



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de diferentes aportes químicos de nitrógeno (nitratos y amonio) respecto al crecimiento y su composición proximal en *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGO**

**MARCELA MURILLO PADILLA**

**Ensenada, Baja California**

**Mayo de 2024**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS,  
CAMPUS ENSENADA.



**“Efecto de diferentes aportes químicos de nitrógeno (nitratos y amonio) respecto al crecimiento y su composición proximal en *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp.”**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA

**Marcela Murillo Padilla  
357605**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, emite los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Dra. M. del Pilar Sánchez  
Saavedra  
**DIRECTOR**

Dra. Ceres Anabel Molina  
Cárdenas  
SINODAL

Dr. Alejandro Sánchez  
González  
SINODAL

Dra. Socorro Jiménez Valera  
SINODAL

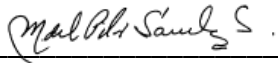
**“Por la Realización Plena del Ser”**

Resumen de la tesis de Marcela Murillo Padilla como querisito parcial para obtención de la Licenciatura de Biología.

Enseanada, Baja California, México. Mayo de 2024.

Efecto de diferentes aportes químicos de nitrógeno (nitratos y amonio) respecto al crecimiento y su composición proximal en *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp.

Resumen aprobado:



**Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra**

Director de tesis

Las microalgas pueden usar varias formas químicas del nitrógeno, y por lo general prefieren incorporar el amonio que el nitrato debido a su grado de óxido-reducción que facilita su utilización en el metabolismo que resulta en un ahorro energético. Por lo que se esperaría que al suministrar amonio en el medio de cultivo favorezca el crecimiento y la producción de proteínas en *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos diferentes aportes químicos de nitrógeno (amonio y nitrato) respecto al crecimiento y composición proximal en *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp. El crecimiento se evaluó a través de conteos directos y por mediciones de la densidad óptica. La producción de biomasa se midió por medio de análisis gravimétrico. La composición proximal y el contenido de pigmentos de las células se cuantificó mediante métodos espectrofotométricos. Se tuvo que *Phormidium* sp. produjo significativamente mayor cantidad de biomasa ( $p= 0.003$ ) evaluada como peso seco total con el tratamiento con amonio ( $224.055 \pm 3.417 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), respecto al obtenido con nitratos ( $164.450 \pm 9.838 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) en fase estacionaria. Se encontró que *Phormidium* sp. produjo significativamente mayor ( $p=0.049$ ) contenido de proteínas con amonio ( $31.909\% \pm 0.582$ ) respecto a lo obtenido con nitrato ( $24.674\% \pm 3.862$ ) en la fase de crecimiento estacionaria. Los cultivos de *S. elongatus* tuvieron significativamente mayor ( $p= 0.049$ ) cantidad de biomasa evaluada como peso seco total con el tratamiento con nitrato ( $309.500 \pm 9.838 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) respecto a lo obtenido con amonio ( $187.083 \pm 3.417 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) en la fase estacionaria. No hubo diferencias significativas ( $p= 0.517$ ) por efecto del aporte químico de nitrógeno en el medio en la producción de proteínas en los cultivos de *S. elongatus*. Se encontró que *Phormidium* sp. mostró una mayor producción de biomasa en peso seco total, contenido de proteínas y clorofila *a* con el aporte químico de amonio en la fase de crecimiento estacionaria, sin embargo el uso de nitratos en el medio de cultivo incrementó la producción de lípidos. En los cultivos de *S. elongatus* se tuvo una mayor producción de biomasa en peso seco total, contenido de carbohidratos, clorofila *a* y carotenos con el aporte químico de nitratos en el medio y en la fase de crecimiento estacionaria.


**Palabras clave:** *Synechococcus elongatus*, *Phormidium* sp., nitrato, amonio, crecimiento, composición proximal, pigmentos.

Summary of the thesis presented by Marcela Murillo Padilla as a partial requirement to  
Obtain the Bachelor's Degree in Biology.

Ensenada, Baja California, México. May 2024.

Effect of different chemical sources of nitrogen (nitrate and ammonium) on growth and  
proximate composition in *Synechococcus elongatus* and *Phormidium* sp.

Summary approved by:



**Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra**

Thesis director

Microalgae can use various chemical forms of nitrogen and generally prefer to incorporate ammonium rather than nitrate due to its degree of oxidation-reduction, which facilitates its utilization in metabolism and results in energy savings. The objective of this work was to evaluate the effect of two different chemical inputs of nitrogen (ammonium and nitrate) on growth and proximal composition in *Synechococcus elongatus* and *Phormidium* sp. Growth was assessed by direct counts and by optical density measurements. Biomass production was measured by gravimetric analysis. The cells' proximal composition and pigment content were quantified using spectrophotometric methods. The results from *Phormidium* sp. indicate that there was significantly more biomass produced ( $p= 0.003$ ) evaluated as the total dry weight with the ammonium treatment ( $224.055 \pm 3.417 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), in comparison to that obtained with nitrates ( $164.450 \pm 9.838 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) in the stationary growth phase. It was found that *Phormidium* sp. produced significantly higher ( $p=0.049$ ) protein content with ammonium ( $31.909\% \pm 0.582$ ) in comparison to that obtained with nitrate ( $24.674\% \pm 3.862$ ) in the stationary growth phase. The *S. elongatus* cultures had a significantly higher ( $p= 0.049$ ) amount of biomass evaluated as total dry weight with nitrate treatment ( $309.500 \pm 9.838 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) compared to that obtained with ammonium ( $187.083 \pm 3.417 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) in the stationary growth phase. There was no significant difference ( $p= 0.517$ ) in the effect of chemical nitrogen supply in the medium on protein production in *S. elongatus* cultures. It was found that *Phormidium* sp. showed higher biomass production in total dry weight, protein, and chlorophyll *a* content with ammonium as the chemical nitrogen source in the stationary growth phase, however, the use of nitrates in the culture medium increased lipid production. In *S. elongatus* cultures, there was a higher biomass production in total dry weight, carbohydrate content, chlorophyll *a*, and carotenes with the chemical contribution of nitrates in the medium at the stationary growth phase.

**Key words:** *Synechococcus elongatus*, *Phormidium* sp., nitrate, ammonium, growth, proximal composition, pigments.

## Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por estos años de formación académica.

Al Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por aceptarme para realizar mis prácticas profesionales y mi tesis de licenciatura en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por otorgarme una beca de ayudantía de investigador a cargo de la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra con la que me permitió realizar mis prácticas profesionales, mi tesis de licenciatura y colaborar en las diversas tareas del laboratorio a cargo de mi directora de tesis.

A mi directora de tesis, Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, por aceptarme como su alumna. Gracias por instruirme y transmitirme ese gran amor por las microalgas. Gracias por darme el honor de aprender de usted y por creer en mí. Le agradezco de corazón su apoyo académico y personal.

A mi comité de tesis por su valiosa retroalimentación en este proceso. Gracias a la Dra. Socorro Jiménez Valera y al Dr. Alejandro Sánchez González por su apoyo. En especial, gracias a la Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas por el entrenamiento desde que entré a hacer mis prácticas profesionales a lo que se transformó en mi tesis de licenciatura. Gracias por el apoyo académico y por tu amistad.

A todos los miembros del laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL) del Departamento de Acuicultura de CICESE.

¡A mis niñas lab! Gracias a cada una de ustedes, sin ustedes el laboratorio no sería lo mismo. Gracias por su guía, por su conocimiento y más que nada, gracias por su amistad. Gracias Ceres por tu paciencia, por los consejos, por bellos hijos y tus refranes. Gracias Fati por tu gran conocimiento, por tus buenos consejos y por las cumbias. Gracias Dalia por ser esa gran chispa, por tus corridos y por tus enseñanzas. Gracias Noelia por tus abrazos sinceros y por tu gran ayuda en estadística. Gracias Ceci por los mejores consejos, por tu gran corazón y por tu gran ayuda en estadística. Gracias Mayra por hacerme reír con tus ocurrencias y por tu amor a las microalgas. Gracias Hillary por tu trabajo tan impecable, por tu transparencia y por tu gentileza. Siempre tendrán a donde llegar en Ensenada, las quiero muchísimo.

A nuestro querido posdoc, Dr. Armando Mendoza Flores. Gracias por tus enseñanzas y por tu amor al señor de los anillos.

Un agradecimiento muy especial a mis Profesores Cimarrones, gracias por la pasión que transmiten de la Biología. Gracias a mi madrina de generación la Dra. Alejandra Ramos por su apoyo académico y personal. Gracias a la Dra. María del Refugio por ser mi primer acercamiento a las microalgas. Gracias al Dr. José Delgadillo por sus salidas de campo legendarias. Gracias al Dr. Carlos Flores por su gran pasión por la enseñanza. Gracias al Dr. Ulises Bardullas por hacerme entendible la estadística y por su nivel de exigencia. Gracias al próximo Dr. Martín Cabrera, porque nunca me imaginé que me encantarían las salamandras. Gracias al Dr. Diego Delgado por introducirme el

mundo de los hongos. Gracias al Dr. Alejandro Carballo por enseñarme a redactar un reporte de laboratorio y repasar técnicas moleculares. Finalmente, gracias al Dr. Rafael Bello por darme la oportunidad de aprender en su invernadero.

A mis amigos de la Universidad, gracias por caminar esta gran aventura de la biología a mi lado, les deseo todo lo bueno de esta vida y que nunca pierdan esa gran curiosidad que los inspiró a estudiar la vida. Gracias por las clases, trabajos, salidas de campo y fiestas juntos. Gracias Aleru, Andrea, André, Elisita, Naths, Errllenis, Jorge, Carlitos, Samcha, David, Glo, Sebas, Javi, y Julián.

A mis amigas que no tienen nada que ver con la biología pero siempre me apoyaron y echaron porras, las amo Cris y Soyi.

A mi familia, por su gran apoyo en esta y en todas las etapas de mi vida. Gracias a mi mamá y a mi papá por ser mis porras, por enseñarme a no rendirme y a trabajar por lo que quiero. Gracias por escucharme cuando estaba cansada, emocionada, frustrada y confundida. Gracias por alentarme a seguir adelante. Nunca terminaré de agradecerles por todo lo que me han apoyado, los amo.

A mi hermanita Nati, con quien cantaré y bailaré ABBA hasta el final de mis días. Gracias por ayudarme a relajarme y abrazarme cuando me veías estresada, te amo y cuentas conmigo.

A mi biólogo favorito, mi hermano Sergio, aka @fungustango. Mi gran ejemplo a seguir, quien me inspira día a día por su pasión por los hongos. Llegarás muy lejos y aquí estaré yo para verte cumplir tus metas.

A mi más amado Ramón, porque sin ti todo sería más difícil. Gracias por tu apoyo incondicional, gracias por echarme porras día con día, por hacerme reír cuando más lo necesitaba, por ser el mejor asistente de laboratorio y por llevarme comida cuando pasaba horas en el laboratorio. Gracias por celebrar el más mínimo de mis logros y despertar tu curiosidad a la biología. Por esto y más te agradezco desde lo más profundo de mi corazón.

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico a mi familia, de sangre y a la que he tenido el honor de escoger. Gracias por su apoyo infinito en este proceso. Los amo con todo mi corazón.

A mi mamá y papá por enseñarme el valor del trabajo y de la perseverancia. Por su apoyo incondicional y por su amor.

A mis hermanos Sergio y Nati, que sin sus abrazos y ocurrencias hubiera sido muy difícil concluir este trabajo.

A Ramón, el amor de mi vida, quien estuvo presente en los mejores y peores momentos de este trabajo. Te amo, gracias por todo.

A mis abuelitos, quienes siempre me han apoyado. Los amo a cada uno de ustedes.

Finalmente, gracias a Dios que me dio la paciencia y fuerza para no rendirme.

