Applied Phycology. **27**, 5: 1871-1879.
- Vieille, C. and Zeikus, G.J., 2001. *Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability*. Microbiology and molecular biology reviews. **65**; 1: 1-43.
- Vieille, C. Y Zeikus, G. J., 2001. *Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, And Molecular Mechanisms For Thermostability*. Microbiol Mol Biol Rev. **65**: 1-43.
- Villa Carvajal, Mercedes., Solbas, Alejandro., García-Reverter, José., 2002. *Nuevos Alimentos Funcionales A Partir De Microalgas*. Departamento De Ingeniería Y Procesos. Centro Tecnológico. AINIA.
- Villar-Argaiz, M., Medina-Sánchez, J.M., Cruz-Pizarro, L. and Carrillo, P., 2001. *Inter-and intra-annual variability in the phytoplankton community of a high mountain lake: the influence of external (atmospheric) and internal (recycled) sources of phosphorus*. Freshwater Biology. **46**, 8: 1017-1034.
- Vincent, W.F., 2000. *Cyanobacterial Dominance In The Polar Regions*. The Ecology Of Cyanobacteria. 321-340.

- Volk, R. B., Venzke, K., Blaschek, W., And Alban, S., 2006. *Complement Modulating And Anticoagulant Effects Of A Sulfated Exopolysaccharide Released By The Cyanobacterium Synechocystis Aquatilis*. *Planta Medica*. **72**, 15: 1424–1427.
- Volkman J. K., Smith, D.J., Eglinton. G., Forsberg T., 1981. *Sterol And Fatty Acid Composition Of Four Marine Haptophycean Algae*. *J.Mar.Biol.Ass. U.K.* **61**: 509
- Volkman, J. K., 2003. *Sterols In Microorganisms*. *Applied Microbiology And Biotechnology*. **60**, 5: 495–506.
- Volkman, J. K., Barrett, S. M., Blackburn, S. I., Mansour, M. P., Sikes, E. L., Gelin, F., 1998. *Microalgal Biomarkers: A Review Of Recent Research Developments*. *Organic Geochemistry*. **29**, 5-7: 1163–1179.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I., Garland, C. D., 1989. *Fatty Acid And Lipid Composition Of 10 Species Of Microalgae Used In Mariculture*. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*. **128**, 3: 219–240.
- Volkman, J.K., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W. and Kearney, P.S., 1991. *Fatty acids from microalgae of the genus Pavlova*. *Phytochemistry*. **30**, 6: 1855-1859.
- Voltolina, D., Gómez-Villa, H., Correa, G. 2005. *Nitrogen Removal And Recycling By Scenedesmus Obliquus In Semicontinuous Cultures Using Artificial Wastewater And A Simulated Light And Temperature Cycle*. *Bioresource Technology*. **96**, 3: 359–62.
- Voltolina, D., Sánchez-Saavedra, M. D. P., Torres-Rodríguez, L. M., 2008. *Outdoor Mass Microalgae Production In Bahia Kino, Sonora, Nw Mexico*. *Aquacultural Engineering*. **38**, 2: 93–96.
- Vonnahme, T. R., M. Devetter, J. D. Žárský, M. Šabacká, And J. Elster. 2015. *Controls On Microalgal Community Structures In Cryoconite Holes Upon High Arctic Glaciers, Svalbard*. *Biogeosciences Discussions*. **12**.
- VOY POR AQUÍ
- Vu, M.T.T. 2015. *Optimization Of Photosynthesis, Growth, And Biochemical Composition Of The Microalga Rhodomonas Salina—An Established Diet For Live Feed Copepods In Aquaculture*. *Journal Of Applied Phycology*. **28**,3: 1485–1500.
- Wahidin, S., Idris, A. and Shaleh, S.R.M., 2013. *The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae Nannochloropsis sp.* *Bioresource technology*, **129**: 7-11.
- Wall, M., F. Ragazzola, L. C. Foster, A. Form, And D. N. Schmidt. 2015. *Ph Up-Regulation As A Potential Mechanism For The Cold-Water Coral Lophelia Pertusa To Sustain Growth In Aragonite Undersaturated Conditions*. *Biogeosciences*. **12**, 23: 6869–80.
- Walne, P. R., 1970. *Present Problems In The Culture Of The Larvae Of Ostrea Edulis*. **525**, 514–525.
- Wang H, Russell T. Hillb, Tianling Zheng, Xiaoke Hua And Bin Wanga. 2016. *Effects Of Bacterial Communities On Biofuel-Producing Microalgae: Stimulation, Inhibition And Harvesting*. *Critical Reviews In Biotechnology*. **36**, 2: 341-352
- Wang, H., Fu, R., Pei, G. 2012. *A Study On Lipid Production Of The Mixotrophic Microalgae Phaeodactylum Tricornutum On Various Carbon Sources*. *African journal of microbiology research*. **6**, 5: 1041–1047.
