



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DIVERSIDAD DE ESPECIES DEL GÉNERO
CHLAMYDOMONAS DE LA CANTERA ORIENTE Y
EVALUACIÓN DE SU CRECIMIENTO BAJO
DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NIMBE MAYTÉ ISAIS LÓPEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. EBERTO NOVELO MALDONADO**

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Isais
López
Nimbe Mayté
70215182
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311238606
2. Datos del tutor
Dr.
Eberto
Novelo
Maldonado
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Dalila
Fragoso
Tejas
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Beatriz Irene
Lira
Hernández
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
José Javier
García-Figueroa
Morales
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Mariana Guadalupe
Cartajena
Alcántara
7. Datos del trabajo escrito
Diversidad de especies del género *Chlamydomonas* de la Cantera Oriente y
evaluación de su crecimiento bajo diferentes condiciones de cultivo.
46 pp
2019

Agradecimientos

Al Dr. Eberto Novelo, por todo su apoyo durante la realización de este proyecto. Por enseñarme a sentir las algas sin tocarlas.

A la M. en C. Guadalupe Vidal por el apoyo técnico brindado desde los niveles de taller hasta la culminación de la tesis. Gracias por enseñarme a querer y respetar el laboratorio.

A los sinodales: Dra. Dalila Fragoso Tejas, Dra. Beatriz Irene Lira Hernández, M. en C. Mariana Guadalupe Cartajena Alcántara y M. en C. José Javier García-Figueroa Hernández, por sus comentarios a mi trabajo, que sin duda lo enriquecieron notablemente.

A mis padres, Socorro y Roberto. Gracias por acompañarme todo el tiempo y por enseñarme tanto. A mi hermanito, por enseñarme mucho de lo que sé. Indudablemente no lo hubiera logrado sin ustedes.

A Eréndira, por ser mi compañera y amiga de laboratorio. Gracias por los momentos compartidos durante la realización de mi tesis y por tus comentarios vertidos en ella.

A mi amiga de siempre, Ale, por estar presente en cada paso de este caminar, por alentarme en todo momento.

A TODA la familia Isais García, por estar pendientes de mi proceso formativo y por echarme porras a la distancia.

Y el agradecimiento más especial para mi papá *Poncho*, porque aunque lejos, siempre me alentó a ser la mejor en todo.

Índice

Introducción	1
Taxonomía	2
Requerimientos de cultivo.....	3
Recuento celular	5
Curva y tasa de crecimiento.....	6
Antecedentes	7
Justificación	7
Objetivos	8
Área de estudio	8
Métodos	9
Sitios de colecta	9
Recolección en campo.....	10
Trabajo de laboratorio	11
Identificación de especies	11
Crecimiento poblacional.....	11
Resultados	13
Caracterización ambiental.....	13
Caracterización taxonómica.....	14
Crecimiento poblacional.....	16
Selección de la especie modelo con mayor crecimiento.....	19
Cultivos con diferentes intensidades de luz.....	23
Comparación entre tratamientos de <i>C. grovei</i>	25
Discusión	31
Caracterización taxonómica.....	31
Crecimiento poblacional.....	32
Nutrientes.....	32
pH	34
Iluminación	35
Conclusiones	36
Literatura citada	37

Resumen

Varias especies del género *Chlamydomonas* se han consolidado como un grupo modelo debido a que han ayudado a estudiar procesos básicos de las microalgas como motilidad, fotosíntesis, respuestas a estímulos, reconocimiento célula-célula, entre otros. No obstante, este aspecto de su conocimiento contrasta con lo estudiado respecto a su dinámica poblacional y los estudios sobre su presencia o ausencia en ambientes determinados. Puesto que la Cantera Oriente presenta condiciones ambientales complejas, se estudiaron dos cuerpos de agua (vaso regulador y lago principal) con la finalidad de conocer la diversidad de especies presentes del género, a partir de cultivos unialgales, se identificaron y describieron cinco especies; una de ellas es un nuevo registro para México. Se obtuvieron curvas de crecimiento como un primer acercamiento al conocimiento de la dinámica poblacional que presentan las especies. La especie *Chlamydomonas grovei* obtuvo una tasa de crecimiento por encima de las demás especies (0.038 cels/día), por lo que se sometió a diferentes condiciones de cultivo para evaluar las fluctuaciones en el crecimiento mediante curvas de crecimiento y se calcularon también las tasas de crecimiento para cada tratamiento utilizado. Así, se determinó que las condiciones de cultivo ideales para la especie son: adicionar más nitrógeno, iluminación tenue y pH básico.

Introducción

La Cantera Oriente forma parte de la cuenca hidrológica del Valle de México y corresponde a la Zona de Amortiguamiento A3 de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA). Dentro de las unidades ambientales que caracterizan la Cantera Oriente, sobresalen los cuerpos de agua que conforman el paisaje lacustre constituyendo un «oasis» inédito como paisaje de la Ciudad de México (Lot, 2007).

Los lagos de la Cantera Oriente presentan condiciones complejas en cuanto a las influencias externas relacionadas con el origen del agua, la mezcla con el vaso regulador de la zona deportiva y las filtraciones (Lot, 2007), por lo que las condiciones acuáticas son poco frecuentes, razón por la cual el estudio de las microalgas presentes cobra una relevancia significativa respecto a la relación y riqueza florística del Valle de México.

Las microalgas fitoplanctónicas son un grupo heterogéneo de organismos fotosintéticos, que entre sus propiedades ecológicas se destaca la de ser los eslabones primarios en la mayor parte de las redes tróficas (Lee, 1980). Dentro del grupo de las microalgas, el género *Chlamydomonas* se ha consolidado como un grupo modelo para el estudio de distintos procesos biológicos por su fácil cultivo y por la posibilidad de desarrollarse tanto autotrófica como heterotróficamente; también, en *Chlamydomonas reinhardtii* el cromosoma de su cloroplasto está completamente secuenciado. Desde el punto de vista biotecnológico, el uso de cultivos de *Chlamydomonas* cobra importancia en producción de glicerol y proteínas recombinantes.

Las células de *Chlamydomonas* tienen forma ovoide, elipsoidal o esférica, con un tamaño comprendido entre los 9 y 12 μm de longitud y entre 4 y 8 μm de diámetro. La estructura celular es claramente polar, con dos flagelos situados en el polo anterior de la célula y un

único cloroplasto en forma de copa que ocupa la mayor parte del espacio intracelular que contiene uno o más pirenoides. El cloroplasto suele rodear al núcleo que está situado en el centro y tiene un nucléolo prominente (García y Roselló, 1998).

Taxonomía

Desde el punto de vista taxonómico se clasifican como se detalla a continuación:

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Chlamydomonadales

Familia: Chlamydomonadaceae

Género: *Chlamydomonas*

Muchas especies han sido identificadas con base en observaciones morfológicas, incluyendo tamaño y forma de la célula, forma y posición del cloroplasto y pirenoides, longitud del flagelo, forma de la papila, número de vacuolas contráctiles y otras características visibles (Butcher, 1959; Dangeard, 1965; Cann y Pennick, 1982; Ettl, 1976, 1983; Hirayama *et al.*, 2001). Sin embargo, la identificación de morfoespecies de *Chlamydomonas* en el sentido tradicional posee dificultades en el presente, por lo que el interés que se tiene en su identificación es notable, ya que su presencia y características definen cualitativamente el medio en que viven.

En particular, el género *Chlamydomonas* es bastante extenso y contiene alrededor de 800 especies identificadas bajo los criterios mencionados anteriormente, sin embargo, de acuerdo a análisis filogenéticos, las especies de *Chlamydomonas forman* ocho linajes monofiléticos dentro de la clase Chlorophyceae. Resultados interesantes incluyen el

hecho de que hay cepas pertenecientes a otros géneros están en el mismo linaje de algunos clusters de las especies del género *Chlamydomonas* (Pröschold *et al.*, 2001).

Aunado a lo anterior, las condiciones ambientales en que se desarrollen las especies desencadenarán procesos fisiológicos característicos de especies en condiciones ambientales. Por ello, los cultivos de algas se han utilizado para dilucidar diversos aspectos sobre la biología de las microalgas, particularmente en lo referente a la variabilidad morfológica, plasticidad fisiológica y atributos bioquímicos (Stein, 1979).

Considerando que los lagos de la Cantera Oriente son artificiales, sus condiciones fluctúan a lo largo del año y por tanto la presencia y abundancia de las especies. En particular, el género *Chlamydomonas* abunda significativamente en época de primavera y principios de verano (observación personal no publicada), sin embargo, se desconocen los factores que determinan su crecimiento y reproducción en estos ambientes.

Requerimientos de cultivo

En una población de microalgas el crecimiento está condicionado por muchos factores, entre los principales están la división de las celular y también a la actividad fotosintética. La tasa de crecimiento está determinada por varios factores externos, principalmente: temperatura, iluminación, fuente de carbono y elementos minerales. Para la temperatura, así como para la iluminación existen valores óptimos en el crecimiento de los cultivos, los cuales dependen de la especie. Las concentraciones de CO₂ y de O₂, son también factores condicionales en el crecimiento debido a que son dependientes de la tasa de fotosíntesis (Alfonseil y Fernández, 1985).

Si bien, el balance de los nutrientes es un factor que influye directamente sobre la dinámica poblacional de las microalgas, el fósforo es a menudo citado como el nutriente limitante en el control del fitoplancton en los lagos; no obstante, esta conclusión deriva

mayormente de estudios realizados en regiones templadas de América del Norte y Europa (Elser *et al.*, 1990). A pesar de ello, se ha mantenido la idea simplista de que el crecimiento algal quedará limitado por el fósforo en la mayoría de los lagos.

En realidad, según algunos estudios en la región tropical los crecimientos algales están más frecuentemente limitados por el nitrógeno que por el fósforo (Vincent *et al.*, 1984), estas suposiciones se basan en que el nitrógeno es un gas soluble en agua y existen organismos como cianobacterias y otras bacterias que lo pueden fijar e incorporarlo en el medio; contrariamente, el fósforo forma compuestos insolubles y se establece un equilibrio con los sedimentos o con la roca y no con la atmósfera, por lo tanto su disponibilidad para los organismos se vería limitada (Margalef, 1983), pero cuando el balance de los principales nutrientes es cuidadosamente manipulado en un ambiente confinado pueden verificarse los efectos de la eutrofización artificial en todos los niveles tróficos. Los resultados obtenidos darán una visión sobre el papel que cada nutriente desempeña sobre los organismos presentes en el ambiente manipulado (Henry y Tundisi, 1982).

Por otra parte, la intensidad de luz es uno de los factores más importantes para la tasa fotosintética de las microalgas. Los sistemas de cultivos de microalgas pueden ser iluminados por luz artificial, luz solar o ambas. La tasa específica de crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de la luz, de esta manera, el crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta. Cuando la tasa de crecimiento llega a su punto máximo, ésta disminuye con el incremento de la intensidad lumínica debido a la fotoinhibición (Bohne y Linden, 2002). Este patrón de crecimiento en relación con la intensidad de luz se ha observado en la mayoría de las especies de microalgas (Fabregas *et al.*, 1998); sin embargo, la intensidad y régimen de iluminación es propio de cada especie de microalgas. En relación con esto, las actividades biológicas del

conjunto de organismos dentro de un cuerpo de agua influyen en su química, como es el caso del pH que resulta alterado por la fotosíntesis, la respiración y la asimilación de nitrógeno (Lampert y Sommer, 1997).