## Índice de trabajo

### a) Contenido

Resumen .....	i
Summary .....	ii
Agradecimientos .....	iii
Dedicatoria .....	v
Lista de tablas.....	ix
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Antecedentes.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Hipótesis.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Objetivos .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Objetivo general .....	9
1.3.2 Objetivos específicos: .....	9
<b>2. Metodología .....</b>	<b>10</b>
Origen de las cepas .....	10
Condiciones de cultivo y aportes químicos de nitrógeno .....	10
Densidad óptica y pH .....	12
Tasa de crecimiento .....	12
Peso seco.....	14
Composición proximal .....	15
Pigmentos .....	17
Tratamiento estadístico .....	18
<b>3. Resultados .....</b>	<b>20</b>
<b><i>Phormidium</i> sp.....</b>	<b>20</b>
Densidad celular .....	20
Densidad óptica y pH.....	21
Tasa de crecimiento y tiempo de generación.....	23
Peso seco total, peso seco orgánico y peso de cenizas .....	24
Composición proximal .....	26
Pigmentos fotosintéticos.....	28
<b><i>Synechococcus elongatus</i> .....</b>	<b>30</b>
Densidad celular .....	30

Densidad óptica y pH .....	30
Tasa de crecimiento y tiempo de generación .....	32
Peso seco total, peso seco orgánico y peso de cenizas .....	34
Composición proximal .....	36
Pigmentos fotosintéticos .....	38
<b>4. Discusión .....</b>	<b>40</b>
<b><i>Phormidium</i> sp.....</b>	<b>40</b>
Crecimiento .....	40
Peso seco total, peso seco orgánico y peso seco inorgánico.....	42
Pigmentos y composición proximal .....	44
<b><i>Synechococcus elongatus</i> .....</b>	<b>48</b>
Crecimiento .....	48
Peso seco .....	52
Composición proximal y pigmentos .....	53
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>57</b>
<b>6. Recomendaciones.....</b>	<b>58</b>
<b>7. Literatura citada .....</b>	<b>60</b>

## b) Lista de figuras

Figura	Página
<b>Figura 1.</b> Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> ) de cultivos de <i>Phormidium</i> sp. mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de una vía.....	20
<b>Figura 2.</b> Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica a 550 nm de cultivos de <i>Phormidium</i> sp. mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de una vía.....	21
<b>Figura 3.</b> Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica a 680 nm de cultivos de <i>Phormidium</i> sp. mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de una vía.....	22
<b>Figura 4.</b> Valores promedio y desviación estándar de la tasas de crecimiento y el tiempo de generación de cultivos de <i>Phormidium</i> sp. mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía. ....	23
<b>Figura 5.</b> Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, peso seco orgánico y peso de cenizas (µg ml <sup>-1</sup> ) de <i>Phormidium</i> sp. en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b).....	25
<b>Figura 6.</b> Valores promedio y desviación estándar de valores de proteínas, carbohidratos, y lípidos (%) de <i>Phormidium</i> sp. en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b).....	27
<b>Figura 7.</b> Valores promedio y desviación estándar de valores de clorofila <i>a</i> y carotenos (µg ml <sup>-1</sup> ) de <i>Phormidium</i> sp. en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b).....	29
<b>Figura 8.</b> Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> ) de cultivos de <i>Synechococcus elongatus</i> mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía.....	30
<b>Figura 9.</b> Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica a 550 nm de cultivos de <i>Synechococcus elongatus</i> . mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de una vía. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).....	31
<b>Figura 10.</b> Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica a 680 nm de cultivos de <i>Synechococcus elongatus</i> . mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de una vía. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).....	32

**Figura 11.** Valores promedio y desviación estándar de la tasas de crecimiento y el tiempo de generación de cultivos de *Synechococcus elongatus* mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se encontraron diferencias significativas entre los aportes de nitrógeno. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B)..... 33

**Figura 12.** Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, peso seco orgánico y peso de cenizas ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de *Synechococcus elongatus* en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b)..... 35

**Figura 13.** Valores promedio y desviación estándar de valores de proteínas, carbohidratos, y lípidos (%) de *Synechococcus elongatus* en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b)..... 37

**Figura 14.** Valores promedio y desviación estándar de valores de clorofila *a* y carotenos ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de *Synechococcus elongatus* en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b)..... 39

### c) Lista de tablas

Tabla	Página
<b>Tabla 1.</b> Especies de cianobacterias seleccionadas para su estudio.....	10
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de extracción para cuantificación de proteínas de <i>Synechococcus elongatus</i> y <i>Phormidium</i> sp.....	16

## 1. Introducción

Las microalgas, son organismos unicelulares o coloniales mayoritariamente autotróficos que habitan en ambientes marinos, dulceacuícolas, integradas al suelo o en superficies húmedas (Reynolds, 2006). Debido a su diversidad, los linajes se clasifican dentro del grupo de procariotas, así como de los eucariotas. Las microalgas difieren de las plantas por la falta de estructuras tales como raíces, tallos, hojas y embriones. Además, las microalgas se caracterizan por la presencia de ciertos pigmentos fotosintéticos, sus productos de almacenamiento y diversos rasgos ultraestructurales (Bold y Wynne, 1985; Lee, 1989).

Debido a la diversidad de ambientes en donde pueden vivir, las microalgas han desarrollado estrategias fisiológicas y producción de compuestos con características químicas muy variadas. Las microalgas han trascendido hacia la industria biotecnológica por su amplia gama de aplicaciones en diferentes áreas. La diversidad de productos bioquímicos que se extraen de las microalgas las posiciona como organismos de valor en la cadena trófica, en las áreas de nutrición humana y animal, en la agricultura para la producción de biofertilizantes, en la nutraceutica, en farmacología para la producción de antivirales, antibacteriales y anticancerígenos, en medicina experimental, para cosmetología y como bio-refinería por mencionar algunos campos de interés (Rizwan et al., 2018).

De acuerdo con la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio (también conocida como "MEA" por sus siglas en inglés) propuesta por la Organización de las Naciones Unidas (2005), existe una clasificación para las aportaciones ecológicas que brinda algún

organismo; tanto a su entorno natural, como para el aprovechamiento humano. Las microalgas ofrecen la producción de oxígeno atmosférico y realizan la mitad de la fotosíntesis global (Andersen, 1996). Incluso podría ir en aumento la producción de oxígeno por microalgas debido a la disminución exponencial de las áreas forestales en las últimas décadas (Ellis et al., 2020). Dentro de la misma clasificación se argumenta que la producción primaria del fitoplancton da energía a los siguientes eslabones de redes alimentarias de ecosistemas acuáticos (Hill et al., 2006) y terrestres; indirectamente por medio de materia orgánica de aves, o directamente por su presencia natural en el entorno (Polis y Hurd, 1996).

Dentro del reciclaje de nutrientes y los ciclos biogeoquímicos descritos por la MEA se menciona que el fitoplancton permite el reciclaje y la redistribución de nutrientes (Naselli-Flores, y Padisák, 2022). Las microalgas comparten interacciones de gran importancia con diferentes microorganismos, entre ellos virus, arqueas, bacterias y hongos para el reciclaje de micro y macronutrientes (Kamalanathan et al., 2021). La actividad fotosintética del fitoplancton permite la descomposición de materia orgánica realizada por otros microorganismos aerobios y regula la abundancia de estos organismos (Azam et al., 1983).

Las cianobacterias son organismos autotróficos procariotas (Shilo, 1989). Son de importancia ecológica por la simbiosis que comparte con diversos organismos y además son utilizados para la producción de compuestos destinados a la salud humana, en la industria biotecnológica, alimentaria y farmacéutica entre otras (Schopf, 2000). Algunas especies de cianobacterias producen toxinas y causan problemas de mortandad para organismos

acuáticos o bien, para los organismos que los consumen (Sivonen, 2009). Las cianobacterias es un grupo de organismos muy antiguo y gracias a la evidencia de las áreas de paleontología, geología y geoquímica, se estima que el origen de los estromatolitos (ecosistema microbiano que incluye cianobacterias y otro tipo de bacterias) fue hace ~3500 millones de años (Schopf, 2000). Las cianobacterias tienen una amplia diversidad morfológica, desde formas unicelulares a filamentos singulares o en colonias (Whitton y Potts, 2000).

La diversidad fisiológica y metabólica de las cianobacterias ha permitido que tengan presencia en casi todos los tipos de hábitats, desde acuáticos a terrestres. Son organismos extremófilos que soportan temperaturas y salinidades extremas (Schirrmeyer et al., 2013). En ambientes terrestres, su importancia ecológica recae en mantener la fertilidad y estabilidad del suelo en zonas áridas y semidesérticas (Whitton y Potts, 2000). La fijación de nitrógeno atmosférico se puede llevar a cabo en células especializadas llamadas heterocistos; estas permiten prosperar a las cianobacterias en donde el nitrógeno es un recurso limitado (Bergman et al., 1997).

El nitrógeno es el tercer elemento más importante como fuente de nutriente para las cianobacterias, cualquier deficiencia resulta en una menor producción de ficobiliproteínas (pigmento accesorio para la fotosíntesis) y en consecuencia disminuye la eficiencia de aprovechamiento de energía solar para la fotosíntesis (Kolber, 1988). Las cianobacterias pueden utilizar distintas formas de nitrógeno: nitrógeno atmosférico, nitrato, nitrito, amonio, urea, cianato y algunos aminoácidos (Valladares et al., 2002; Flores et al., 2005). Sin embargo, existe una preferencia hacia el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) por ser la forma

química más reducida e implica menor gasto metabólico para su asimilación (Muro-Pastor et al., 2005; Esteves-Ferreira et al., 2017).

Los diferentes aportes de nitrógeno en el medio de cultivo pueden variar la tasa de crecimiento y la composición proximal de la especie de cianobacteria. El crecimiento poblacional de las cianobacterias podría ser más lento cuando se les proporciona nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en lugar de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Rückert y Giani, 2004). En otras investigaciones se encontró que algunas especies de cianobacterias presentan mayor contenido de proteínas cuando hay nitrato en el medio de cultivo respecto al suministro de amonio en el medio (Dortch et al., 1984).

## 1.1 Antecedentes

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo de las microalgas y se le considera un macronutriente. El nitrógeno es un recurso que influye en las interacciones de las comunidades fitoplanctónicas y hasta en la calidad del agua (Smith, 2003). En el estudio de Blomqvist et al. (1994) se encontró que las cianobacterias no fijadoras de nitrógeno tuvieron una preferencia hacia el amonio, mientras que las microalgas eucariotas crecieron mejor al asimilar nitrato. Esto implica una mejor coexistencia entre las comunidades fitoplanctónicas reduciendo la competencia de recursos entre ellas.

El amonio es la presentación inorgánica más reducida de nitrógeno que pueden utilizar las cianobacterias. Se ha observado que cuando el amonio está presente en el medio, los organismos no asimilan ninguna otra forma química de nitrógeno (Ochoa de Alda et al., 1996). Cualquier otro aporte de nitrógeno, como los nitratos o nitritos se reducen a amonio en el metabolismo de las cianobacterias para posteriormente ser incorporado a compuestos celulares orgánicos (Syrett, 1981). Se requiere de dos enzimas muy importantes para llevar a cabo la reducción química: nitrato reductasa y nitrito reductasa; estas reacciones juntas consumen un total de ocho electrones (Flores y Herrero, 2005). Es por ello, que absorber amonio de manera pasiva o con una permeasa específica (Esteves-Ferreira et al., 2018) resulta en un ahorro de energía que es preferente por las células (Muro-Pastor et al., 2005). Se ha visto que, dependiendo de la concentración de amonio en el medio, se inhibe la actividad de la enzima nitrato reductasa, por lo que no se podrá aprovechar este nutriente, o bien se utilizarán de forma parcial los nitratos disponibles en

el medio (Syrett, 1981). La táctica anterior acerca de la activación de enzimas según la concentración de las formas amonio o nitratos, refleja la habilidad estratégica de estos microorganismos, para seleccionar rutas metabólicas que requieran la menor cantidad de energía posible por el mayor beneficio (Raven et al., 1992; Schluter, 1996).

En el estudio de Rùchert y Giani (2004) en cultivos de la cianobacteria *Mycrocystis viridis* se comparó la densidad celular y el contenido de proteínas al usar nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) y cloruro de amonio ( $\text{ClNH}_4$ ) como aportes de nitrógeno en el medio. Con ambos tratamientos *M. viridis* aumentó la densidad celular. Sin embargo, se encontró mayor tasa de crecimiento con cloruro de amonio y resultó en valores mayores de producción de biomasa. Esto indica que un florecimiento por crecimiento exponencial de *M. viridis* es más propenso a ocurrir en un ambiente rico en amonio. Sin embargo, la concentración de proteínas fue mayor en el tratamiento con nitratos y se pudo mantener alta densidad celular durante más tiempo. Por consiguiente, *M. viridis* podría competir con eucariotas por nitratos, mientras maximiza la asimilación de amonio, y una vez que los nitratos ya no estén disponibles para los competidores, el florecimiento de *M. viridis* sería posible.