- Wang, H.M.D.2015. *Exploring The Potential Of Using Algae In Cosmetics*. *Bioresource Technology*. **184**: 355–362
- Ward, D.M., 1998. *A Natural Species Concept For Prokaryotes*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 3: 271–277.
- Watanabe, Keiji, Noritaka Takihana, Hideki Aoyagi, Satoshi Hanada, Yoshitomo Watanabe, Naoya Ohmura, Hiroshi Saiki, And Hideo Tanaka. 2005. *Symbiotic Association In Chlorella Culture*. *Fems Microbiology Ecology*. **51**, 2: 187–96.
- Wattier, R. A., Prodohl, P. A. Maggs, C. A., 2000. *DNA Isolation Protocol For Red Seaweed (Rhodophyta)*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **18**: 275–81.

- Wehr, J.D. Sheath, R.G., 2003. *Freshwater Habitats Of Algae. In Freshwater Algae Of North America – Ecology And Classification* 11–57. Academic Press, San Diego. USA.
- Wernicke, P., Nicklisch A., 1986. *Light/Dark Cycle And Temperature-Their Impact On Phosphate-Limited Growth Of Oscillatoria Redeki Van Goor In Semicontinuous Culture.* Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie. **71**, 3: 297–313.
- Whitton, R., Le Mével, A., Pidou, M., Ometto, F., Villa, R. And Jefferson, B. 2016. *Influence Of Microalgal N And P Composition On Wastewater Nutrient Remediation.* Water Research. **91**: 371-378.
- Whyte, J. N. C., 1987. *Biochemical Composition And Energy Content Of Six Species Of Phytoplankton Used In Mariculture of Bivalves.* Aquaculture. **60**, 3-4: 231–241.
- Widjaja, A., Chien, C.C. and Ju, Y.H., 2009. *Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris.* Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. **40**, 1: 13–20.
- Widjaja, A.; Chien, C.-C.; Ju, Y.-H. 2009. *Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris.* J. Taiwan Inst. Chem. Eng. **40**, 13–20.
- Wiegel, J., 1998. Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. *Extremophiles*. **2**, 3: 257-267.
- Wikfors, G. H., 1986. *Altering Growth And Gross Chemical Composition Of Two Microalgal Molluscan Food Species By Varying Nitrate And Phosphate.* Aquaculture, **59**: 1-14.
- Willem, S., Srahna, M., Devos, N., Gerday, C., Loppes, R., Matagne, R. F., 1999. *Protein Adaptation To Low Temperatures: A Comparative Study Of Alpha-Tubulin Sequences In Mesophilic And Psychrophilic Algae.* Extremophiles : Life Under Extreme Conditions. **3**, 3: 221–226.
- Willerslev, E., Hansen, A J., Christensen, B., Steffensen, J. P., Arctander, P., 1999. *Diversity Of Holocene Life Forms In Fossil Glacier Ice.* Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America. **96**, 14: 8017–8021.
- Woese, C. R. Fox, G. E., 1977. *Phylogenetic Structure Of The Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms.* Proceedings Of The National Academy Of Science, USA. **74**, 5088-5090.
- Woese, C., 1987. *Bacterial Evolution.* Microbiol. Rev. **51**: 221–271.
- Wu S-T, Yu S-T, Lin L-P. 2005. *Effect Of Culture Conditions On Docosahexaenoic Acid Production By Schizochytrium Sp. S31.* Process Biochem. **40**: 3103–3108
- Wu, X., Ruan, R., Du, Z., Liu, Y., 2012. *Current Status And Prospects Of Biodiesel Production From Microalgae.* Energies. **5**, 8: 2667–2682.
- Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N. And Ma, C., 2016. *The Effects Of Light, Temperature, And Nutrition On Growth And Pigment Accumulation Of Three Dunaliella Salina Strains Isolated From Saline Soil.* Jundishapur Journal Of Microbiology. **9**, 1:1–9.
- Xia, A. 2015. *Production of Hydrogen, Ethanol And Volatile Fatty Acids From The Seaweed Carbohydrate Mannitol.* Bioresource Technology. **193**: 488–497.
- Xia, A., Jacob, A., Tabassum, M.R., Herrmann, C. and Murphy, J.D., 2016. *Production of hydrogen, ethanol and volatile fatty acids through co-fermentation of macro-and micro-algae.* Bioresource technology. **205**: 118-125.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. and Jia, Y., 2010b. *Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga Scenedesmus sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources.* Ecological Engineering. **36**, 4: 379-381.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. and Ying-xue, S., 2010a. *Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp.* Bioresource technology. **101**, 14: 5494-5500.