Recuento celular

El crecimiento de un cultivo de microalgas se expresa como el incremento de biomasa ya sea en forma de número de células (cels/mL), en peso seco (total y orgánico), cantidad de proteína, de pigmentos, medidos directamente o en unidades arbitrarias de fluorescencia, volumen de células o carbono celular total, calculado para un periodo de tiempo o una fase de crecimiento específica (Arredondo, *et al.*, 1997). Este incremento puede ser estimado por diferentes métodos, entre los cuales los más utilizados son el recuento celular a través del microscopio o mediante contadores de partículas, la determinación de los cambios de densidad óptica del cultivo por espectrofotometría o finalmente la cuantificación de la biomasa en peso seco total u orgánico, esto dependerá de los objetivos y necesidades de la investigación.

Para realizar el recuento celular se han diseñado diferentes cámaras que contienen un volumen determinado de muestra entre una lámina y una laminilla rígida (cubreobjetos especial). La que se usa con mayor frecuencia para cultivos de microalgas es el hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad graduada con reglilla Neubauer. Del mismo modo, la concentración celular puede ser estimada indirectamente usando la densidad óptica del cultivo, que es una técnica menos precisa del recuento directo, pero permite una evaluación rápida de la concentración microalgal (Arredondo y Voltolina, 2007).

Curva y tasa de crecimiento

En general, las condiciones ambientales cambian con la edad del cultivo, por lo cual también se modifica la velocidad de crecimiento poblacional; esto permite conocer diferentes fases de crecimiento que sirven para describir la dinámica de la concentración celular o de biomasa, para lo cual se utiliza el parámetro poblacional definido como tasa de crecimiento (r), la cual es una tasa de cambio de biomasa debido a procesos anabólicos (fotosíntesis) y procesos catabólicos (respiración) (MacIntyre y Cullen, 2005). La representación de las fases de crecimiento se ilustran en la figura 1.

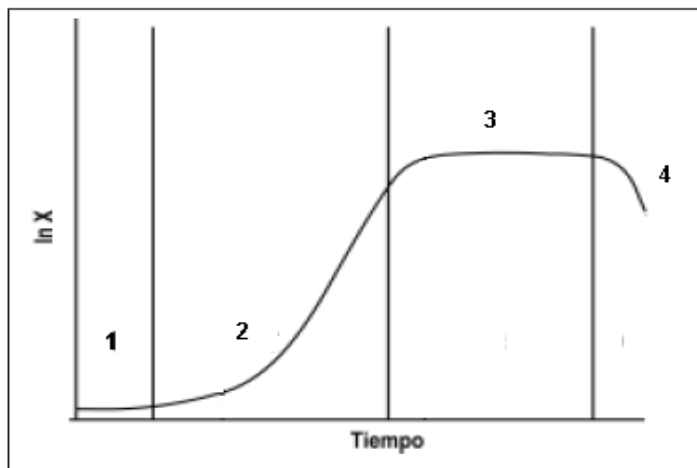


Fig. 1. Curva de crecimiento típica, en la cual se muestran las diferentes fases de crecimiento: 1 fase lag; 2 fase exponencial; 3 fase estacionaria y 4 fase de muerte. Modificada de Arredondo y Voltolina, 2007.

El tipo de cultivo más usual en un trabajo experimental es uno en el cual un volumen limitado de medio conteniendo los nutrientes orgánicos e inorgánicos necesarios es inoculado con cierto número de células y después es expuesto a condiciones adecuadas de luz, temperatura y aireación.

Antecedentes

Respecto a la composición algal estudiada en la Cantera Oriente y que hace referencia al género *Chlamydomonas* sólo se han reportado cuatro formas distintas (Novelo *et al.*, 2009) sin hacer ninguna otra descripción, por lo que este trabajo representa una primera aproximación hacia este género, ya que su estudio y presencia podría contribuir a entender la biología de estos organismos. Sin embargo, para los canales de Xochimilco, Figueroa-Torres *et al.*, (2015) registraron tres especies de *Chlamydomonas*. Ambos sitios, como ecosistemas acuáticos, son de gran interés en la ecología, no solo por la diversidad biológica que albergan sino porque el conocimiento de la ficoflora permite identificar cambios en la calidad del agua. Aunado a lo anterior, la calidad del agua de la Cantera Oriente se mantiene dentro de los límites de la mesotrofia (Novelo *et al.*, 2007), mientras que el agua que reciben los lagos de la zona de Xochimilco provienen principalmente de plantas de tratamiento y contiene una gran cantidad de nutrimentos (Juárez-Figueroa, *et al.* 2003).

Justificación

Dada la complejidad de los cuerpos de agua que se encuentran en la Cantera Oriente, realizar investigaciones sobre la ficoflora presente, entre ellas las enfocadas en el género *Chlamydomonas*, el cual se ha consolidado como un grupo modelo dentro de las microalgas para el estudio de diferentes aspectos biológicos (Harris, 2001) ya que su estudio y presencia podría ayudar a explicar mucho de la biología de estos organismos; sin embargo, el desarrollo del conocimiento de la biología de *Chlamydomonas* contrasta con el desconocimiento de otros aspectos como su dinámica poblacional y los factores ambientales que determinan su presencia o ausencia en un ambiente dado. Por esta

razón su estudio y conocimiento cobra una importancia mayor en el estudio de la flora algal de los lagos de la Cantera.

Objetivos

- Describir e identificar las especies de *Chlamydomonas* presentes en dos cuerpos de agua de la Cantera Oriente mediante fotografías obtenidas a partir de material preservado y de cultivo.
- Someter a una de las especies formadoras de florecimientos a diferentes condiciones de cultivo (nitrato en el medio, pH e iluminación) con el fin de evaluar las fluctuaciones en el florecimiento.
- Encontrar las condiciones de cultivo óptimas para la especie *Chlamydomonas grovei* y que se tome como modelo para futuros cultivos.

Área de estudio

Ubicada al sur de la Ciudad de México, la Cantera Oriente corresponde a la Zona de Amortiguamiento A3 de la Reserva ecológica del Pedregal de San ángel de Ciudad Universitaria (REPSA), caracterizada por su ubicación discontinua y externa al resto del campus de Ciudad Universitaria. Este sitio es resultado de la erupción del volcán Xitle y sus derrames de lava forman parte de un complejo que se extiende por 80 km² desde Cuicuilco, Copilco y Chimalistac (Lot, 2007). Cuenta con un ambiente lacustre muy distinto al matorral xerófilo de la mayor parte de la reserva, por lo que la diversidad de organismos que ahí se refugian es característica.

Actualmente el área de la Cantera exhibe una depresión de 30 m de profundidad y una superficie de 0.075 km², como resultado de un proceso de restauración ecológica, tras la extracción de roca basáltica con fines de pavimentación, se pueden distinguir 4 principales unidades ambientales: paisaje lacustre y de humedales que son resultado del proceso de filtración del subsuelo e influencias externas; paisajes de jardines y paisajes construidos (Lot, 2007).

En lo que se refiere al paisaje lacustre y de humedales, los cuerpos de agua se ubican en las porciones más bajas de la reserva, principalmente hacia el sur y la porción este, debido a las características topográficas del terreno. Existen 5 cuerpos de agua que suman una superficie total de 11, 906.45 m² que representa el 14.36 % del área total de la reserva (Ortiz *et al.*, 2007). Con una ubicación geográfica en los 19°19'03.8" N y 99°10'23.4" O.

Métodos

Sitios de colecta

Se colectó en dos lagos de la Cantera Oriente: el vaso regulador y el lago principal. El vaso regulador (19°19'00.01" N, 99°10'21.03" O) y el lago principal (19°19'02.78" N, 99°10'22.00" O) están divididos por bordos construidos, ambos están formados por el manto freático y las filtraciones, el vaso regulador recibe directamente agua de la zona deportiva que pasa por una planta de tratamiento primaria (figura 2).



Fig. 2. Sitios de recolección en la Cantera Oriente (LP: lago principal; VR: vaso regulador).

Google Earth, 2018

Recolección en campo

En marzo de 2016 se colectaron muestras de 20 mL (10 L concentrados en 250 mL y se tomaron alícuotas de 20 mL) en ambos sitios con una red de fitoplancton de una apertura de malla 10 μm . En cada punto de muestreo se realizaron mediciones de factores fisicoquímicos con equipo de campo, se midieron valores de pH, conductividad y temperatura (Conductronic PC-18) así como cantidad de oxígeno disuelto (Conductronic Ox-25

Trabajo de laboratorio

Identificación de especies

Se analizaron las muestras obtenidas con la finalidad de aislar células de *Chlamydomonas* en tubos de 10 mL con medio Bold Basal de concentración 1N con un pH de 6.8. Cuando se observó una concentración considerable se separaron aquellas células que no se identificaran como especies de *Chlamydomonas*, esto para obtener cultivos unialgales. Cada forma se cultivó por separado para su identificación de acuerdo con Ettl (1983), Dillard (1989), Huber-Pestalozzi (1961) y John *et al.*, (2002).

A partir de estos cultivos, se realizaron preparaciones frescas que fueron observadas al microscopio (Nikon Eclipse E200), la identificación de las diferentes especies de *Chlamydomonas* se llevó a cabo mediante la observación de caracteres como forma y tamaño para obtener una aproximación de la diversidad de algas presente.

Crecimiento poblacional

A partir de los cultivos unialgales obtenidos se aislaron 10 células de cada uno para medir el crecimiento poblacional con un hemocitómetro (Neubauer mejorado) (Guillard y Sieracki, 2005).

Después de conocer la dinámica poblacional, se aisló una alícuota del cultivo que presentó mayor crecimiento a través del tiempo en medio Bold Basal de concentración 3N (el nutriente principal es nitrato de sodio (NaNO_3)) y medio BG11₀ (medio BG11 sin adición de NaNO_3) en el momento en que los cultivos madre se encontraron en la fase estacionaria para conocer los cambios fisiológicos ocasionados por el cambio de concentración de nitrógeno en el medio. La concentración molar final de nitrógeno a la cual estuvieron sometidas las células fue de 8.82×10^{-3} M.

Asimismo, se aisló 1 mL de cultivo en medio Bold Basal con pH 7.5 y 8.5, de cada uno se evaluó un cultivo control y 5 réplicas; también los cultivos fueron sometidos a diferentes intensidades de luz en diferentes cámaras de crecimiento (31.2 μmol (máx)/13.7 μmol (min) y 16.2 μmol (máx)/13.7 μmol (min)). En los tres casos se utilizó el espectrofotómetro (Hach DR 1900) para medir semanalmente la concentración de los cultivos. En el caso de los cultivos control para el tratamiento en pH 7.5 se mantuvo con una solución de HCl (1N) y para el pH 8.5 se mantuvo equilibrado con una solución de NaOH (1N).

En total se trabajaron 27 cultivos para realizar todos los ensayos.

Con los datos obtenidos del número de células a partir de la densidad óptica y conteo en cámara Neubauer se determinó la tasa de crecimiento (r), de acuerdo con la ecuación presentada por Guillard (1973).

$$dN/dt=Rn$$

Al despejar la ecuación se obtiene:

$$r = \frac{\ln(Nt/N0)}{\Delta t}$$

Donde $N0$ = es el tamaño de la población al inicio del intervalo; Nt = tamaño de la población al final del intervalo; r = tasa intrínseca de crecimiento; Δt = tiempo transcurrido.