En el estudio de Kevin et al. (2020) se utilizaron cianobacterias y clorofitas para comparar la tasa de asimilación entre nitratos, amonio y urea. Dentro del grupo de las cianobacterias se trabajó con organismos del género *Synechococcus* que fueron aislados de los lagos de Ontario, Canadá. Los resultados muestran un declive de productividad en ambos grupos taxonómicos expuestos al tratamiento de amonio. No obstante, la concentración de este compuesto es clave para determinar el efecto que tiene sobre las células. Si hay un exceso de amonio en el ambiente  $10 \mu\text{M NH}_4^+$  puede reducir el

crecimiento o incluso producir la muerte de las células de microalgas. Sin embargo, cuando hay bajas concentraciones de amonio  $< 4 \mu\text{M NH}_4^+$  (Wilkerson et al. 2006) resulta en un ambiente adecuado para su crecimiento (Flynn et al., 1997; Dai et al., 2012). Las condiciones ambientales preexistentes como son la temperatura, pH y contenido de fósforo en el medio, también tienen un papel importante en cómo responderá el fitoplancton respecto a la concentración y forma química del nitrógeno en el medio ambiente. Por ejemplo, la absorción de amonio suele ser mayor en temperaturas más cálidas, mientras que en temperaturas más frías el nitrato es preferente para el consumo del fitoplancton, particularmente en diatomeas (Gilbert et al., 2016).

Las cianobacterias que se utilizarán en este estudio son *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp. La especie de *Synechococcus elongatus* es una cianobacteria unicelular marina o dulceacuícola que forma colonias de hasta 12 células según la fase de crecimiento. Tiene rápido crecimiento, es tolerante al estrés ambiental y maleable para la ingeniería genética (Jaiswal et al., 2020). Esta cianobacteria ha sido usada principalmente para producir compuestos de interés como son los ácidos grasos del tipo omega 3 (Santos-Merino et al., 2018, 2022). El mecanismo de asimilación de nitrógeno para esta especie se da por medio de transportadores membranales para el amonio o por mecanismos reductores para los iones de nitratos o nitritos (Cai et al., 2013).

El género *Phormidium* pertenece a las cianobacterias filamentosas sin heterocistos. Habita en sustratos acuáticos, principalmente en agua dulce, pero también se pueden hallar en zonas litorales costeras o en suelos húmedos. Ha sido objeto de estudio por su rol ecológico y su adaptación a diferentes condiciones ambientales (Teneva, 2005). En el

estudio de Khazi et al. (2018) indican que la utilización de amonio es la más favorable para este género, ya que lo absorbe con mayor rapidez y el crecimiento poblacional es mayor respecto al uso de otras formas químicas de nitrógeno. El género *Phormidium* es considerado buen candidato para la producción de ficocianina, que es un complejo de ficobiliproteínas (Khazi et al., 2018).

## 1.2 Hipótesis

Las microalgas por lo general prefieren incorporar el amonio que el nitrato debido a su grado de óxido-reducción que facilita su utilización en el metabolismo. Por lo que se espera que al suministrar amonio en el medio de cultivo favorezca el crecimiento y la producción de proteínas en *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de dos diferentes aportes químicos de nitrógeno (nitratos y amonio) respecto al crecimiento y composición proximal en *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp.

### 1.3.2 Objetivos específicos:

- Medir la densidad celular y la densidad óptica de los cultivos de *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp. para evaluar la tasa de crecimiento, el tiempo de generación y su curva de crecimiento.
- Conocer los valores de pH del medio de cultivo de *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp. en el transcurso del tiempo de cultivo.
- Valorar la composición proximal de los cultivos de *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp. durante la fase de crecimiento exponencial y estacionaria.
- Caracterizar los pigmentos de los cultivos de *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp. durante la fase de crecimiento exponencial y estacionaria.

## 2. Metodología

### Origen de las cepas

Se seleccionaron las especies de cianobacterias *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp. como organismos del estudio por su importancia ecológica (Tabla 1). Los inóculos de estas especies se obtuvieron de la colección de microalgas del laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL) del Centro de Investigación científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

**Tabla 1.** Especies de cianobacterias seleccionadas para su estudio.

Especie	Ambiente	Sitio de aislamiento
<i>Phormidium</i> sp. Kützing ex Gomont, 1982	Marino	Península de Baja California (Jiménez-Valera, 2016)
<i>Synechococcus elongatus</i> (Nägeli) Nägeli 1849	Dulceacuícola y marino	San Blas, Nayarit (Aguilar-May, 2002)

### Condiciones de cultivo y aportes químicos de nitrógeno

Se realizaron cultivos no axénicos, monoespecíficos y en sistemas por lotes en matraces de 500 ml (Kimax-Kimble No. 26500 tapón No.7) en agua dulce de uso doméstico. Se utilizaron dos tratamientos de aporte químico de nitrógeno. El tratamiento control fue el nitrato (NaNO<sub>3</sub>) provisto por el medio "f" descrito por Guillard y Ryther (1962). En el

segundo tratamiento se adicionó amonio en forma de cloruro de amonio ( $\text{ClNH}_4$ ). Para cada especie de cianobacteria y condición experimental se realizó por triplicado. La concentración final de nitrógeno en ambos tratamientos es de  $17.66 \times 10^{-4}$  M y la relación atómica de N:P para ambos aportes químicos de nitrógeno añadidas al medio es de 22:1 (Sánchez-Saavedra et al., 2017).

Para evitar la agregación celular de las cianobacterias durante el crecimiento del cultivo, se agregaron dos cucharadas de esferas de vidrio de 2 mm de diámetro al matraz con la finalidad homogeneizar la distribución de las células. Los matraces con agua y las esferas de vidrio se esterilizaron en una autoclave (Yamato® modelo SE-300) a una temperatura de 121 °C y  $1.05 \text{ kg cm}^{-2}$  de presión durante 20 min. Los nutrientes se agregaron después del proceso de esterilización dentro de una campana de extracción de flujo laminar (AirClean® 600 PCR Workstation) y en presencia de un mechero de gas para evitar la contaminación.

Los cultivos de las dos especies de cianobacterias se realizaron en el Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE. Se mantuvieron bajo iluminación continua provista por lámparas fluorescentes de luz blanca (General Electric® modelo F40D-EX) con una irradiancia de  $100 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ . La irradiancia se ajustó con un radiómetro con sensor  $4\pi$  (Biospherical Instruments QSL-100). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de  $23 \pm 1$  °C y cada día se agitaron manualmente.

En los cultivos de cada especie se monitorearon las siguientes variables experimentales que se detallan a continuación:

### Densidad óptica y pH

Durante el experimento cada día se extrajo una alícuota (1 mL) de cada matraz para evaluar la densidad óptica (DO) y el pH de cada muestra. Se obtuvieron valores de DO a 550 nm y 680 nm en un espectrofotómetro (Hach® modelo DR6000). El pH de los cultivos se midió con ayuda de un potenciómetro (Checker® de Hanna Instruments® modelo HI98103). Una vez obtenidos los valores de DO y pH se graficaron para ver la respuesta respecto al tiempo de cultivo.

### Tasa de crecimiento

Para cada condición experimental se tomó diariamente una alícuota de 1 mL para medir la densidad de células por medio del conteo directo con un hematocitómetro (Hausser Scientific) de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Olympus CX-31). La concentración celular se calculó de acuerdo con la fórmula descrita por Arredondo-Vega y Voltolina (2007):

$$C = N * 10^4 * dil$$

Dónde:

C= células mL<sup>-1</sup>

N= promedio de células presentes en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 µL)

dil= factor de dilución

Para fijar las muestras se incorporó una gota de Lügol a todas las alícuotas de las muestras de cada tratamiento durante el periodo experimental.

Con los datos de la densidad celular de cada muestra, se calculó la tasa de crecimiento y el tiempo de generación, con las fórmulas descritas por Fogg y Thake (1987):

$$\mu = \frac{\log_2(N_2) - \log_2(N_1)}{t_2 - t_1}$$

$$Tg = \frac{1}{\mu}$$

Dónde:

$\mu$ : tasa de crecimiento específica

$\log_2$ : logaritmo en base dos

$N_2$  y  $N_1$ : concentración de células en el tiempo 2 ( $t_2$ ) y al tiempo 1 ( $t_1$ ) respectivamente.

Tg: tiempo de generación

### Peso seco

Se calcularon los valores de peso seco total (PST), el peso seco orgánico (PSO) y el peso inorgánico o contenido de ceniza (PSI) de los cultivos en fase exponencial y fase estacionaria de ambos tratamientos según la metodología propuesta por Sorokin (1973).

Se utilizaron filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 45 mm de diámetro y 1  $\mu\text{m}$  de abertura del poro. Estos fueron incinerados en una mufla Barnstead Thermolyn (1400) a 490 °C por 4 horas. Posteriormente, para obtener el peso seco, los filtros se pesaron en una balanza analítica (Mettler Toledo modelo XS105) hasta obtener un peso constante por filtro.

Para calcular el PST durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento del cultivo, se extrajeron 20 mL de cada matraz y posteriormente las muestras estuvieron 35 min con 20 mL de formiato de amonio al 3% para eliminar las sales. Las muestras se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio previamente pesados. Los filtros con muestra se colocaron en una estufa a 60 °C, y a partir de las 72 horas se pesaron en una balanza analítica, hasta que su peso fuera constante, y finalmente obtener el peso seco total.

El PSI se obtuvo incinerando los filtros en una mufla a 490 °C por 4 horas. Posteriormente, se pesaron los filtros en una balanza analítica hasta conseguir un peso constante por filtro. El peso orgánico se calculó restando a los valores del peso seco total el valor del peso de las cenizas para cada filtro. Las siguientes fórmulas ayudaron a estimar el valor de PST, PSI y PSO:

$$\text{PST} = \frac{(\text{Peso seco del filtro} + \text{muestra}) - (\text{Peso seco del filtro})}{(\text{Volumen filtrado del cultivo})}$$

$$\text{PSI} = \frac{(\text{Peso seco del filtro} + \text{muestra cenizas}) - (\text{Peso seco del filtro})}{(\text{Volumen filtrado del cultivo})}$$

$$\text{PSO} = (\text{PST} - \text{PSI})$$

### Composición proximal

El análisis de la composición proximal de las muestras se realizó durante la fase exponencial y estacionaria de los cultivos. Se tomaron alícuotas de 10 mL de cada cultivo y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman® GF/C) de 25 mm de diámetro y 1 µm de apertura de poro. La cuantificación del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos se realizó por métodos espectrofotométricos.

Para el análisis de proteínas se construyó una curva de calibración al usar albúmina de suero de bovino. Se utilizó la metodología desarrollada por Lowry et al. (1951). Las condiciones de extracción de las proteínas para cada especie están descritas en la tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones de extracción para cuantificación de proteínas de *Synechococcus elongatus* y *Phormidium* sp.

Especie	Normalidad	Tiempo de Incubación (min)	Autores
<i>Phormidium</i> sp.	0.2 N	20 min	Jiménez-Valera, 2016
<i>Synechococcus elongatus</i>	0.1 N	30 min	Campa-Ávila, 2002

Para la extracción de las proteínas las muestras se mantuvieron por 45 min Lowry et al. (1951) en un sonicador (Ultrasonic Cleaner, Vivo Home®) con agua templada. Se realizaron dos extracciones para las proteínas. La cuantificación se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma®) y agua destilada en proporción 1:1. Las muestras se homogeneizaron con un agitador vórtex (Vortexer mini, VWR®) y se dejaron en reposo por 90 min en oscuridad. Para evaluar la concentración de proteínas de las muestras se realizaron lecturas a 750 nm en un espectrofotómetro (Hach® DR6000).

Para el análisis de carbohidratos se realizó una curva de calibración con glucosa anhidra (Sigma®, 98%). La extracción de los carbohidratos se efectuó siguiendo el método descrito por Dubois et al. (1956) basado en la utilización de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y fenol al 5%. Las muestras se colocaron en una celda de cuarzo de 3 mL y se realizaron lecturas a 485 nm en un espectrofotómetro (Hach® DR6000).