- Xin, L.; Hong-ying, H.; Ke, G.; Ying-xue, S. 2010. *Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp.* Bioresour. Technol. **101**, 5494–5500.
- Xu, Y., Milledge, J.J., Abubakar, A., Swamy, R.A.R., Bailey, D. And Harvey, P.J. 2015. *Effects of Centrifugal Stress On Cell Disruption And Glycerol Leakage From Dunaliella Salina.* Microalgae Biotechnology. **1**, 1.
- Xue, J., Niu, Y.F., Huang, T., Yang, W.D., Liu, J.S. and Li, H.Y., 2015. *Genetic improvement of the microalga Phaeodactylum tricornutum for boosting neutral lipid accumulation.* Metabolic engineering, **27**: 1-9.
- Yamano, Takashi, Emi Sato, Hiro Iguchi, Yuri Fukuda, And Hideya Fukuzawa. 2015. *Characterization of Cooperative Bicarbonate Uptake Into Chloroplast Stroma In The Green Alga Chlamydomonas Reinhardtii.* Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America. **112**, 23: 7315–7320.
- Yanagita, Tomomichi., 1990. *Natural Microbial Communities: Ecological And Physiological Features.* Japan Scientific Societies Press. 194-213.
- Yang, G.; Zhou, R.; Tang, T. And Shi, S., 2008. *Simple And Efficient Isolation Of High-Quality Total Rna From Hibiscus Tiliaceus, A Mangrove Associate And Its Relatives.* Preparative Biochemistry And Biotechnology. **38**, 3: 257-264.
- Yanhe Ma, Erwin A. Galinski, William D. Grant, Aharon Oren, And Antonio Ventosa., 2010. *Halophiles 2010: Life In Saline Environments*
- Yannarell A.C. Triplett E.W. 2004. *Within- And Between-Lake Variability In The Composition Of Bacterioplankton Communities: Investigations Using Multiple Spatial Scales.* Applied And Environmental Microbiology. **70**: 214-223.
- Yeesang, C. and Cheirsilp, B., 2011. *Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand.* Bioresource Technology. **102**, 3: 3034-3040.
- Yeh, K.L. and Chang, J.S., 2011. *Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris ESP-31: Implications for biofuels.* Biotechnology journal. **6**, 11: 1358-1366.
- Yeh, K.L. and Chang, J.S., 2012. *Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga Chlorella vulgaris ESP-31.* Bioresource technology. **105**: 120-127.
- Yeh, K.L.; Chang, J.S. 2011. *Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid production of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris esp-31: Implications for biofuels.* Biotechnol. J. **6**: 1358–1366.
- Yentsch, C.M., Horan, P.K., Muirhead, K., Dortch, Q., Haugen, E., Legendre, L., Murphy, L.S., Perry, M.J., Phinney, D.A., Pomponi, S.A. and Spinrad, R.W., 1983. *Flow cytometry and cell sorting: a technique for analysis and sorting of aquatic particles.* Limnology and Oceanography, **28**, 6: 1275-1280.
- Yilmaz, F., Balta, M.T. And Selbaş, R. 2016. *A Review Of Solar Based Hydrogen Production Methods.* Renewable And Sustainable Energy Reviews. **56**: 171–178.
- Ying Shen, Zhijian P., Wenqiao Y., Enrong Mao. 2009. *Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield.* Int J Agric & Biol Eng. **2**, 1: 51
- Yongmanitchai, W., Ward, O. P., 1991. *Growth Of And Omega-3 Fatty Acid Production By Phaeodactylum Tricornutum Under Different Culture Conditions.* Appl Environ Microbiol. **57**, 2: 419–425.
- Yoo, C., Jun, S.-Y., Lee, J.-Y., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M., 2010. *Selection Of Microalgae For Lipid Production Under High Levels Carbon Dioxide.* Bioresource Technology. **101**, 1: 71–74.

- Yoon, J.H., 2003. *Microbulbifersalipaludis* Sp. Nov., A Moderate Halophile Isolated From A Korean Salt Marsh. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*. **53**, 1: 53–57.
- Yoon, Jung Hoon, In G. Kim, Dong Yeon Shin, K. H. Kang Kook Hee, And Yong H. Park. 2003. *Microbulbifer Salipaludis* Sp. Nov., A Moderate Halophile Isolated From A Korean Salt Marsh. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*. **53**, 1: 53–57.
- Yuichi Nogi., 2008. *Bacteria In The Deep Sea: Psychropiezophiles*. Psychrophiles: From Biodiversity To Biotechnology. 73-82.