También con la finalidad de relacionar las condiciones evaluadas, se realizaron gráficas comparativas de algunas de ellas y así reconocer cuál o cuáles de ellas tienen más influencia sobre esta especie. Es preciso destacar que las gráficas fueron estandarizadas respecto a los días de tratamiento para poder realizar dicho comparativo.

Para comprender las relaciones que existen entre las variables se realizó una gráfica de radar con Microsoft Excel utilizando los valores máximos y mínimos de cada variable.

Resultados

Caracterización ambiental

En el momento del muestreo, ambos cuerpos de agua presentaron tendencia hacia la alcalinidad, la conductividad fue ligeramente más elevada en el vaso regulador, y respecto a la temperatura y al oxígeno disuelto no hubo diferencias significativas. Los factores fisicoquímicos se encuentran detallados en el cuadro 1.

Cuadro 1. Factores fisicoquímicos de los lagos donde se colectaron las muestras.

Variables	Vaso regulador	Lago Principal
pH	8.5	10.5
Conductividad (K_{25})	431 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$	397 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$
Temperatura.	19.2 °C	21.2 °C
Oxígeno disuelto	29.5 mg/L	29.2 mg/L

Caracterización taxonómica

Se identificaron 5 morfoespecies de *Chlamydomonas*, las que se describen a continuación:

Chlamydomonas monadina Stein 1878

100x

Célula esférica de 9.87 μm de diámetro, posee una papila pequeña y un cloroplasto en forma de copa. El pirenoide es mediano en forma de anillo.

Distribución: esta especie se distribuye en Groenlandia y Europa

Chlamydomonas grovei West 1916

100x

Célula esférica de 3.2 μm de diámetro, la papila no es visible y el cloroplasto tiene forma de copa.

Distribución: especie planctónica en lagos, registrada en Argentina.

Chlamydomonas globosa Snow 1902

100x

Célula esférica de 4.7 μm de diámetro, la papila es pequeña igual que el pirenoide basal.

El cloroplasto es en forma de copa.

Distribución: especie que se distribuye ampliamente en México, Argentina y Estados Unidos en ambientes lénticos y lóticos, así como terrestres bajo diferentes formas de vida: planctónica, edáfica y perifítica.

Chlamydomonas snowiae Printz 1914

100x

Célula cilíndrica de 5 μm de ancho y 10 μm de largo, ligeramente en forma de pera; la papila es cónica y el cloroplasto en forma de copa. El pirenoide basal es grande.

Distribución: registrada en Estados Unidos, Polonia y México. Presente en ambientes terrestres, lénticos y lóticos; formas de vida planctónica, endozoica (puesta de rana), edáfica y perifítica.

Chlamydomonas conversa Korshikov 1927

Nuevo registro para México.

100x

Célula elipsoidal a cilíndrica de 8.4 μm de ancho y 14.4 μm de largo, la papila es prominente y el cloroplasto parietal. Los extremos están divididos longitudinalmente y posee un pirenoide basal.

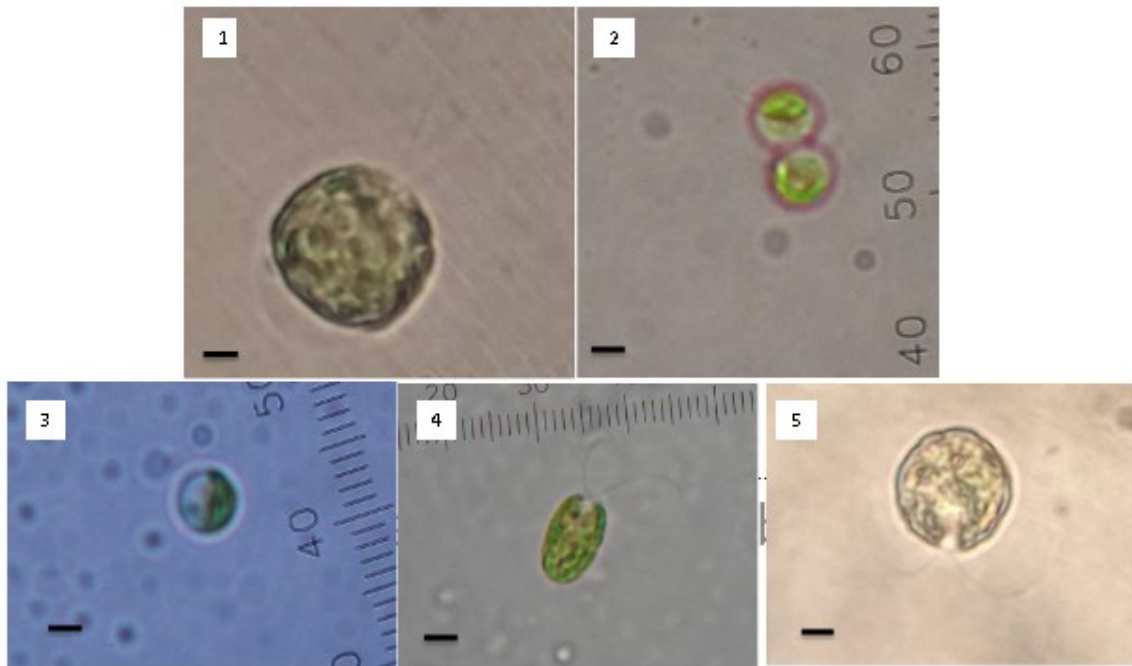


Fig. 3. Especies identificadas en los lagos de las Cantera Oriente. 1. *C. monadina*. 2. *C. grovei*. 3. *C. globosa*. 4. *C. snowiae*. 5. *C. conversa*. Marca= 2 μ m

Crecimiento poblacional

Las siguientes curvas representan el primer acercamiento al conocimiento de la dinámica poblacional de estas especies de *Chlamydomonas*, a partir de estas se comenzaron los ensayos bajo diferentes condiciones de cultivo. Dado que *C. grovei* presentó la tasa de crecimiento más alta a través del tiempo, fue esta especie la que se consideró para realizar dichos ensayos.

La especie *C. snowiae* fue observada en solo una ocasión en las muestras colectadas, razón por la cual no se mantuvo en cultivos; se logró identificar puesto que tuvieron todos

los criterios necesarios para hacerlo. Los cultivos de *C. conversa* no se mantuvieron axénicos, por lo que no hay curvas de crecimiento para estas especies.

Estas curvas se obtuvieron a partir de conteos en hemocitómetro de tres especies de *Chlamydomonas* cultivadas en medio Bold Basal 1N. Cabe destacar que para las tres especies el inóculo inicial en cels/mL fue de 200 y el tiempo total del tratamiento fue de 48 días.

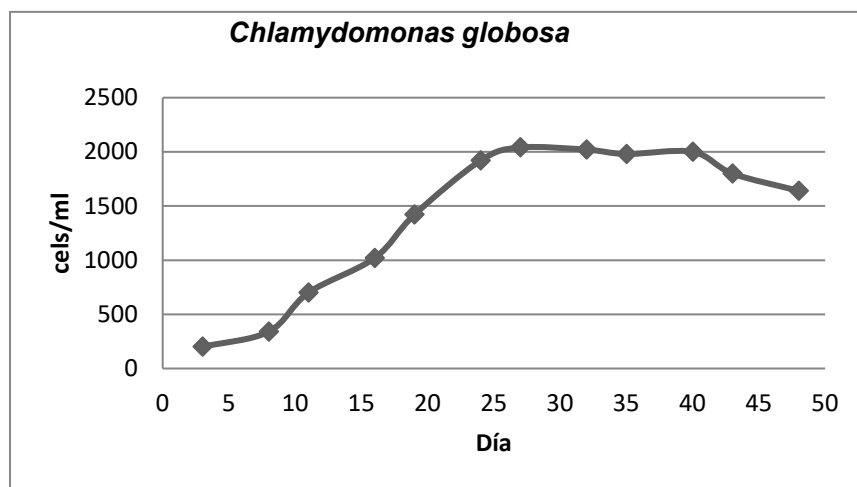


Fig. 4. Curva de crecimiento de la especie *Chlamydomonas globosa*

La curva de la figura 4 muestra que entre el día 8 y 11 se duplicó la población de la especie, el punto máximo de la fase exponencial se alcanzó en el día 27, la fase estacionaria tuvo una duración de 13 días y comenzó la fase de declinación. El valor de r para esta población fue de 0.0369 cels/día.

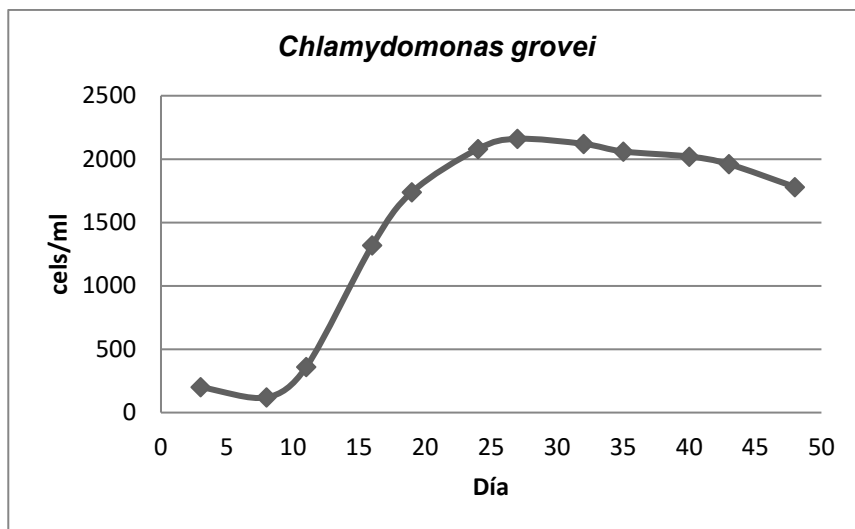


Fig. 5. Curva de crecimiento obtenida de la especie *Chlamydomonas grovei*

En la curva de crecimiento de la especie *Chlamydomonas grovei* (figura 5), se muestra que duplicó su población entre los días 11 y 16; en el día 27 alcanzó el punto máximo de la fase exponencial. La fase exponencial duró 16 días hasta que comenzó a decrecer la población. Esta especie tuvo el mayor crecimiento en el tiempo al obtener un valor de r de 0.038 cels/día.

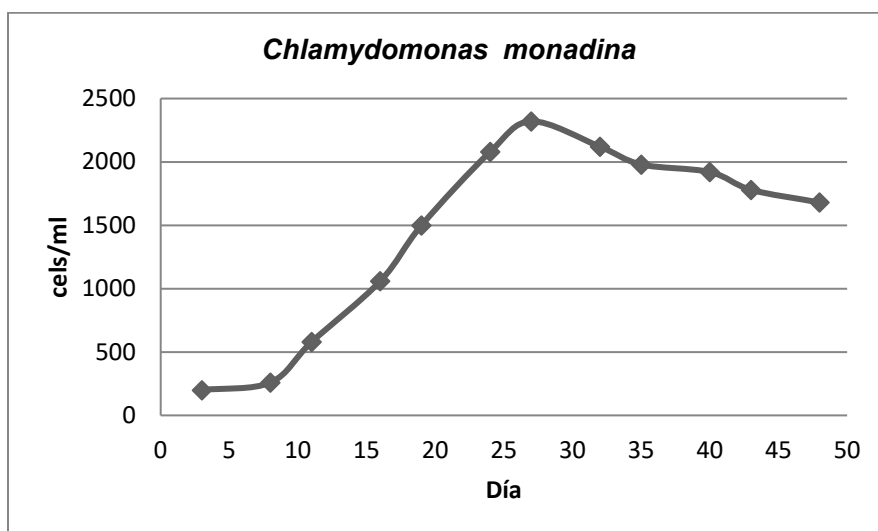


Fig. 6. Curva de crecimiento de la especie *Chlamydomonas monadina*

La especie *Chlamydomonas monadina* (figura 6) duplicó su población entre los días 8 y 11 a partir del inóculo inicial, el punto máximo de la fase exponencial se alcanzó en el día 27 e inmediatamente después de este punto la población comenzó a decrecer. El valor de la tasa de crecimiento fue de 0.037 cels/día.