El análisis de lípidos se realizó según la metodología de Bligh y Dyer (1959) basado en el uso de una solución 1:2 de cloroformo-metanol. Se construyó una curva de calibración con una solución de tripalmitina (Sigma®, 98%). Para la extracción de lípidos, a las muestras

se les aplicó sonicación (Ultrasonic Cleaner, Vivo Home®) por 45 min, se centrifugaron (en un equipo Eppendorf modelo 5810R) a 4 °C por 15 min y el sobrenadante obtenido se transfirió a tubos de ensayo de 15 mL. En la segunda extracción se repitió el mismo procedimiento para posteriormente añadir el segundo sobrenadante al mismo tubo. Se agregó la solución de clorofomo-metanol formando una bifase donde se separan los solventes. Los lípidos al ser afines al cloroformo, por su polaridad similar, quedaron en la fase inferior del tubo. Las muestras se colocaron en una estufa a 50 °C hasta la evaporación de los solventes y obtener únicamente los lípidos. Para la cuantificación se realizó el método descrito por Pande et al. (1963) utilizando mezcla crómica (ácido crómico). Las muestras se colocaron en baño María (100 °C) por 15 min. Una vez que las muestras se encontraban a temperatura ambiente, se les agregó agua destilada y se homogeneizaron con un vórtex (Vortexer mini, VWR®). Las muestras se colocaron en una celda de cuarzo de 3 mL y se realizaron lecturas a 590 nm en un espectrofotómetro (Hach® DR6000).

### Pigmentos

Para evaluar la concentración de los pigmentos fotosintéticos se colectaron 5 mL de muestra de cada tratamiento y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman® GF/C) de 25 mm de diámetro y 1 µm de apertura de poro. La extracción de los pigmentos se realizó con 5 mL de acetona al 90%. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 24 h y en oscuridad. Para la medición de los pigmentos se implementó el método descrito por Parsons et al. (1984) el cual está basado en técnicas espectrofotométricas. La cuantificación se realizó siguiendo el método tricromático haciendo lecturas a 664 nm, 647

nm y 630 nm para las clorofilas y, a 510 nm y 480 nm para los carotenoides. La lectura de las muestras se efectuó en un espectrofotómetro (Hach® modelo DR6000).

Se cuantificaron los pigmentos fotosintéticos con las ecuaciones propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975).

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 11.85 A_{664} - 1.54 A_{647} - 0.08 A_{630}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g ml}^{-1}) = -5.43 A_{664} + 21.03 A_{647} - 2.66 A_{630}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 7.6 (A_{480} - 1.49 A_{510})$$

$$\text{Concentración final } (\mu\text{g ml}^{-1}) = \frac{C \times v}{V \times 10}$$

Dónde:

A = absorbancia corregida a la  $\lambda$  señalada

C = valor calculado con las ecuaciones

v = volumen de acetona al 90% empleado en la extracción (en mL)

V = volumen de muestra filtrada (en L)

#### Tratamiento estadístico

Las curvas de crecimiento evaluadas por medio de conteos para cada condición experimental se comparó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para esta prueba se analizó la linealidad, la normalidad y la homogeneidad de varianzas. En caso de no cumplir con los parámetros anteriormente mencionados, se utilizó un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis).

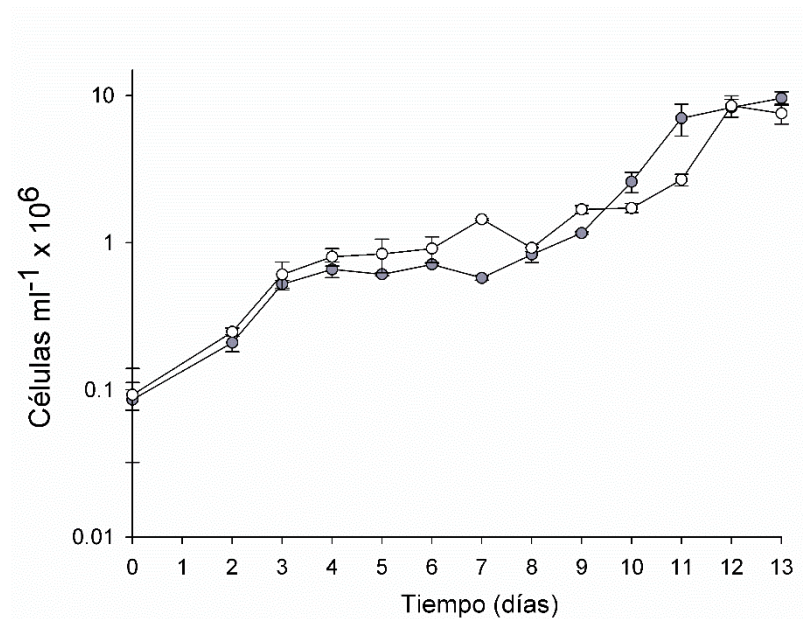
Se utilizaron dos análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar identificar las diferencias significativas, entre el tipo de aporte químico de nitrógeno y la fase de crecimiento (exponencial y estacionaria), para cada una de las variables de respuesta (tamaño, peso seco total, peso seco orgánico y contenido de cenizas, proteínas, carbohidratos y lípidos, clorofila a, y carotenos).

### 3. Resultados

#### *Phormidium* sp.

##### Densidad celular

La curva de crecimiento de *Phormidium* sp. presentó su fase exponencial del día 2 al 4. A partir del día 4 se consideró el inicio de la fase estacionaria (Figura 1). No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre los aportes de nitrógeno ( $p=0.339$ ).

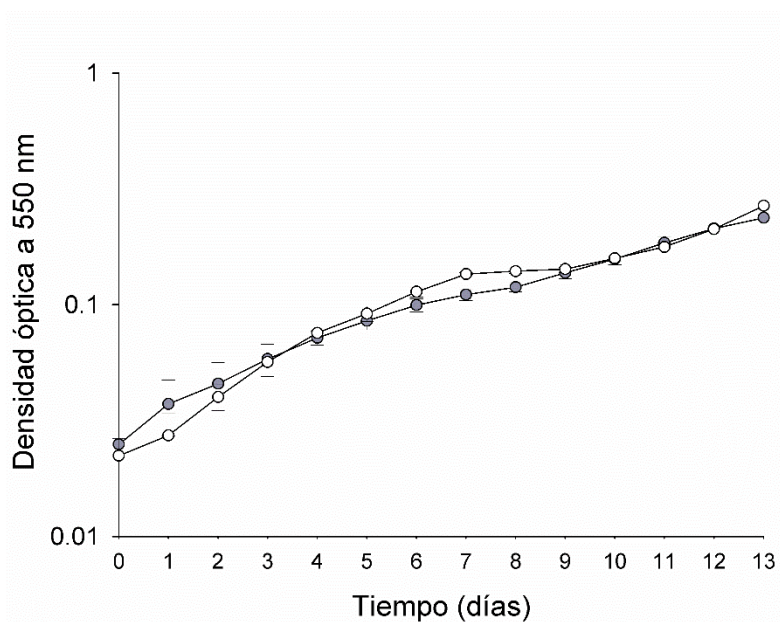


**Figura 1.** Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células mL<sup>-1</sup> x 10<sup>6</sup>) de cultivos de *Phormidium* sp. mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio ● y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico (Kruskal-Wallis) de una vía.

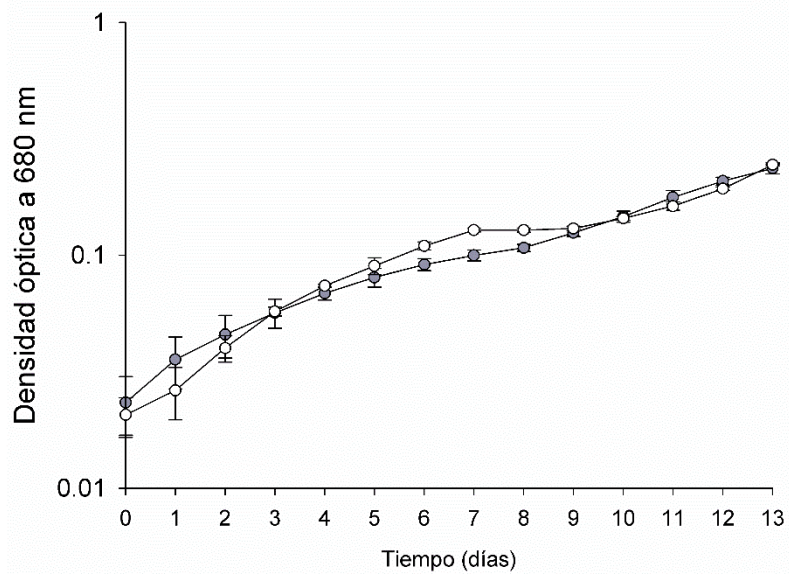
## Densidad óptica y pH

No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *Phormidium* sp. por el efecto del aporte de nitrógeno evaluado a 550 nm ( $p=0.717$ ) y tampoco al ser medido a 680 nm ( $p=0.645$ ) (Figuras 2 y 3).

El mayor valor de pH de los cultivos de *Phormidium* sp. se registró en el tratamiento con aporte de nitrato en el medio y el menor valor de pH se midió en el tratamiento con amonio.



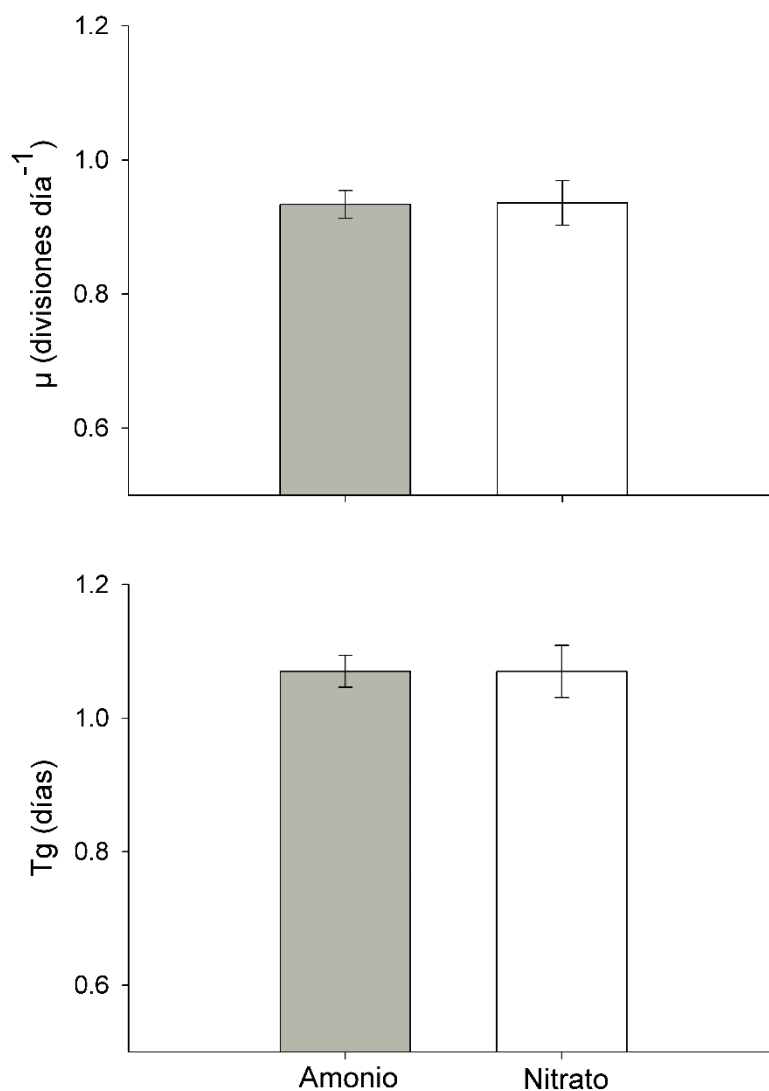
**Figura 2.** Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica a 550 nm de cultivos de *Phormidium* sp. mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico (Kruskal-Wallis) de una vía.



**Figura 3.** Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica a 680 nm de cultivos de *Phormidium* sp. mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico (Kruskal-Wallis) de una vía.

### Tasa de crecimiento y tiempo de generación

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) (divisiones por día<sup>-1</sup>) ( $p=0.925$ ) y tampoco en el tiempo de generación ( $p=0.827$ ) por el efecto del aporte de nitrógeno en los cultivos de *Phormidium* sp. (Figura 4).