- Zebec, Z., Rittmann S., Schleper, C. And Tetyana M. 2015. *Meteorite-Associated Growth Physiology Of The Iron Oxidising Extremophile Metallosphaera Sedula*. **17**: 11431.
- Zendejas, F. J., Benke, P. I., Lane, P. D., Simmons, B. A, Lane, T. W., 2012. *Characterization Of The Acylglycerols And Resulting Biodiesel Derived From Vegetable Oil And Microalgae (Thalassiosira Pseudonana And Phaeodactylum Tricornutum)*. *Biotechnology And Bioengineering*. **109**, 5: 1146–54.
- Zendejas, F.J. 2012. *Characterization Of The Acylglycerols And Resulting Biodiesel Derived From Vegetable Oil And Microalgae (Thalassiosira Pseudonana And Phaeodactylum Tricornutum)*. *Biotechnology And Bioengineering*. **109**, 5:1146–1154.
- Zeng, X., Xiaoyi Guo, Gaomin Su, Michael K. Danquah, Shiduo Zhang, Yinghua Lu, Yong Sun, And Lu Lin. 2015. *Bioprocess Considerations For Microalgal-Based Wastewater Treatment And Biomass Production*. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*. **42**: 1385–92.
- Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R. and Queiroz, M.I., 2008. *Production and biochemical profile of the microalgae Aphanothece microscopica Nägeli submitted to different drying conditions*. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **47**, 8: 1305-1310.
- Zevin, A.S., Nam, T., Rittmann, B. And Krajmalnik-Brown, R., 2015. *Effects Of Phosphate Limitation On Soluble Microbial Products And Microbial Community Structure In Semi-Continuous Synechocystis-Based Photobioreactors*. *Biotechnology and Bioengineering*. **112**, 9: 1761-1769.
- Zhang, E.S.B., 2016. *Enhanced microalgae growth and lipid production: a study of cytostatic inhibitors and glycerol assimilation*. Doctoral Thesis. University of Queensland. Australia.
- Zhang, S., Hou, S., Ma, X., Qin, D. And .Chen, T. 2007. *Culturable Bacteria In Himalayan Glacial Ice In Response To Atmospheric Circulation*. *Biogeosciences*. **4**: 1-9.
- Zhao, Xuefei, Kirsten Davis, Robert Brown, Laura Jarboe, And Zhiyou Wen. 2015. *Alkaline Treatment For Detoxification Of Acetic Acid-Rich Pyrolytic Bio-Oil For Microalgae Fermentation: Effects Of Alkaline Species And The Detoxification Mechanisms*. *Biomass And Bioenergy*. **80**: 203–12.
- Zheng, H., Gao, Z., Yin, F., Ji, X., Huang, H., 2012. *Effect Of CO₂ Supply Conditions On Lipid Production Of Chlorella Vulgaris From Enzymatic Hydrolysates Of Lipid-Extracted Microalgal Biomass Residues*. *Bioresource Technology*. **126c**: 24–30.
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X. And Dou, C. 2011. *Disruption Of Chlorella Vulgaris Cells For The Release Of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison Of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, And Microwaves*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **164**, 7: 1215-1224.
- Zheng, S., He, M., Jiang, J., Zou, S., Yang, W., Zhang, Y., Deng, J. and Wang, C., 2016. *Effect of kelp waste extracts on the growth and lipid accumulation of microalgae*. *Bioresource technology*. **201**: 80-88.
- Zhou, X.P., Xia, L., Zhang, D. and Hu, C.X., 2016. *Effect of outdoor conditions on the growth and lipid accumulation of six green algae*. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. **38**, 1: 82-87.
- Zhu, C.; Lee, Y.; Chao, T., 1997. *Effects Of Temperature and Growth Phase On Lipid and Biochemical Composition Of Isochrysis Galbana Tk1*. *J. Appl. Phycol.* **9**: 451–457.

- Zhu, L., 2015. *Biorefinery As A Promising Approach To Promote Microalgae Industry: An Innovative Framework*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **41**: 1376–1384.
- Zhuang, L.L., Wu, Y.H., Espinosa, V.M.D., Zhang, T.Y., Dao, G.H. and Hu, H.Y. 2016. *Soluble Algal Products (Saps) In Large Scale Cultivation Of Microalgae For Biomass/Bioenergy Production: A Review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **59**: 141-148.
- Znachor, P., Rychtecký, P., Nedoma, J. and Visocká, V., 2015. *Factors affecting growth and viability of natural diatom populations in the meso-eutrophic Římov Reservoir (Czech Republic)*. *Hydrobiologia*, **762**, 1: 253-265.
- Zobell, C.E. Y H.C. Upham., 1944. *A List Of Marine Bacteria Including Descriptions Of Six New Species*. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr*. **5**: 239-92.