Selección de la especie modelo con mayor crecimiento

Las siguientes curvas corresponden a las pruebas realizadas con la especie *Chlamydomonas grovei*. En primer lugar, lo referente a lo obtenido con los tratamientos en medio con triple nitrógeno y sin nitrógeno:

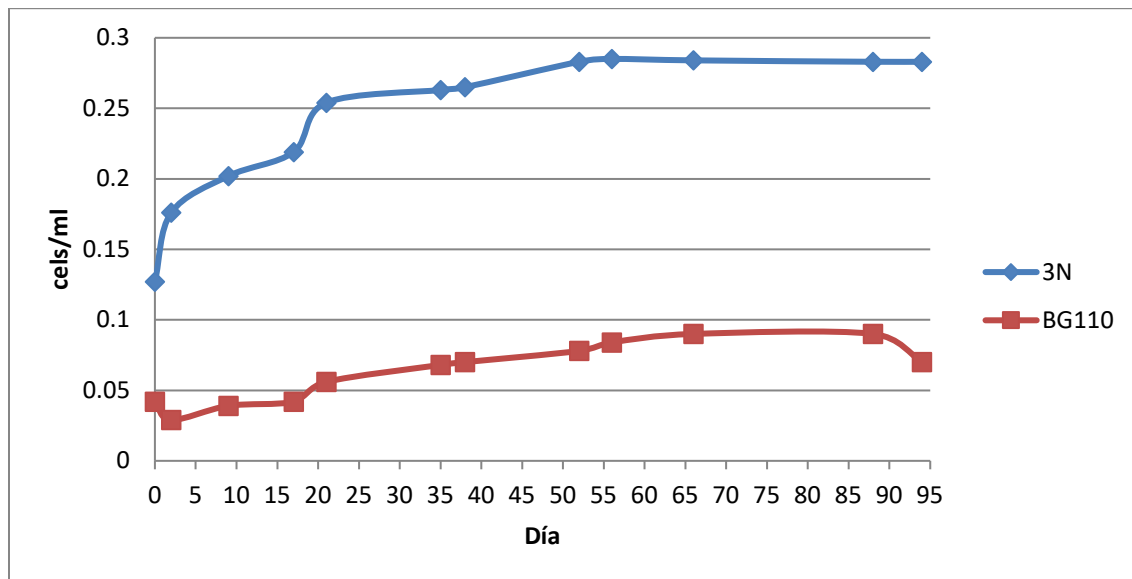


Fig. 7. Curvas de crecimiento obtenidas a partir de la densidad celular en los tratamientos con triple nitrógeno y sin nitrógeno.

En la figura 7, se observó que para el tratamiento con medio 3N (triple nitrógeno) la fase exponencial de la especie *C. grovei* comenzó al día dos del tratamiento con una duración de 54 días, la fase estacionaria se mantiene por 38 días. En los 94 días que duró el

tratamiento no se registró la fase de muerte. El valor de la tasa de crecimiento fue de 0.133 cels/día. Respecto al tratamiento sin nitrógeno, la especie en el día dos del tratamiento presentó un decaimiento en la población que se recuperó drásticamente en la fase exponencial, la cual duró 64 días y comenzó la fase de muerte. La tasa de crecimiento tuvo un valor de 0.085 cels/día.

En la figura 8, se muestran los resultados obtenidos tras el sometimiento de la especie *C. grovei* a pH 7.5; el pH al final del tratamiento fue de 7.56 y respecto al pH final de las réplicas fueron 7.85, 7.93, 7.95, 7.83 y 8.2 respectivamente.

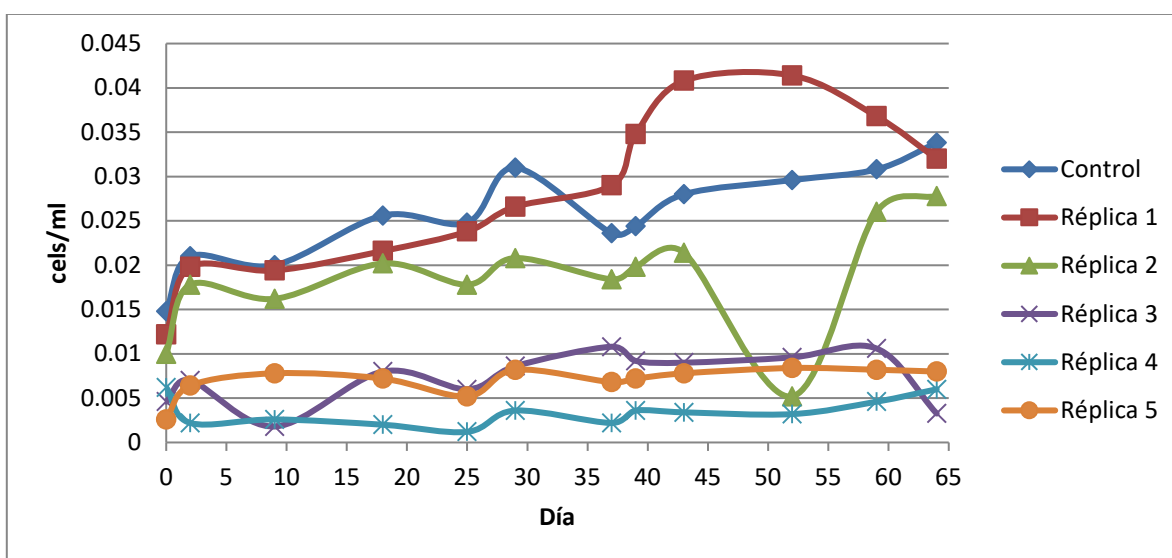


Fig. 8. Curvas de crecimiento obtenidas del cultivo control y las réplicas de la especie *C. grovei* sometida a pH 7.5. El tratamiento tuvo una duración de 64 días.

La muestra control no presentó un patrón de crecimiento claro, lo más evidente es el decaimiento de la población en el día 29 que duró 8 días, posterior a esto retoma un crecimiento exponencial claramente diferenciable (valor de $r=0.014$ cels/día). En cambio, la réplica 1 presentó siempre un crecimiento exponencial hasta el día 52 del tratamiento donde comenzó el decaimiento de la población.

La réplica 2 también presentó una dinámica poblacional difusa hasta el día 43, donde hubo un decaimiento drástico y 9 días después se recuperó la población. En las réplicas 3, 4 y 5 no se detectaron fases de crecimiento claramente definidas, sin embargo, de acuerdo con los valores de las tasas de crecimiento calculadas, la muestra 5 es la población más estable ($r=0.224$ cels/día) puesto que no presentó decaimientos en la población durante todo el tratamiento.

En la figura 9 se muestran los resultados del tratamiento con pH 8.5; el pH final fue de 8.53, mientras que para las réplicas fue de 8.61, 8.68, 8.43, 8.52 y 8.73, en el orden respectivo.

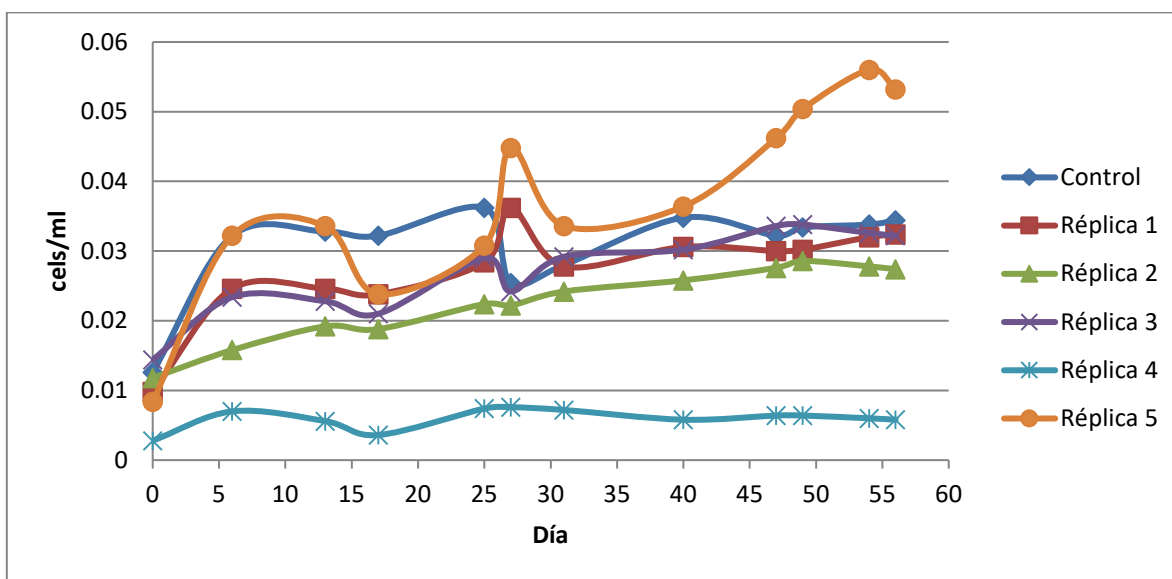


Fig. 9. Curvas de crecimiento obtenidas para el tratamiento en pH 8.5 para la especie *C. grovei*. La duración del tratamiento fue de 56 días.

El cultivo control alcanzó el punto máximo de la fase exponencial en el día 6 la cual se presentó desde el día que el cultivo fue inoculado. 19 días después la población decae, pero retoma su crecimiento durante 13 días. El valor de la tasa de crecimiento para este cultivo fue de 0.200 cels/día.

La réplica 1, en el arranque del cultivo, tuvo un comportamiento similar al cultivo control, la mayor densidad de la fase exponencial se alcanzó en el día 6; sin embargo, 21 días después presentó un pico en el crecimiento seguido de un decaimiento. Posteriormente, se detectó una fase estacionaria. El valor de r fue de 0.239 cels/día. La dinámica poblacional de la réplica 2 fue muy clara puesto que siempre presentó un crecimiento ascendente, sin decaimientos drásticos hasta el día 49 del cultivo ($r=0.168$ cels/día).

Aunque la réplica 3 también se comportó de manera variable, se puede observar cómo en el día 31 alcanzó el valor más alto, lo que marcó el final de la fase exponencial y posteriormente su comportamiento fue estable. Para este caso el valor de la tasa de crecimiento fue de 0.160 cels/día. La réplica 4 se mantuvo siempre con valores por debajo de los demás tratamientos, después del día 6 se detectó un decaimiento; sin embargo, a partir del día 25 la población se mantuvo estable con un valor de r de 0.145 cels/día. Finalmente, la réplica 5 presentó la tasa de crecimiento más alta ($r=0.369$ cels/día), y pesar de haber tenido dos decaimientos drásticos (día 13 y 27) a través del tiempo, presentó un repunte en la población a partir del día 31, posterior al decaimiento del día 27.