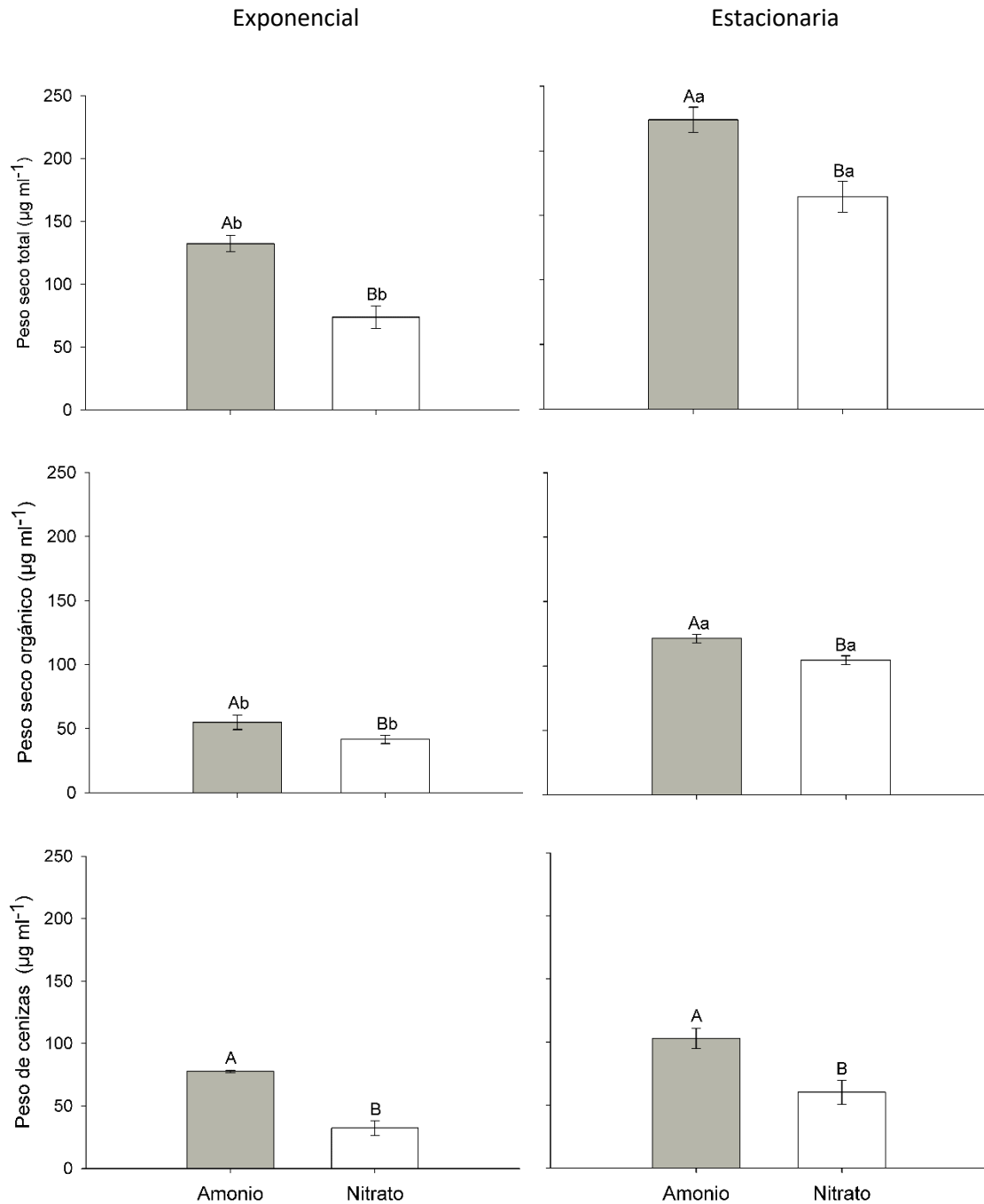
**Figura 4.** Valores promedio y desviación estándar de la tasas de crecimiento y el tiempo de generación de cultivos de *Phormidium* sp. mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

### Peso seco total, peso seco orgánico y peso de cenizas

El peso seco total (PST) evaluado en los cultivos de *Phormidium* sp. presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.001$ ) y también por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.001$ ) y en la fase estacionaria ( $p=0.003$ ).

El peso seco orgánico (PSO) evaluado en los cultivos de *Phormidium* sp. presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.003$ ) y por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.022$ ) y en la fase estacionaria ( $p=0.004$ ).

El peso de cenizas (PC) evaluado en los cultivos de *Phormidium* sp. no presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.095$ ). Sin embargo, si hubo diferencias significativas en el peso de las cenizas por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.022$ ) y en la fase estacionaria ( $p=0.004$ ) (Figura 5).



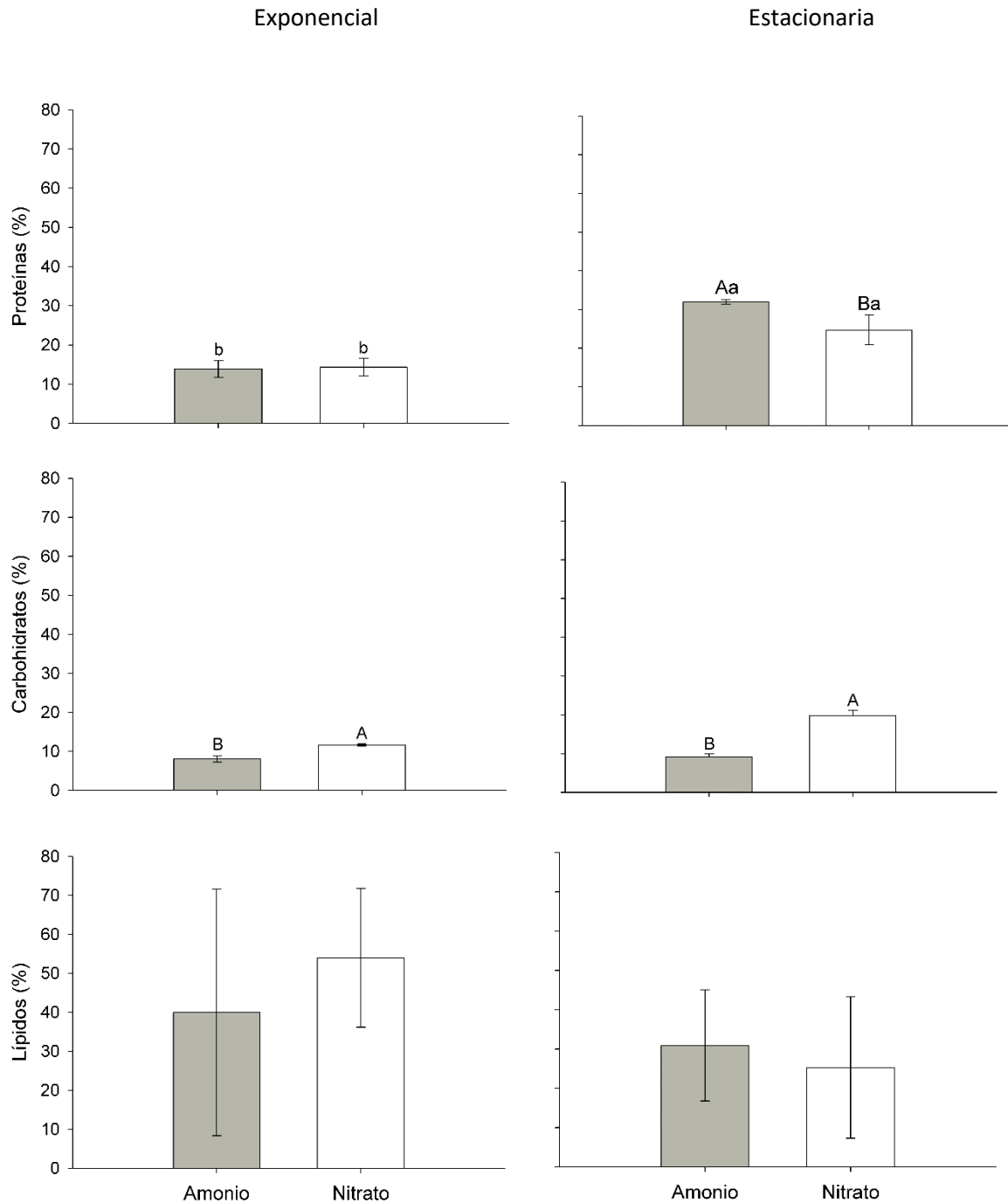
**Figura 5.** Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, peso seco orgánico y peso de cenizas ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de *Phormidium* sp. en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno ( $A > B$ ). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento ( $a > b$ ).

### Composición proximal

El porcentaje de proteínas evaluado en los cultivos de *Phormidium* sp. presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.000$ ). No hubo diferencias significativas en el contenido de proteínas por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.801$ ), pero en la fase estacionaria si se encontraron diferencias significativas ( $p=0.049$ ).

El porcentaje de carbohidratos evaluado en los cultivos de *Phormidium* sp. no presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.200$ ). Sin embargo, si se evaluaron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.002$ ) y también en la fase estacionaria ( $p=0.001$ ).

El porcentaje de lípidos evaluado en los cultivos de *Phormidium* sp. no presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.134$ ). No hubo diferencias significativas en el contenido de lípidos por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.541$ ), ni en la fase estacionaria ( $p=0.694$ ) (Figura 6).

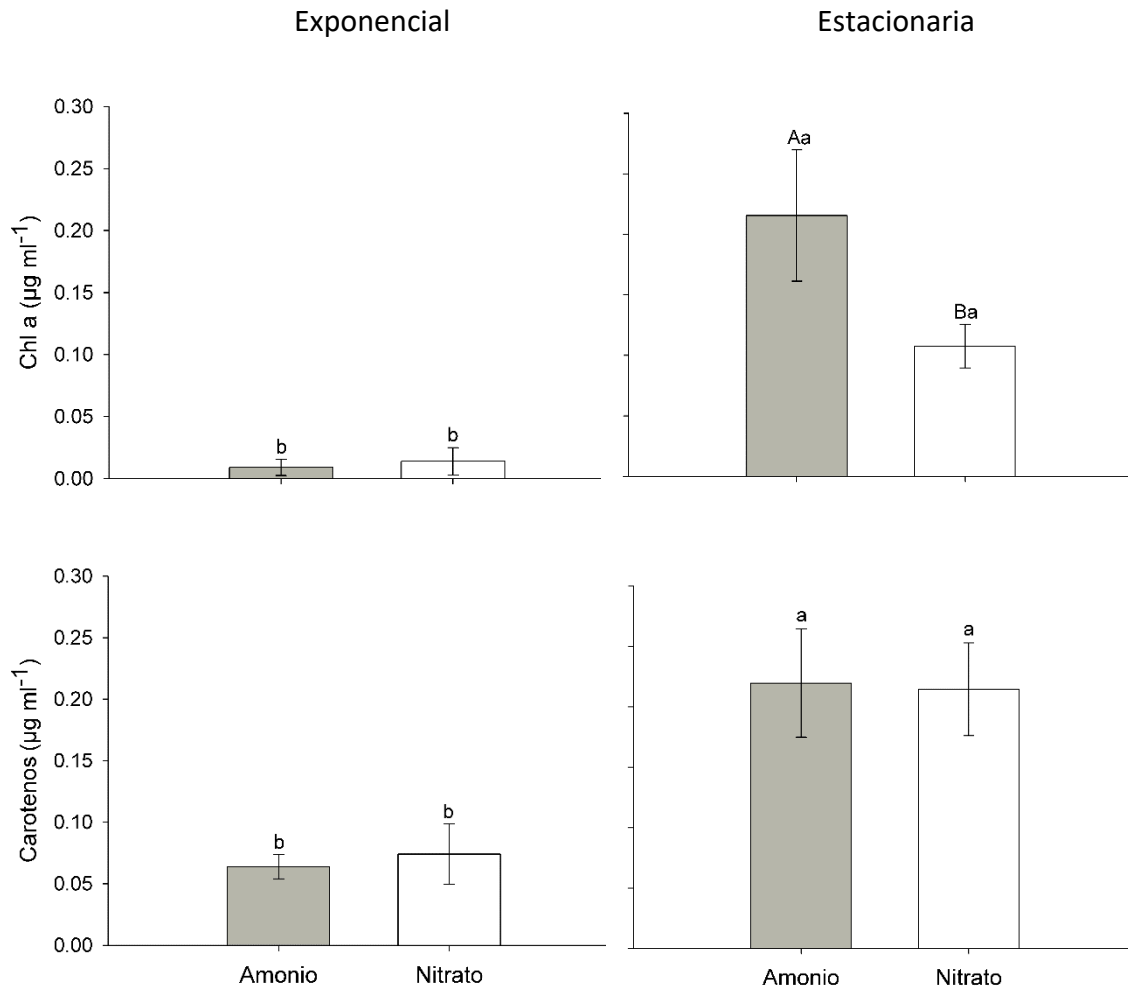


**Figura 6.** Valores promedio y desviación estándar de valores de proteínas, carbohidratos, y lípidos (%) de *Phormidium* sp. en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b).

### Pigmentos fotosintéticos

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de clorofila *a* (Chl *a*) entre las fases de crecimiento ( $p=0.003$ ). No se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de Chl *a* por el efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial del cultivo ( $p=0.535$ ). Sin embargo, en la fase estacionaria de crecimiento de *Phormidium* sp. se tuvieron diferencias significativas en el contenido de Chl *a* por efecto del aportes de nitrógeno ( $p=0.030$ ) (Figura 7).

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de carotenos entre las fases de crecimiento en los cultivos de *Phormidium* sp. ( $p=0.001$ ). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de carotenos por el efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.542$ ) y tampoco en la fase estacionaria de crecimiento ( $p=0.890$ ) (Figura 7).

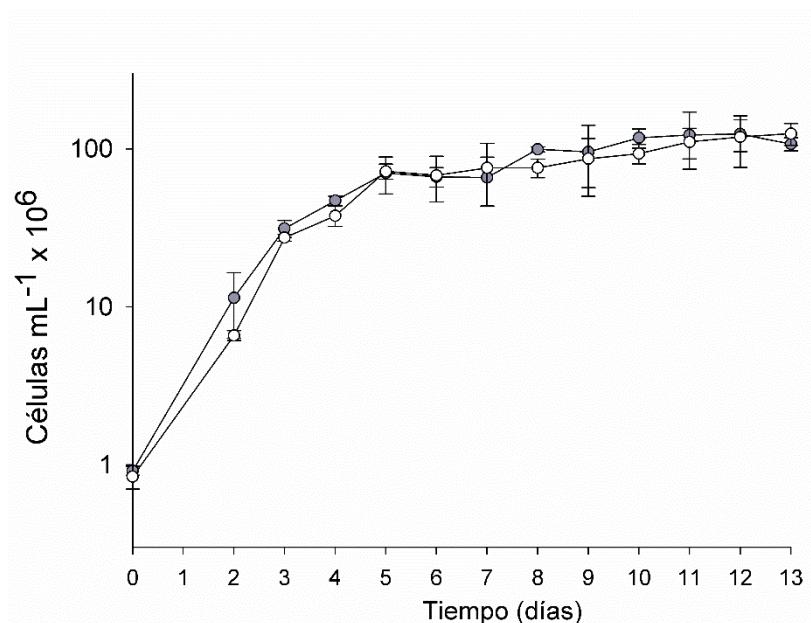


**Figura 7.** Valores promedio y desviación estándar de valores de clorofila *a* y carotenos ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de *Phormidium* sp. en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b).

## *Synechococcus elongatus*

### Densidad celular

La curva de crecimiento de *Synechococcus elongatus* presentó la fase exponencial del día 2 al 4. A partir del día 4 se consideró el inicio de la fase estacionaria (Figura 8). No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *S. elongatus* por efecto del aporte de nitrógeno ( $p=0.578$ ).

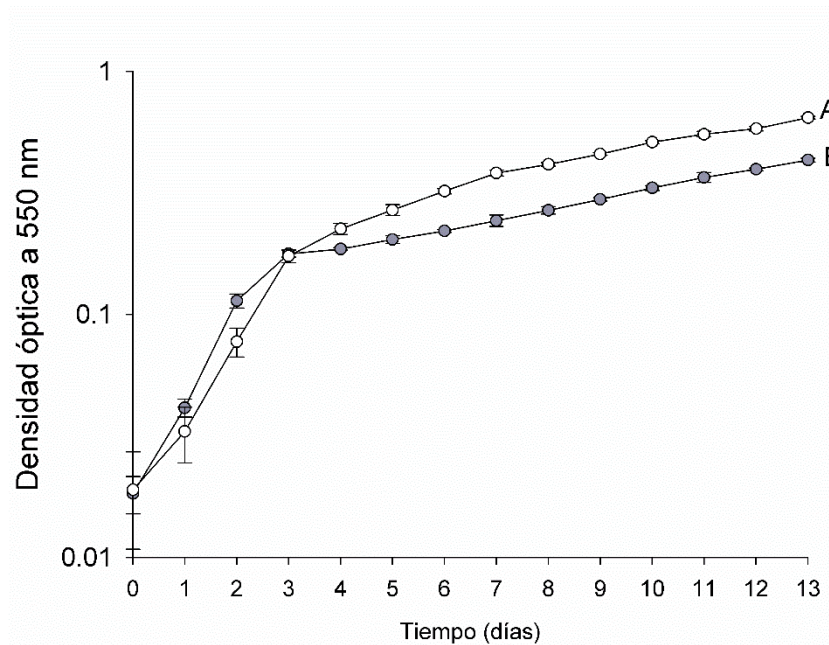


**Figura 8.** Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células mL<sup>-1</sup> x 10<sup>6</sup>) de cultivos de *Synechococcus elongatus* mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio ● y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

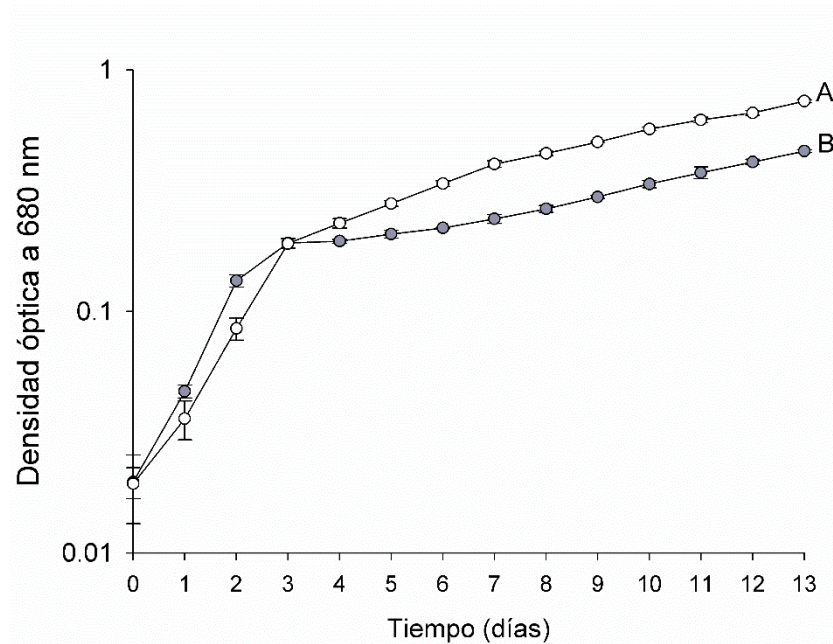
### Densidad óptica y pH

Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *S. elongatus* por el efecto del aporte de nitrógeno con las mediciones realizadas a 550 nm ( $p=0.017$ ) y a 680 nm ( $p=0.013$ ) (Figura 9) (Figura 10).

Los valores de pH de los cultivos de *S. elongatus* oscilaron entre 8.1-10.2 durante los días de experimentación. Los valores de pH promedio de los cultivos de *S. elongatus* fueron con amonio de 9.03 y con nitrato de 9.51.



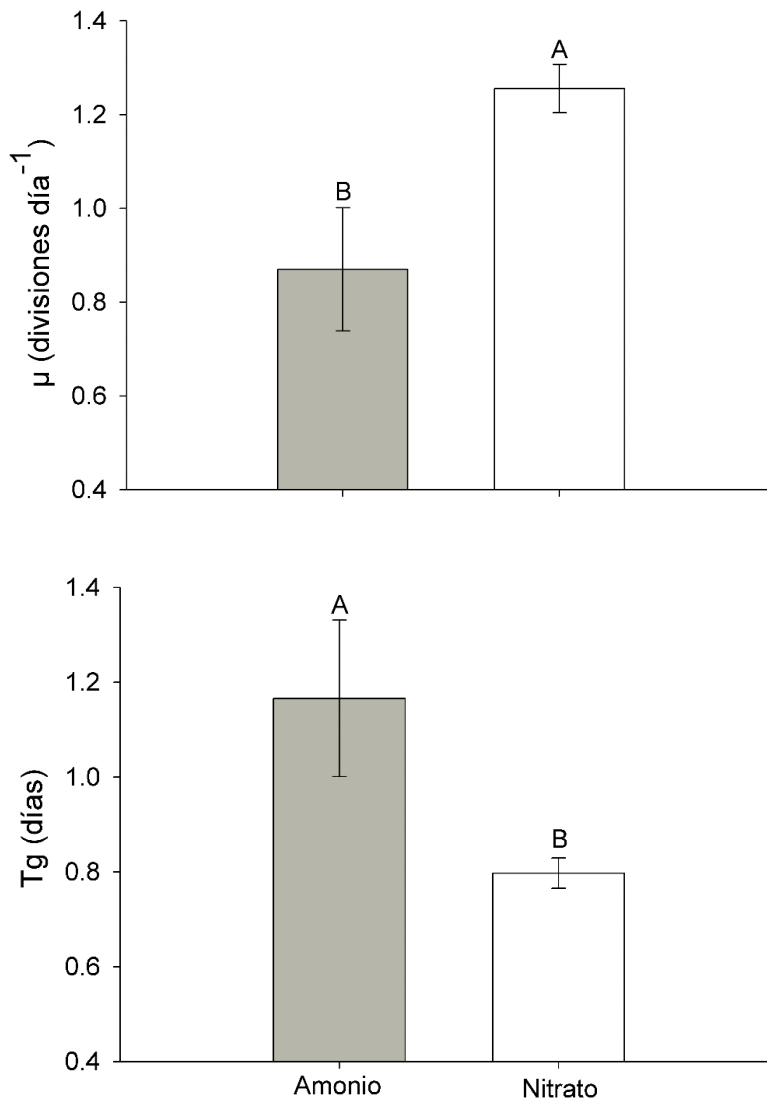
**Figura 9.** Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica a 550 nm de cultivos de *Synechococcus elongatus*, mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico (Kruskal-Wallis) de una vía. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).



**Figura 10.** Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica a 680 nm de cultivos de *Synechococcus elongatus*, mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico (Kruskal-Wallis) de una vía. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).

### Tasa de crecimiento y tiempo de generación

Se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) (divisiones por día<sup>-1</sup>) ( $p=0.001$ ) y en el tiempo de generación ( $p=0.019$ ) por el efecto del aporte de nitrógeno en los cultivos de *S. elongatus* (Figura 11).