Cultivos con diferentes intensidades de luz

Sobre los ensayos bajo diferentes niveles de iluminación, de acuerdo con las condiciones del laboratorio se eligieron dos rangos de iluminación (máximo y mínimo) y tres réplicas del cultivo elegido, los resultados son los siguientes (figura 10):

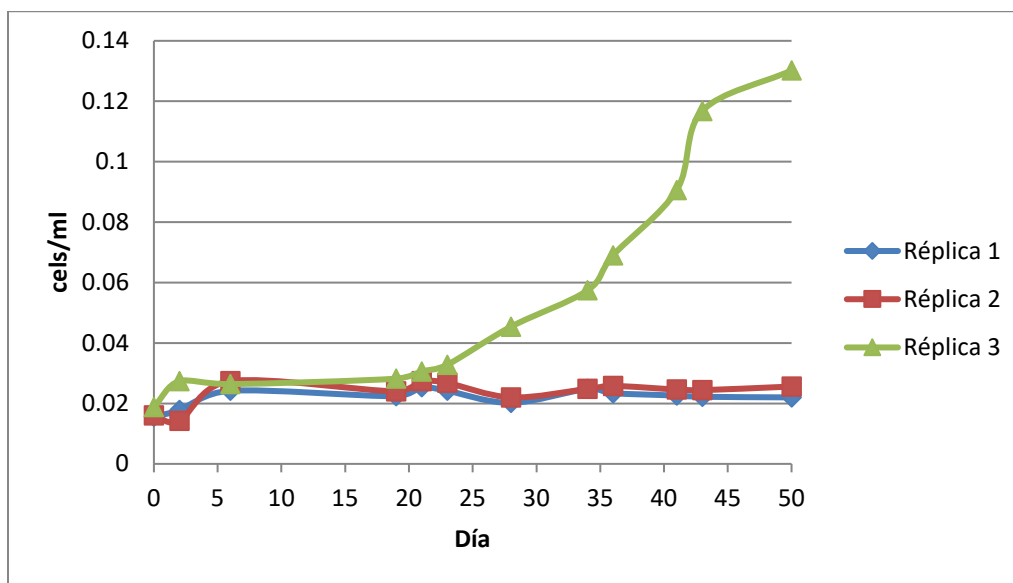


Fig. 10. Curvas de crecimiento de las réplicas del cultivo de *C. grovei* en un rango de iluminación de 31.2 μmol (máx)/13.7 μmol (min) (máxima/ iluminación1).

Se observó que a pesar de que las tres muestras estuvieron sometidas a las mismas condiciones de iluminación, la muestra 3 presentó un crecimiento favorable ($r=0.276$ cels/día) respecto a las muestras 1 y 2 ($r=0.049$ cels/día y 0.067 cels/día, respectivamente). La fase exponencial, para la réplica 3, se registró al día 2 de ser inoculado el cultivo, la fase estacionaria se mantuvo por 17 días y se evidencia un aumento en la población el cual permaneció durante los 50 días de tratamiento. Respecto a las muestras 1 y 2, en el día 6 alcanzaron el punto máximo de la fase exponencial y se mantienen en fase estacionaria hasta el final del tratamiento.

Luego, las curvas obtenidas tras la evaluación de la especie en el segundo rango de iluminación:

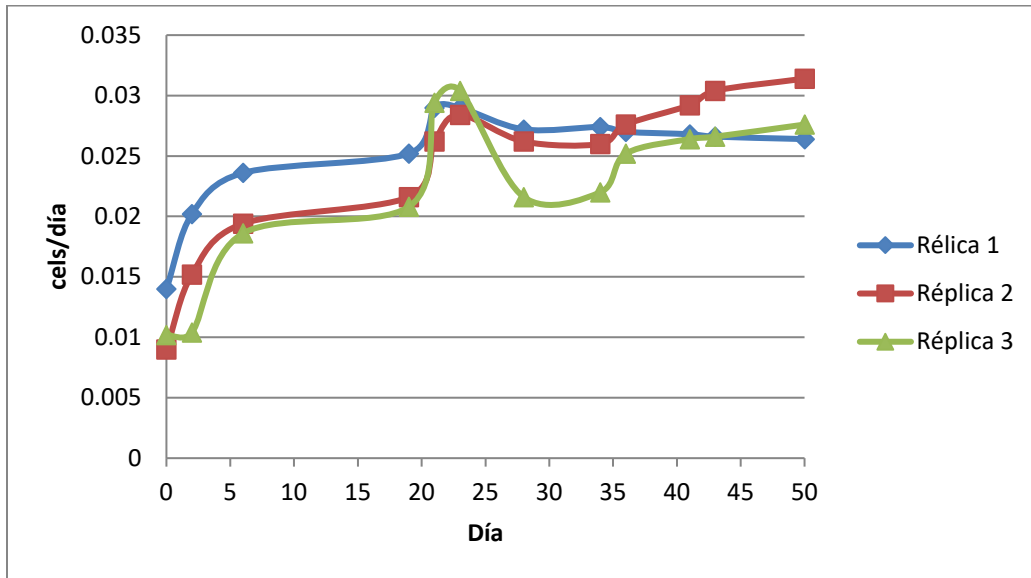


Fig. 11. Curvas de crecimiento de las réplicas del cultivo de *C. grovei* en un rango de iluminación de 16.2 μmol (máx)/13.7 μmol (min) (mínima/ iluminación²).

A diferencia del tratamiento anterior, en la figura 11 se observa que todas las muestras presentaron patrones de comportamiento poblacional similares. La tasa de crecimiento más alta se presentó en la réplica 2 con un valor de 0.178 cels/día. De acuerdo con los valores de r calculados, las muestras 1 y 2 presentaron el valor máximo de la fase exponencial al día dos a partir de la inoculación del cultivo, mientras que la muestra 3 hasta el día 6. Asimismo, los tres casos presentan picos evidentes de crecimiento seguidos de decaimientos de las poblaciones, no obstante, se mantuvieron en fase estacionaria hasta el final de las mediciones, excepto la réplica 2 que presentó una alza en la población tras este decaimiento.

Comparación entre tratamientos de *C. grovei*

En cuanto a las gráficas comparativas, en primer lugar, se presenta la correspondiente al medio 3N y la iluminación 1:

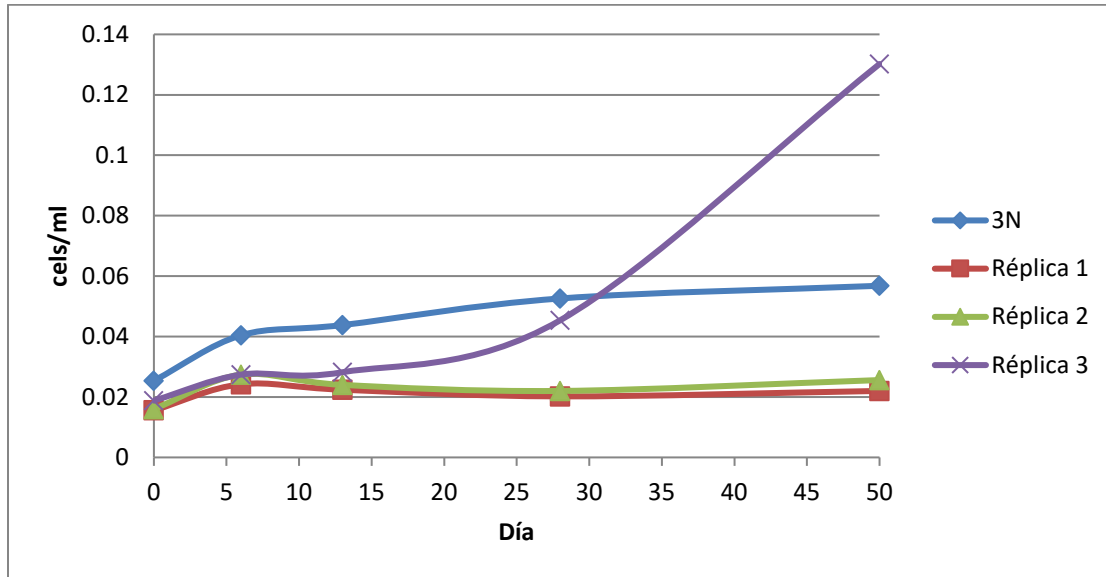


Fig. 12. Comparativo de las condiciones nutrientes en el medio (3N) e iluminación máxima (iluminación 1).

En la figura 12, se observa que la fase exponencial de la réplica 3 marcó una diferencia significativa con las otras réplicas, como se expuso anteriormente, la réplica 3 de la iluminación presentó una tasa de crecimiento muy alta. Las réplicas 1 y 2 presentaron valores por debajo de ésta.

Contrario a lo anterior, en la figura 13 se muestra que la iluminación juega el papel más importante cuando en el medio no se presenta el nutriente esencial evaluado. Es muy claro que la curva del medio (BG11₀) presentó valores por debajo de la iluminación, no obstante, la réplica 3 del tratamiento lumínico presentó un comportamiento distinto al resto de las réplicas. En la figura 14, se evidencia que los nutrientes son el factor del cual se valen las células para desarrollarse puesto que presentó valores por encima de las réplicas en el rango de iluminación.

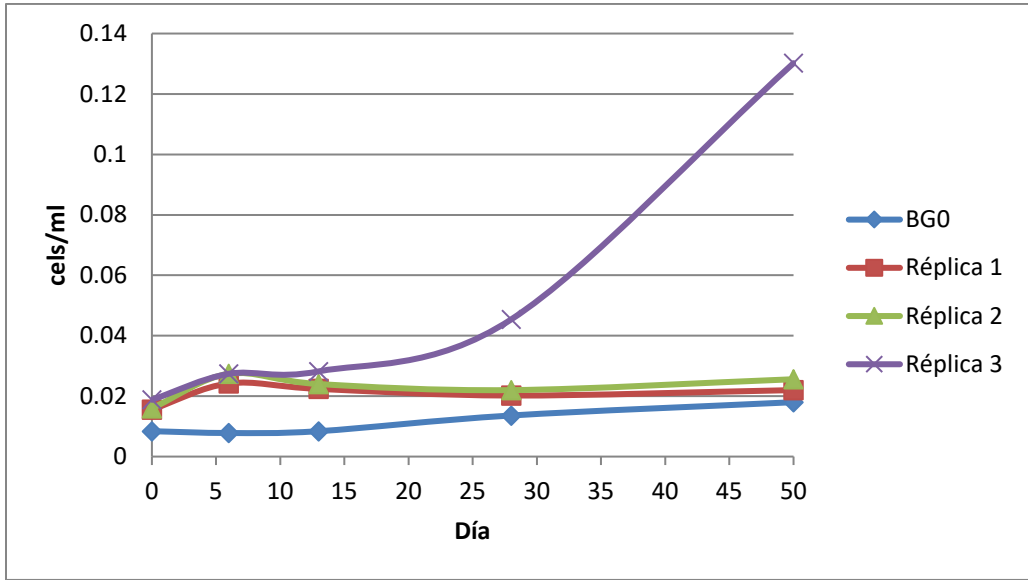


Fig. 13. Comparación de la iluminación 1 y la ausencia de nitrógeno en el medio.

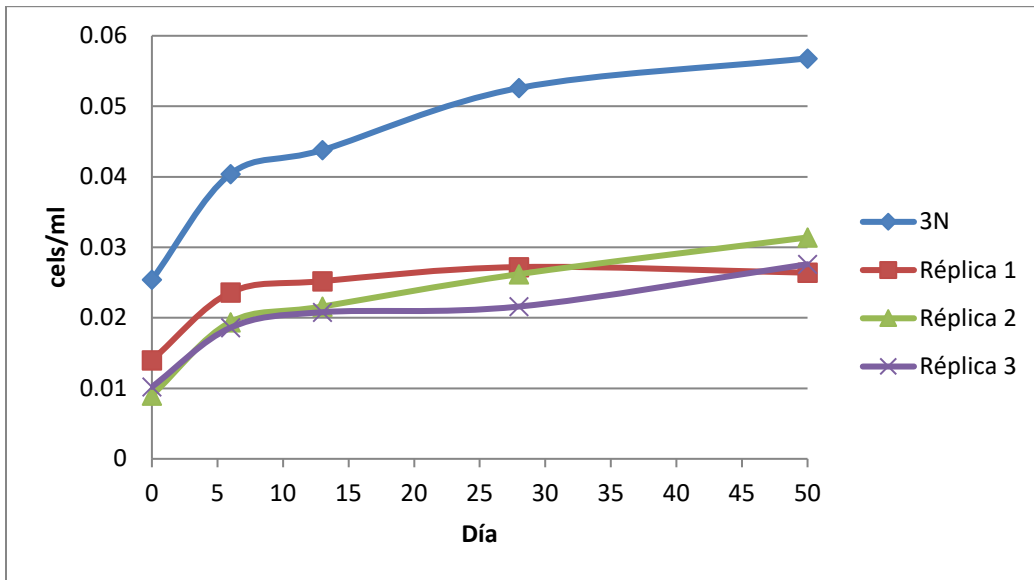


Fig. 14. Comparativo entre las réplicas de la iluminación 2 (intervalo mínimo) y el medio con triple nitrógeno

Caso contrario cuando se comparó este mismo intervalo con la curva del cultivo en medio BG11₀ (figura 15), las células, entonces, se valen de la iluminación para llevar a cabo sus funciones básicas en ausencia de nutrientes esenciales.

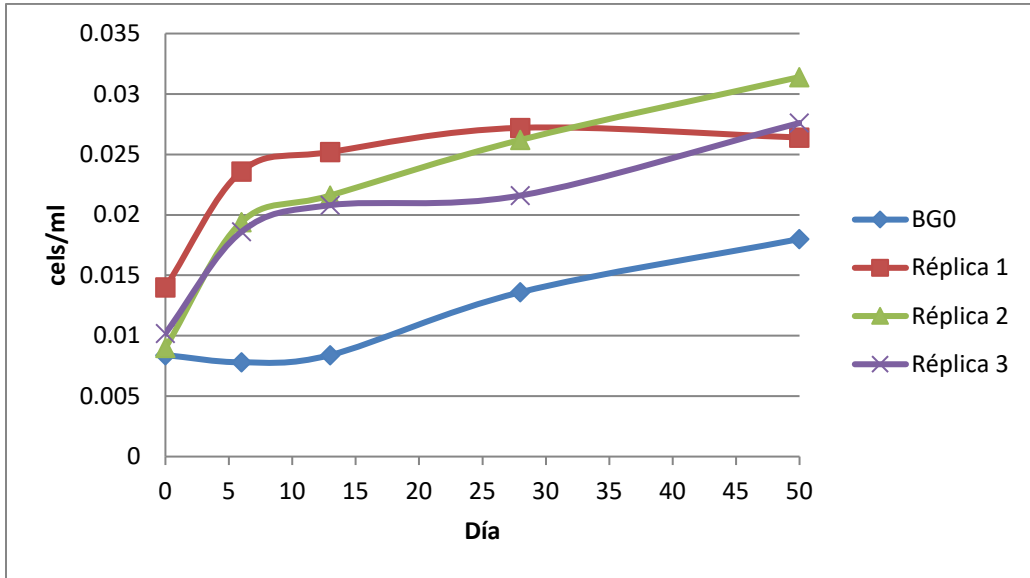


Fig. 15. Curva de crecimiento del medio sin nitrógeno comparado con las réplicas de la iluminación 2

El resultado de la comparación de las gráficas de la iluminación 1 contra el pH 7.5 (figura 16) muestra que, al principio, cuando se inoculó el cultivo, el control presentó la fase de decaimiento y posteriormente remonta la población.

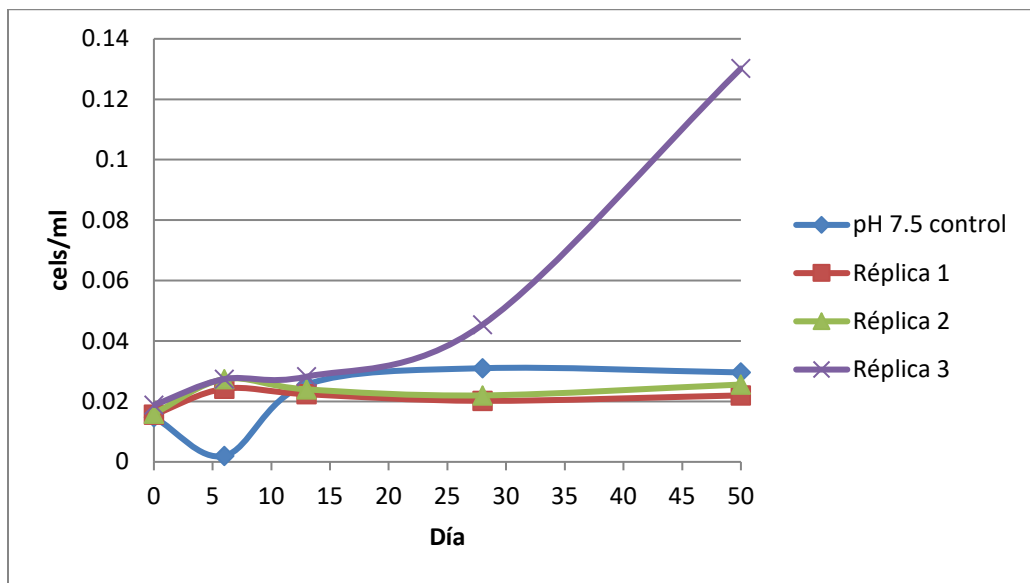


Fig. 16. Comparación entre la iluminación 1 y el cultivo de pH 7.5

Ahora, en la figura 17, cuando se juntaron las curvas de la iluminación 2 con las del pH 7.5, resultó que no hay una variable que defina claramente el crecimiento poblacional de la especie. Se observa que las cuatro curvas de mantienen a partir del día 13 en un intervalo constante (de acuerdo al eje cels/ml).

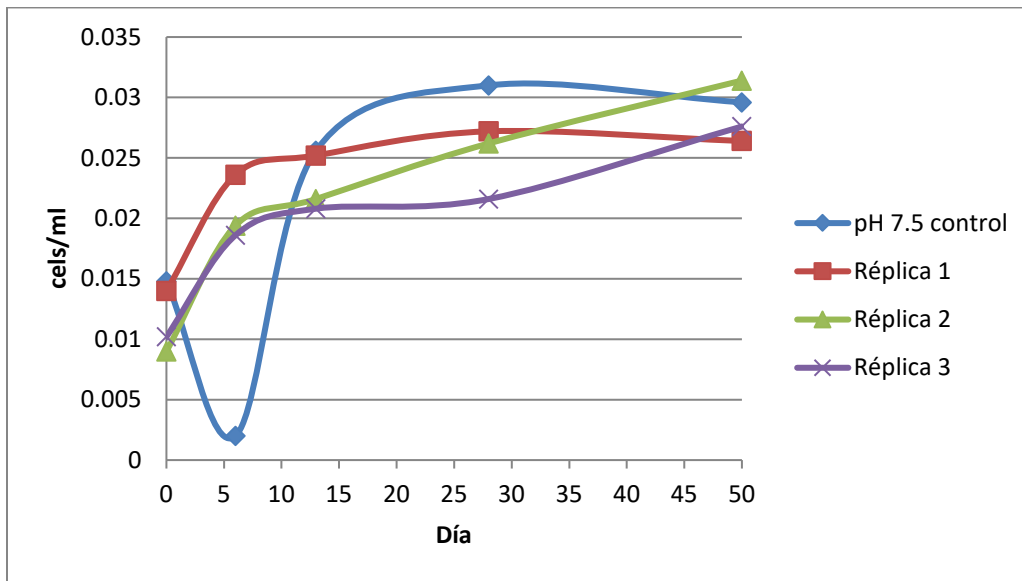


Fig. 17. Comparación entre la iluminación 2 y el cultivo de pH 7.5

Las comparaciones de los intervalos máximo y mínimo contra pH 8.5 están representadas en las figuras 18 y 19. En la primera, aunque con una diferencia muy pequeña, el pH es la variable que define el comportamiento del cultivo; mientras que, en el segundo caso, el pH presenta una fase exponencial muy marcada y sigue siendo la variable más significativa para la especie. Al final del tratamiento, los valores de las cuatro curvas también se mantienen en el mismo intervalo de la fase exponencial.