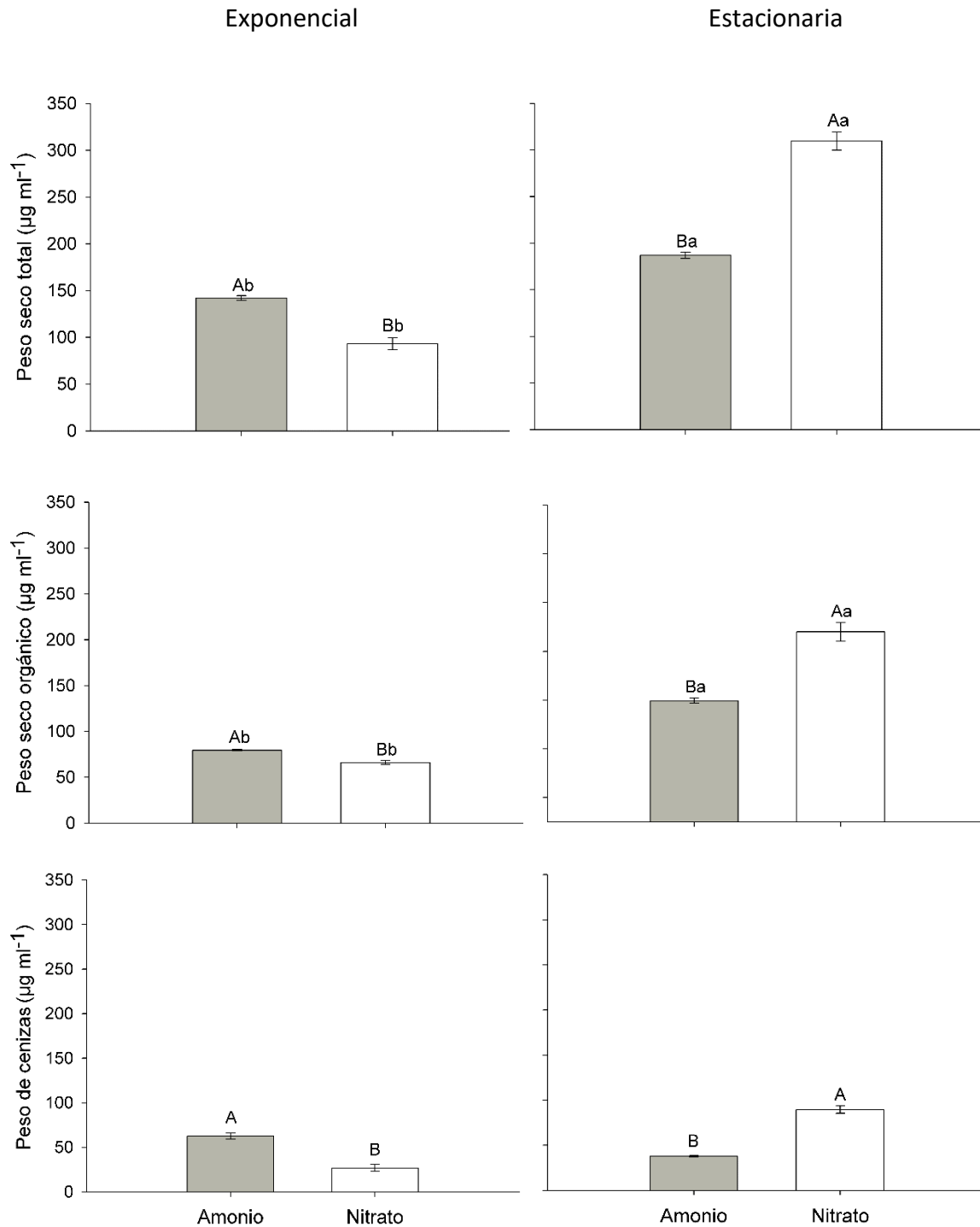
**Figura 11.** Valores promedio y desviación estándar de la tasas de crecimiento y el tiempo de generación de cultivos de *Synechococcus elongatus* mantenidos en sistemas por lotes con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se encontraron diferencias significativas entre los aportes de nitrógeno. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).

### Peso seco total, peso seco orgánico y peso de cenizas

El peso seco total (PST) evaluado en los cultivos de *S. elongatus* presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.003$ ) y también por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.000$ ) y en la fase estacionaria ( $p=0.049$ ).

El peso seco orgánico (PSO) evaluado en los cultivos de *S. elongatus* presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.000$ ) y también por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.001$ ) y en la fase estacionaria ( $p=0.000$ ).

El peso de ceniza (PC) evaluado en los cultivos de *S. elongatus* no presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.149$ ). Sin embargo, si presentó diferencias significativas en el contenido de las cenizas por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.000$ ) y en la fase estacionaria ( $p=0.0495$ ) (Figura 12).



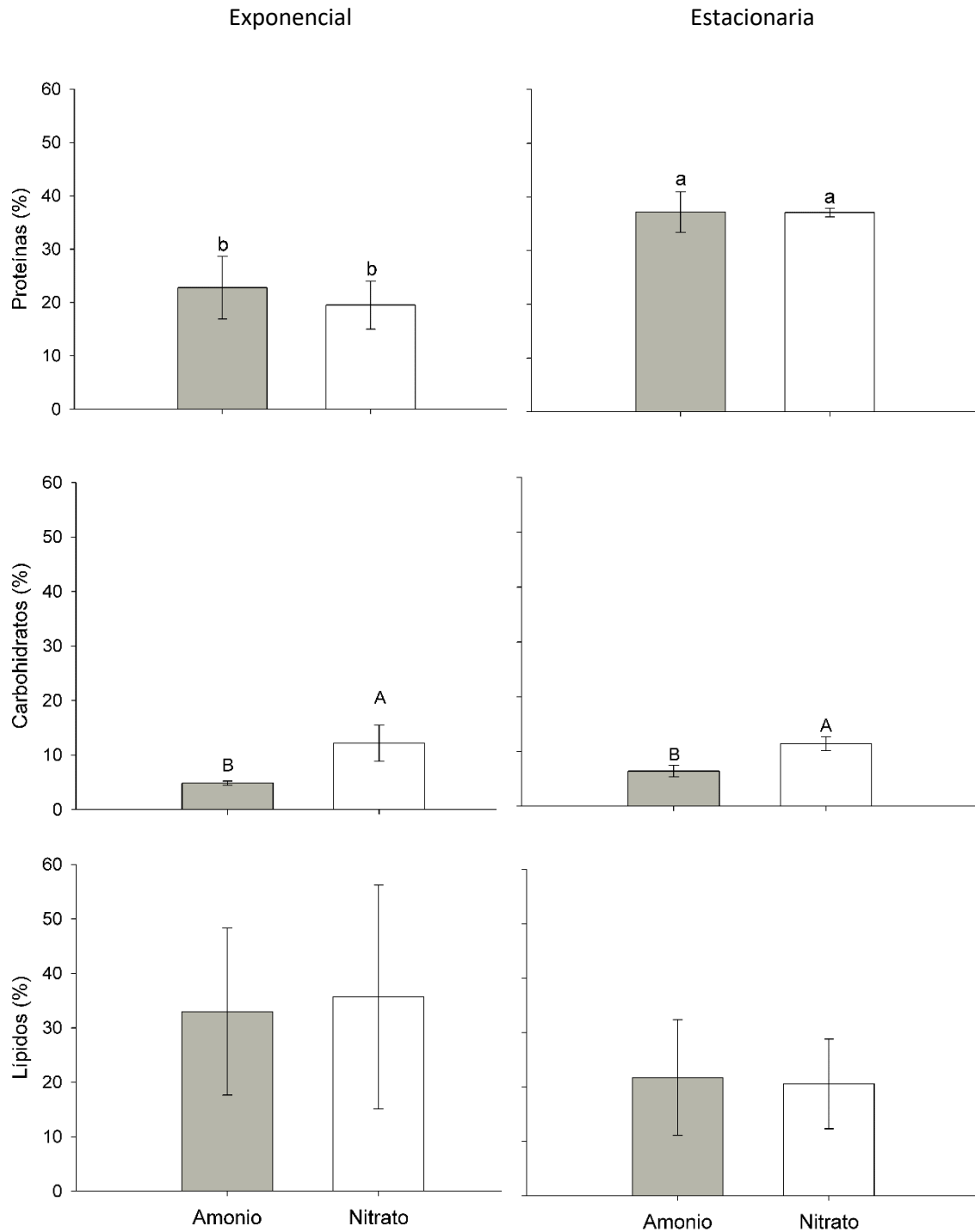
**Figura 12.** Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, peso seco orgánico y peso de cenizas ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de *Synechococcus elongatus* en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b).

### Composición proximal

El porcentaje de proteínas evaluado en los cultivos de *S. elongatus* presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.000$ ). No se tuvieron diferencias significativas en el contenido de proteínas por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.491$ ), y tampoco en la fase estacionaria si ( $p=0.517$ ).

El porcentaje de carbohidratos evaluado en los cultivos de *S. elongatus* no presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.877$ ). Se tuvieron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos por el efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.049$ ) y también en la fase estacionaria ( $p=0.006$ ).

El porcentaje de lípidos evaluado en los cultivos de *S. elongatus* no presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ( $p=0.109$ ). No se tuvieron diferencias significativas en el contenido de lípidos por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.827$ ) y tampoco en la fase estacionaria ( $p=0.890$ ) (Figura 13).

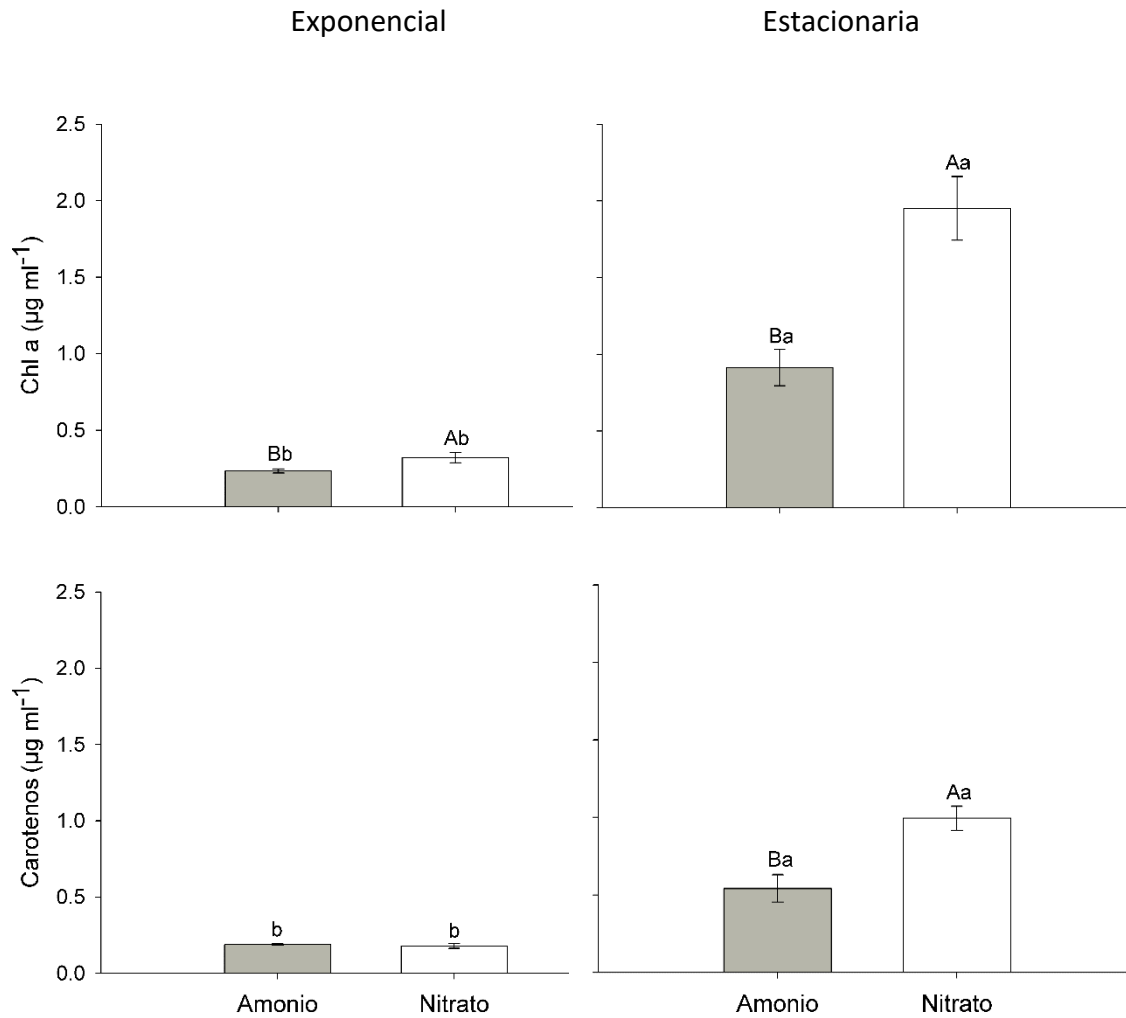


**Figura 13.** Valores promedio y desviación estándar de valores de proteínas, carbohidratos, y lípidos (%) de *Synechococcus elongatus* en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b).

### Pigmentos fotosintéticos

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de clorofila *a* (Chl *a*) entre las fases de crecimiento ( $p=0.003$ ) de los cultivos de *S. elongatus*. Se tuvieron diferencias significativas en el contenido de Chl *a* por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial del cultivo ( $p=0.014$ ) y también en la fase estacionaria ( $p=0.002$ ).

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de carotenos entre las fases de crecimiento en los cultivos de *S. elongatus* ( $p=0.003$ ). No se tuvieron diferencias significativas del contenido de carotenos por efecto del aporte de nitrógeno en la fase exponencial ( $p=0.345$ ), sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en la fase estacionaria de crecimiento ( $p=0.003$ ) (Figura 14).