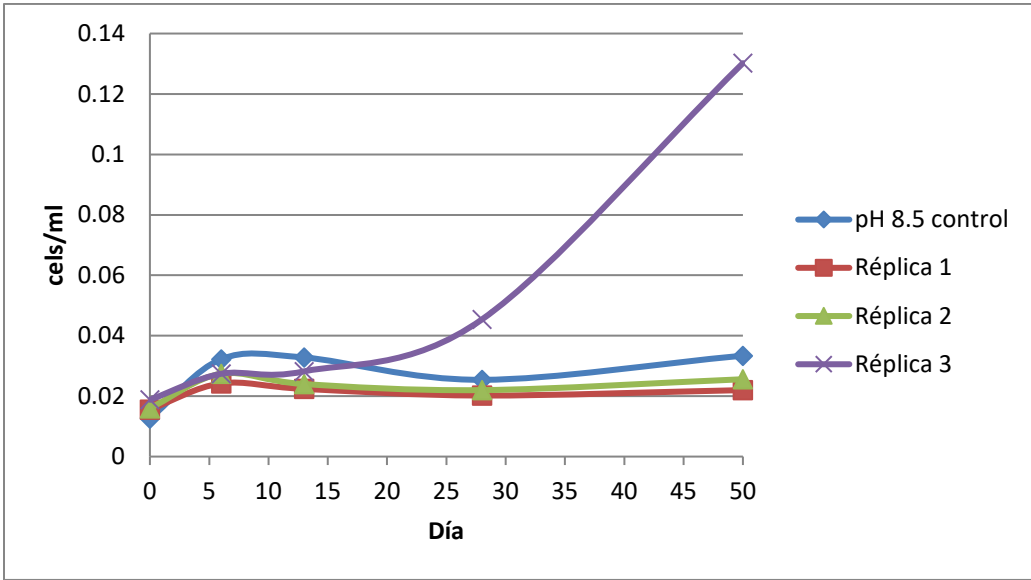


Fig. 18. Iluminación 1 versus pH 8.5

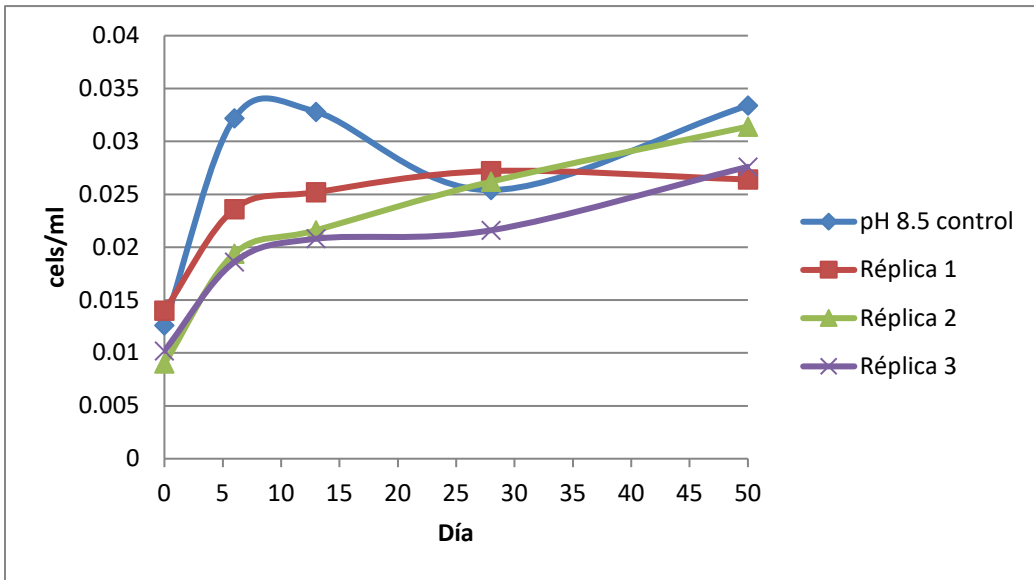


Fig. 19. Iluminación 2 versus pH 8.5

Por último, los gráficos comparativos de la concentración de nutrientes y pH:

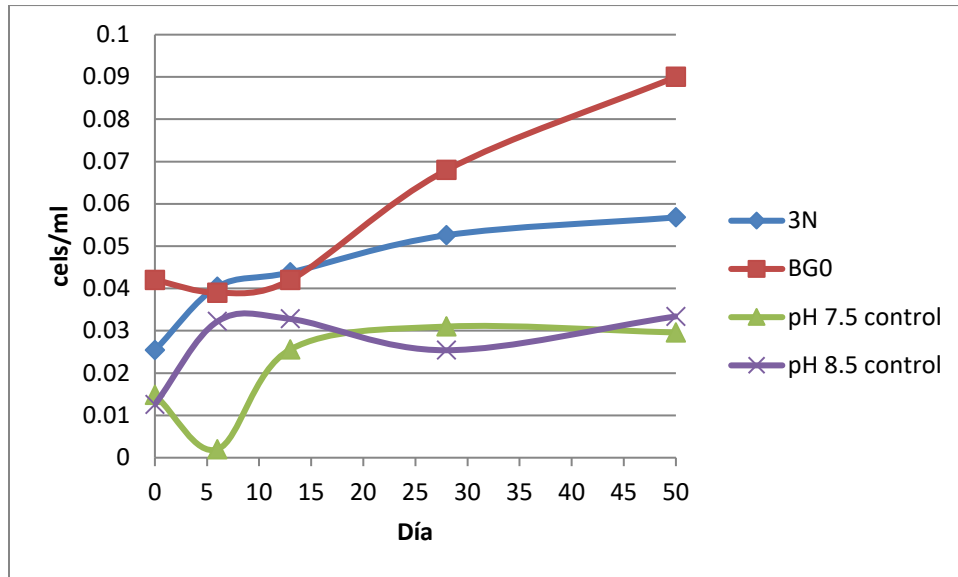


Fig. 20. Comparativo de la concentración de nutrientes y pH

En la figura 20 se observa que las curvas correspondientes a los nutrientes en el medio son importantes para el *arranque* de los cultivos. Las variables no compitieron entre sí al haber presentado valores menores en el pH.

Para comprender más estas relaciones y comparaciones se presenta a continuación la gráfica de radar obtenida: donde se utilizaron los valores mínimos y máximos de cada variable evaluada, el resultado fue el siguiente:

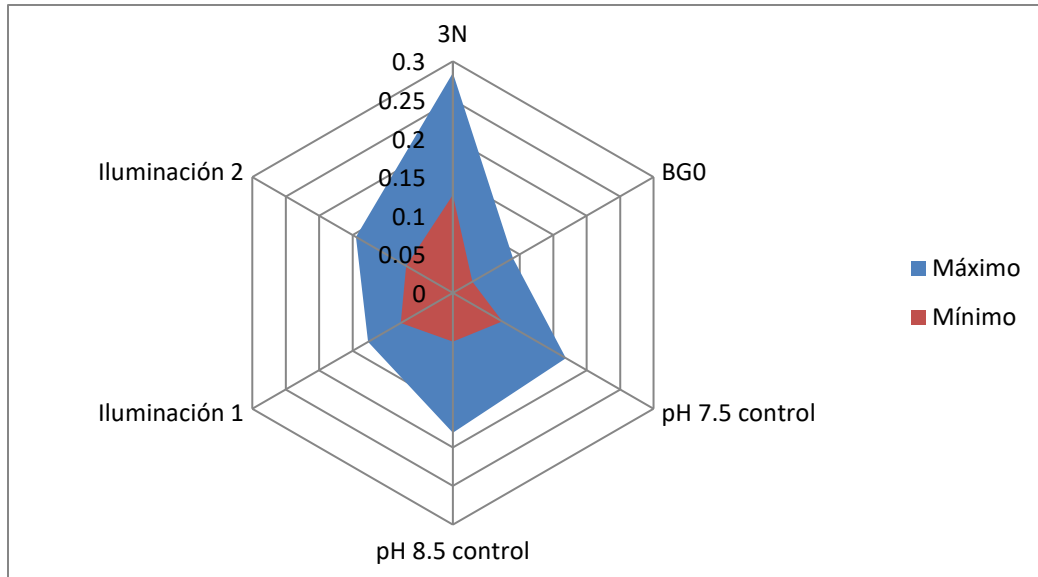


Fig. 21. Gráfica de radar donde se muestran las variables evaluadas en los cultivos. El área azul representa los valores máximos para cada variable, mientras que el área roja los valores mínimos.

En la figura 21 se muestra que las variables que tienen mayor influencia sobre el cultivo de la especie son: el medio adicionado con más nitrógeno, el pH más básico e iluminación baja.

Discusión

Caracterización taxonómica

Respecto a otros estudios realizados en los lagos de la Cantera Oriente, este representa el primero en enfocarse únicamente en el género *Chlamydomonas*, las especies identificadas representan un primer acercamiento al conocimiento de la riqueza de

especies del género en el lugar de estudio. Dos de ellas ya han sido reportadas para México en lagos de Xochimilco (*C. snowiae* y *C. globosa*), y esto da una referencia sobre las relaciones ambientales y ecológicas de los lagos actuales en el Valle de México.

Resulta vital considerar a detalle cada uno de los caracteres morfológicos al momento de la identificación taxonómica para detectar las discrepancias entre las especies y evitar identificaciones erróneas. Recientemente, Pröschold y Darienko (2018), lograron detectar las diferencias entre la especie *C. globosa* y *C. incerta*, que por mucho tiempo se consideraron como una misma y tras analizar cada carácter se estipuló lo contrario. Del resto de las especies, *C. grovei* y *C. snowiae* han sido reportadas en el continente americano.

Es importante mencionar que las especies aquí registradas presentan rangos amplios de distribución, lo que denota la diversidad de microambientes presentes en la Cantera. Además, las especies identificadas nos muestra la relación que existe entre los cuerpos de agua del Valle de México respecto a las funciones ecosistémicas de la flora presente.

Crecimiento poblacional

Nutrientes

De acuerdo a la concentración molar de los componentes del medio utilizado y en referencia a la dinámica poblacional en el tratamiento donde se recurrió a adicionar una concentración mayor de un nutriente (nitrato de sodio), éste estimuló significativamente el desarrollo de la especie seleccionada, por lo que el nitrógeno en los cultivos resultó ser limitante dado que la abundancia de las células respondió a la concentración de este. Las especies de *Chlamydomonas* no tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, pero sí pueden asimilar N de varias fuentes (amonio); las respuestas ante la deficiencia de

nitrógeno son la pérdida de clorofila y aumento en carotenoides (Richmond, 2004). De acuerdo con lo anterior, la densidad celular registrada para los tratamientos se correlacionó con la concentración de nutrientes; es decir, donde la concentración fue mayor (3N) la especie *Chlamydomonas grovei* presentó un crecimiento favorable y tasas de crecimiento mayores, mientras que en el tratamiento sin nitrógeno el crecimiento fue deficiente ya que, esta deficiencia, limita también la formación de aminoácidos y a su vez de proteínas, las cuales están involucradas en muchos de los aspectos del crecimiento (estructurales y metabólicos). Si el suministro de nitrógeno no es suficiente no se pueden formar las proteínas necesarias para mantener los niveles óptimos de crecimiento. Es importante mencionar que la falta de nitrógeno afecta significativamente la actividad y/o capacidad reproductiva de las células (Rochaix, 2001) y también se vio reflejado en la talla de las células (observación personal) y en la formación de estados palmela, esto se observó en los cultivos mantenidos en medio BG11₀. Las células en respuesta a la deficiencia de nutrientes, o bien ante el agotamiento de estos, formaron estados palmela caracterizados por la pérdida de los flagelos, las células se observaron agrupadas y la membrana engrosada.

La tasa de crecimiento responde a la disponibilidad de nutrientes de una manera dinámica. Puesto que el nitrógeno es un nutriente esencial en la composición del fitoplancton, la ausencia de éste compromete su desarrollo. Considerando esto, en las gráficas 12 y 14 se observó que el nitrógeno es indispensable para el arranque del cultivo y no tanto la disponibilidad de luz. Ahora bien, en la figura 20 se ilustró la influencia clara que tiene la concentración de nutrientes sobre el pH, en resultados anteriores a este se mostró cómo la ausencia de nitrógeno en el medio se ve compensada con las otras variables para iniciar la primera fase de la curva de crecimiento; no obstante, al contrastar

estas variables, incluso la ausencia de un nutriente esencial repercute en mayor medida sobre el pH más óptimo para la especie.

pH

Además de la disponibilidad y cantidad de nutrientes, el pH también es una variable fundamental que afecta no solo el crecimiento sino también el metabolismo de las microalgas.

De acuerdo con los valores de las tasas de crecimiento, la especie *C. grovei*, crece de manera óptima en pH 8.5, lo que se contrapone a la literatura donde algunos autores coinciden que el crecimiento de las microalgas es óptimo con un pH de 7.5 (Linden y Hartmut, 2001; Del Río, *et al.*, 2008). Puesto que el pH se ve influenciado por los procesos metabólicos propios de las microalgas y aumenta conforme la edad y condiciones del cultivo, en las figuras 8 y 9, se puede observar claramente que las curvas de los cultivos que se mantuvieron en los pH correspondientes (7.5 y 8.5) no destacan de entre las réplicas y de acuerdo a las gráficas comparativas (figuras 16-19), el pH resultó ser el factor con mayor influencia respecto a la iluminación; sin embargo, cuando se comparó contra la concentración de nutrientes, el pH no es una variable imprescindible para iniciar el crecimiento. Se observó que entre más cercano fuera el pH de los cultivos a las condiciones de los cuerpos de agua donde se colectaron las muestras (cuadro 1), estos presentaron tasas de crecimiento más favorables respecto del control. Entonces, esta especie de *Chlamydomonas* requiere pH básicos para su florecimiento.

Visviki y Santikul (2000) reportaron para la especie *Chlamydomonas applanata* que el pH óptimo de crecimiento es de 7.4 y en 2017 Grewal y colaboradores indican que el crecimiento de *C. reinhardtii* es óptimo a un pH de 8 y 6.8. Bajo ambas premisas, el pH óptimo para el favorable crecimiento de las microalgas dependerá de la especie. No

obstante, para comprender cómo impacta el pH en el crecimiento de las especies, es esencial comprender los mecanismos biológicos que las regulan en estas poblaciones particulares.

Iluminación

Dados los resultados presentados para esta variable, la tasa específica de crecimiento de las microalgas, y en específico de la especie evaluada, depende de la intensidad de la luz a la cual se somete. El crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta, lo cual coincide con lo observado en el campo. Este patrón de crecimiento en relación con la intensidad de luz se ha observado en la mayoría de las especies de microalgas (Fábregas *et al.*, 1998); sin embargo la intensidad y régimen de iluminación también es propio de cada especie de microalgas. La fotosíntesis es la principal fuente de energía para las microalgas, por lo tanto, una mayor intensidad de luz debería proporcionar a las células más energía para los procesos de reproducción sexual y asexual (Funes, *et al.*, 2007). Sin embargo, según Muller, *et al.*, (2001) existe la posibilidad de que las células entren en un decaimiento no fotoquímico (qNP) como respuesta al exceso de intensidad de luz el cual es perjudicial para ellas, en el caso de este estudio, el rango de iluminación preferencial para la especie utilizada fue el mínimo (iluminación 2, figura 20), por lo que este mecanismo ayudó a regular la fotosíntesis en los cultivos reflejándose en tasas de crecimiento más altas respecto al rango de iluminación mayor. Dado que la calidad y cantidad de luz puede variar mucho en el entorno natural, las especies responden a estos cambios al alterar la función de su aparato fotosintético (Rochaix, 2001). Es posible que las células a alta intensidad de luz agoten todos los nutrientes del medio requeridos más rápido resultando en mediciones más bajas.

Puesto que las especies no responden de forma homogénea a los factores fisicoquímicos en el ambiente, se recomienda evaluar en ambientes cerrados los requerimientos nutricionales de cada especie.

Conclusiones

- Las especies identificadas en los cultivos denotan la variedad de microambientes presentes en la Cantera Oriente.
- La deficiencia del nitrógeno como macronutriente en el medio de cultivo tiene un efecto negativo en el crecimiento poblacional y tasa de crecimiento en *Chlamydomonas grovei*.
- La alta iluminación y un pH neutro comprometen de la misma manera la fisiología de esta especie.
- Las condiciones ideales de cultivo para *C. grovei* se obtienen mediante la adición de nitrógeno al medio de cultivo seleccionado ($8.82 \times 10^{-3} \text{M}$), iluminación de 13.7 a $16.2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y pH entre 8.5 y 8.7.

Es importante asumir investigaciones que estén orientadas hacia el estudio de las respuestas fisiológicas de las poblaciones de algas ante la deficiencia de recursos fundamentales (cantidad de nutrientes, iluminación, pH, etcétera), ya que las comunidades fitoplanctónicas afectan de manera directa o indirecta los niveles tróficos de los ecosistemas acuáticos.

Literatura citada

1. Alfonsel, M. y J. Fernández (1985). *Efecto de la temperatura e intensidad luminosa sobre el crecimiento y actividad fotosintética del alga Chlamydomonas reinhardtii*. Junta de energía nuclear. Madrid.
2. Arredondo, B., Cordero, B., Herrero, C. y J. Abalde (1997). *Manual de técnicas bioquímicas aplicadas en ficología. Manual de prácticas de 1^{er} curso teórico-práctico: aplicaciones biotecnológicas del cultivo de microalgas*. La Paz, Baja California Sur, México.
3. Arredondo, B. y D. Voltolina (2007). *Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento*. En: Arredondo-Vega B.O., Voltolina. D. Eds). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México. pp. 21-29.
4. Bohne, F., H. Linden (2002). *Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1579 (1):26-34.
5. Butcher, R W (1959). *An Introductory Account of Smaller Algae of British Coastal Waters. I. Chlorophyceae*. Fish. Investigations, London.
6. Cann, J. P & N. C. Pennick (1982). *The structure of Chlamydomonas bullosa* Butcher. *Arch. Protistenkunde*, **125**, 241-248.
7. Dangeard, P (1965). *Sur quelques algues vertes marines nouvelles observées en culture*. *Botaniste*, **49**, 1-45.
8. Del Río, E., Acien, F. G., García-Malea, M. C., Rivas, J., Molina-Grima, E. & M. G. Guerrero (2008). *Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering*, **100** (2): 397-402.

9. Dillard, G. E (1989). *Freshwater Algae of the Southeastern United States. Part 1. Chlorophyceae: Volvocales, Tetrasporales and Chlorococcales*. J. Cramer. Berlin, Stuttgart. pp 12-19.
10. Elser, J. J., Marzolf, E. R. & Goldman, C. R (1990). *Phosphorus and Nitrogen Limitation of Phytoplankton Growth in the Freshwaters of North America: A Review and Critique of experimental Enrichments*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **47** (7): 1468-1477.
11. Ettl, H (1976). *Die Gattung Chlamydomonas Ehrenberg*. Beih. Nova Hedwigia, **49**, 1-1122.
12. Ettl, H (1983). Chlorophyta I: Phytomonadina. In: *Süsswasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 9 (Eds.: H. Ettl, G. Gartner, H. Heynig & D. Mollenhauer). Gustav Fischer, Stuttgart. Pp. 1-807.
13. Fabregas, J., Domínguez, A., García-Álvarez, D., Lamela, T., y A. Otero (1998). *Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in Haematococcus pluvialis*. Biotechnology Letters. 20: 623-626.
14. Figueroa-Torres, M. A., Arana-Magallón, F., Almanza-Encarnación, S., Ramos-Espinosa, M.G. Y M.J, Ferrara-Guerrero (2015). *Microalgas del Área Natural Protegida Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco, México*. CienciaUAT **9**(2): 15-29.
15. Funes, S., Franzén, L. & D. González-Halphen (2007). *Chlamydomonas reinhardtii: the model of choice to study mitochondria from unicellular photosynthetic organisms*. Methods in Molecular Biology, **372**: 137-149.
16. García, J. M. Y J. Roselló (1998). *Biología y Botánica*. Universidad Politécnica de Valencia. Tomo II.
17. Grewal, G., Kim, R., & S. Mason-Newton (2017). *How does pH impact the growth of Chlamydomonas reinhardtii? The expedition*, University of British Columbia

18. Guillard, R. R. L (1973). *Division rates*. En: Andersen, R. A. (ed.). *Algal Culturing Techniques*. Capítulo 18. Elsevier Academic Press. pp. 269-285.
19. Harris, E. H (2001). *Chlamydomonas as a model organism*. Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology. **52**: 363-406.
20. Henry, R. & J.G. Tundisi (1982). *Efeitos de enriquecimento artificial por nitrato e fosfato no crescimento da comunidade fitoplanctônica da represa de Lobo (Broa, Brotas-Itirapina, SP.)*. Ciência e Cultura 4: 518-524.
21. Hirayama, S., Ueda, R., Nakayama, T. & I. Inouye (2001). *Chlamydomonas perigranulata sp. nov. (Chlamydomonales, Chlorophyceae) from the Red Sea*. Bot. Mar., **44**, 41-46.
22. Huber-Pestalozzi, G (1961). *Phytoplankton des Susswassers: Systematik und Biologie. S Teil. Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Volvocales*.
23. John, D. M., Whitton, B. A., & A. J. Brook (2002). *The Freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press.
24. Juárez-Figueroa, L.A., Silva-Sánchez, J., Uribe-Salas, F.J. y E. Cifuentes-García (2003). *Microbiological indicators of water quality in the Xochimilco Canals, Mexico City*. Salud Pública de México **45**:389-395
25. Lampert, W. & U, Sommer (1997). *Limnoecology: the ecology of lakes and streams*. Oxford University Press. pp. 336.
26. Lee, R (1980). *Phycology*. Cambridge University Press. Cambridge.
27. Linden, J. & Hartmut (2001). *Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga Haematococcus pluvialis*. Plant Physiology **125**: 810-817.

28. Lot, A. (Coord.) (2007). *Guía ilustrada de la Cantera Oriente. Caracterización Ambiental e inventario biológico*. Coordinación de la Investigación Científica, Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria, UNAM. México. pp 7-11.
29. MacIntyre, H. & J. Cullen (2005). Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. En: Andersen, R (ed.). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. pp. 293.
30. Margalef, R (1983). *Limnología*. Ediciones Omega, S. S. Barcelona.
31. Muller, P., Li. X., & K. Niyogi (2001). *Non-photochemical quenching. A response to excess light energy*. American Society of Plant Physiologists. **125** (4): 1558-1566.
32. Novelo, E., Ponce E., Ramírez, R., y M. Ramírez (2007). Algas. En: Lot, A (coord.). *Guía ilustrada de la Cantera Oriente: caracterización ambiental e inventario biológico*. Coordinación de la Investigación Científica, Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria, UNAM, México, pp. 81.
33. Novelo, E., Ponce, M. E. y R. Ramírez (2009). Las microalgas de la Cantera Oriente. En: Lot, A, y Z. Cano-Santana (2009). *Guía ilustrada de la Cantera Oriente: caracterización ambiental e inventario biológico*. Coordinación de la Investigación Científica. Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria, UNAM. México. pp. 71-80
34. Ortiz, M. A., Figueroa, J. M., Salazar, M. P., Parada, G. y L. Castillo (2007). Unidades ambientales. En: Lot, A (coord.). op cit. pp. 19-21.
35. Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U.G., & M. Melkonian (2001) *Molecular phylogeny and taxonomic revision of Chlamydomonas (Chlorophyta). I. Emendation of Chlamydomonas Ehrenberg and Chloromonas Gobi, and*

- description of Oogamochlamys gen. nov. and Loboichlamys gen. nov.* Protist, 152: 265–300.
36. Pröschold, T. & Darienko, T. (2018). *The distinctions between Chlamydomonas incerta Pascher and Chlamydomonas globosa J.W.Snow and their taxonomic consequences.* Notulae Algarum **56**: 1-4.
37. Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Blackwell Science.
38. Rochaix, J (2001). *Assembly, function and dynamics of the photosynthetic machinery in Chlamydomonas reinhardtii.* Plant physiology, **127** (4): 1394-1398.
39. Stein, J (1979). *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements.* Cambridge University Press.
40. Vincent, W. F., Wurtsbaugh, W. A., Vincent, C. L., & P. J. Richerson (1984). *Seasonal dynamics of nutrient limitation in a tropical high-altitude lake (Lake Titicaca, Peru-Bolivia): application of physiological bioassays.* Limnology Oceanography, **29**: 540-552.
41. Visviki, I. & D. Santikul (2000). *The pH tolerance of Chlamydomonas applanata (Volvocales, Chlorophyta).* Archives of Environmental Contamination and Toxicology, **38** (2): 147-151.