**Figura 14.** Valores promedio y desviación estándar de valores de clorofila *a* y carotenos ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de *Synechococcus elongatus* en fase exponencial y fase estacionaria con dos aportes de nitrógeno (amonio • y nitrato ○). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía por efecto del aporte de nitrógeno y por fase de crecimiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B). Las letras minúsculas indican diferencias significativas por la fase de crecimiento (a>b).

#### 4. Discusión

##### *Phormidium* sp.

##### Crecimiento

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los cultivos de *Phormidium* sp. entre los tratamientos utilizados (amonio y nitrato). En el trabajo de Khazi et al. (2018) hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento debido al aporte químico de nitrógeno. Se encontró que *Phormidium* sp. tuvo un mayor crecimiento en amonio ( $\mu = 0.284 \pm 0.030$ ) que en nitrato ( $\mu = 0.250 \pm 0.000$ ). La posible razón por la que se obtuvieron resultados opuestos en ambos trabajos es que las condiciones de cultivo utilizadas fueron diferentes. En el trabajo realizado por Khazi et al. (2018) esta especie fue cultivada en agua de mar ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ) con medio BG-11 (Rippka, 1988). Mientras que en el cultivo de *Phormidium* sp. para este trabajo se utilizó agua dulce y medio "f" (Guillard, Ryther, 1962).

La manipulación de diferentes especies y cambios en las condiciones de cultivo es un factor que puede generar variación en los resultados de los experimentos. Los resultados obtenidos muestran que a pesar de pertenecer al mismo género de *Phormidium* sp. las especies pueden variar su respuesta a las distintas variables experimentales debido a las condiciones experimentales como lo describen Vishwanath et al. (2016), quienes al mantener a seis especies de cianobacterias en distintas condiciones de cultivo (pH, salinidad y temperatura) observaron variaciones. Se encontró que por efecto del pH en *Phormidium corium* fue mayor el crecimiento ( $3.540 \pm 0.390 \mu\text{g ml}^{-1}$  de clorofila *a*) en 8.4, mientras que

*Phormidium tenue* tuvo mayor crecimiento ( $4.080 \pm 0.450 \mu\text{g ml}^{-1}$  de clorofila *a*) en 7.5. Por efecto de la salinidad *P. tenue* tuvo mayor crecimiento a 16 ppt ( $5.610 \pm 0.410 \mu\text{g ml}^{-1}$  de clorofila *a*), mientras que *P. corium* fue a 25 ppt ( $4.320 \pm 0.660 \mu\text{g ml}^{-1}$  de clorofila *a*). Por efecto de la temperatura, *P. corium* tuvo mayor crecimiento a  $30^{\circ}\text{C}$  ( $2.910 \pm 0.140 \mu\text{g ml}^{-1}$  de clorofila *a*), mientras que *P. tenue* tuvo mayor crecimiento a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $6.360 \pm 0.450 \mu\text{g ml}^{-1}$  de clorofila *a*).

La densidad celular por conteo directo de los filamentos de *Phormidium* sp. no mostró diferencias significativas por efecto de los tratamientos experimentales. El conteo directo de cianobacterias filamentosas probablemente no sea la mejor técnica para evaluar el crecimiento de la densidad celular del cultivo. Esto se debe a que, dependiendo de la fase de crecimiento va a variar la longitud de los filamentos. En la cámara de conteo del hematocitómetro, se pudo observar que al inicio del cultivo los filamentos fueron más cortos y con el paso del tiempo se incrementó su longitud. Lo anterior, podría resultar en una estimación poca precisa de la cantidad de biomasa en un cultivo de microalgas filamentosas.

Para realizar el conteo directo de los filamentos, se realizó agitación mecánica en cada una de las alícuotas de las muestras de los filamentos de *Phormidium* sp. Se ha encontrado que los filamentosas de las cianobacterias pueden fragmentarse al realizar agitación mecánica o bien por el burbujeo de aire en los cultivos (Clemente et al., 2020). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, a pesar de lo antes mencionado para el conteo de los filamentos, los cambios en la longitud de acuerdo con la edad del cultivo y la ruptura de los filamentos debido a la agitación, se encontró que las curvas de crecimiento

evaluadas para *Phormidium* sp. mostraron una tendencia al incremento en el número de filamentos respecto al tiempo al evaluar por medio de conteos directos y densidad óptica evaluada.

#### Peso seco total, peso seco orgánico y peso seco inorgánico

En los cultivos de *Phormidium* sp. el aporte químico de amonio en el medio promovió un incremento en el peso seco total (PST) en ambas fases de crecimiento. En el trabajo de Jiménez-Valera (2016) se encontró que el PST en la fase estacionaria con nitrato como aporte de nitrógeno en el medio obtuvo un valor 14 veces menor que el de este trabajo. Esta diferencia entre los valores pudo ser debido a que en este trabajo se utilizó una mayor densidad de inóculo.

El peso seco orgánico (PSO) de *Phormidium* sp. con el tratamiento de nitratos evaluado en este trabajo, fue 18 veces mayor que el valor expresado en la investigación de Jiménez-Valera (2016). El peso seco inorgánico (PSI) o peso de cenizas obtenido en este trabajo representa 10 veces más que el valor obtenido en el trabajo de Jiménez-Valera (2016). Esta diferencia de resultados se asume a que se debe a la desigualdad del inóculo inicial.

En el trabajo de Jiménez-Valera (2016) se iniciaron los cultivos de *Phormidium* sp. con un inóculo de  $1 \times 10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$ , mientras que en este trabajo se usó un inóculo de  $8.5 \times 10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Esta diferencia en la concentración de células usadas como inóculo pudo originar las diferencias antes descritas para los componentes del análisis gravimétrico.

Se sabe que el tamaño del inóculo es un factor importante que modifica el crecimiento de los cultivos de microalgas y repercute en su metabolismo. En el trabajo de Lu et al. (2013) usaron cultivos de *Chlorella sorokiniana* para promover mayor síntesis de fosfolípidos para la mayor producción de biocombustibles. Compararon 4 densidades de inóculos:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , y  $1 \times 10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Encontraron que hubo diferencias significativas entre las concentraciones de inóculos en *C. sorokiniana* en el rendimiento y crecimiento de las células. Concluyeron que la mejor condición de cultivo para su objetivo fue usar una densidad de inóculo de  $1 \times 10^6$  y la cual incrementó la concentración de fosfolípidos. Los resultados encontrados para *C. sorokiniana* muestran el efecto de la cantidad del inóculo y los cambios en el metabolismo de síntesis. Por lo anterior, en los cultivos de *Phormidium* sp. realizados en este estudio se evaluó un mayor contenido del PST, PSO y PSI, respecto a lo obtenido por Jiménez-Valera (2016).

En el trabajo de Jiménez-Valera (2016) realizado con cultivos de *Phormidium* sp. usaron el medio "f" con aporte químico de nitratos y no con el uso de amonio. Al comparar los resultados del PST obtenido en este trabajo para los cultivos de *Phormidium* sp. con amonio como aporte químico de nitrógeno, fueron 20 veces mayor, el PSO fue 22 veces mayor y el PSI fue 17 veces mayor respecto a lo obtenido por Jiménez-Valera (2016). El incremento en los valores del análisis gravimétrico del peso seco obtenido en este trabajo, podrían estar relacionados por el mayor contenido de proteínas y de clorofila *a* (*Chl a*) que tuvo *Phormidium* sp. en los cultivos en donde se utilizó amonio como aporte químico de nitrógeno en el medio de cultivo.

### Pigmentos y composición proximal

En este trabajo *Phormidium* sp. presentó un aumento en el contenido de los pigmentos fotosintéticos y de los valores de proteínas. El uso de amonio como aporte químico de nitrógeno en el medio y durante la fase estacionaria, promovió un incremento en el contenido de proteínas ( $31.909\% \pm 0.582$ ) y de clorofila a (Chl *a*) ( $21.544 \pm 5.421 \mu\text{g m}^{-3}$ ). a comparación del desempeño en nitrato ( $24.674\% \pm 3.862$ ). Un resultado similar fue obtenido para el contenido de Chl *a* y que fue significativamente mayor en amonio ( $21.544 \pm 5.421 \mu\text{g m}^{-3}$ ) que los valores medidos en nitratos ( $10.746 \pm 1.801 \mu\text{g m}^{-3}$ ) en la fase de crecimiento estacionaria. Se ha descrito que el aumento del contenido de proteínas está relacionado con la concentración de la Chl *a* por los complejos de biliproteínas y de HLIP (High Light Intensity Protein por sus siglas en inglés) que se encuentran en los fotosistemas de la membrana tilacoidal (Bag, 2021).

El complejo antena que poseen los organismos fotosintéticos es responsable de capturar la energía lumínica y transferirla hacia el centro de reacción del núcleo del fotosistema. Las cianobacterias en lugar de tener LHC (Light Harvesting Complex por sus siglas en inglés) como se presentan en eucariotas, este grupo de organismos procariontes posee un complejo de proteínas inducible por luz intensa o HLIP que son consideradas ancestros del complejo LHC (Bag, 2021). En el trabajo de Khazi et al. (2018) encuentran un incremento en la concentración de proteína (%) en las células de *Phormidium* sp. y del contenido de clorofila al mantener cultivos con amonio como aporte químico de nitrógeno.

Esta tendencia antes descrita para *Phormidium* sp. en este trabajo resultó diferente a la que se menciona en el trabajo de Tapia et al. (1996), quienes expusieron cultivos de *Phormidium laminosum* en inanición de nitrógeno y posteriormente cuando se reabasteció el aporte de nitrógeno se suministró con dos formas químicas: amonio y nitrato. Cuando se suministró amonio a los cultivos, la relación de proteína/clorofila aumentó de forma constante ya que la síntesis de proteínas se favoreció sobre la síntesis de la clorofila. Las posibles diferencias encontradas para *Phormidium* sp. en este trabajo respecto a lo evaluado por Tapia et al. (1996), posiblemente sean debidas a que, en el trabajo realizado por estos autores, se mantuvo a las células sin aporte de nitrógeno y al suministrarlo las células estuvieron ávidas de este nutriente y por lo que se incrementó el contenido de proteína/clorofila.

Para los cultivos de *Phormidium* sp. en este trabajo se obtuvieron diferencias en el contenido de carbohidratos por efecto del aporte químico de nitrógeno en el medio y por efecto de la fase de crecimiento, teniendo los mayores valores en el tratamiento con nitratos ( $19.789\% \pm 1.378$ ) y que fue 46% superior respecto a lo obtenido con el tratamiento con amonio ( $9.199\% \pm 0.716$ ). Los valores de carbohidratos evaluados en este trabajo resultaron similares a lo descrito por Jiménez-Valera (2016), quién reportó porcentaje promedio de  $21.000\% \pm 3.100$  con el tratamiento con nitratos. Se encontró poca información disponible sobre la composición proximal de *Phormidium* sp. al mantenerse en cultivo con diferentes aportes químicos de nitrógeno. Sin embargo, se ha demostrado que en especies del mismo género Oscillatoriales, como *Arthrospira platensis*, tienen mayor contenido de carbohidratos cuando se utiliza nitratos como aporte químico de nitrógeno

en el medio de cultivo (Braga, 2018). Hay varias posibles explicaciones de esta diferencia en el contenido de carbohidratos para *Phormidium* sp. Una de estas explicaciones, es que el incremento en el contenido de carbohidratos con respecto a la síntesis de proteínas con nitratos sea debido a que las células de *Phormidium* sp. gastan mayor cantidad de energía para absorber nitratos. Por lo anterior, no invierten energía en reacciones oxidativas que se necesitan para proseguir con la producción de proteínas. Pudiese ser que las células de *Phormidium* sp. al usar nitratos, en lugar de invertir su energía metabólica restante lo invierta en producir una biomolécula más “económica” como lo son los carbohidratos. Se gastan 8 electrones menos para absorber amonio respecto al uso de nitratos (Thompson et al., 1989), lo que permite un ensamblaje más económico de aminoácidos y así empezar la producción de proteínas.

Se ha descrito que un mayor valor de la relación de carbono/proteína (C/P) se debe a un cambio en el metabolismo durante el crecimiento del cultivo (síntesis de proteínas) o el almacenamiento de energía (síntesis de carbohidratos) (Sanz et al., 1995). Este cambio en la relación C/P se pudo ver reflejada en la mayor producción de biomasa (PSO) obtenida en este trabajo para *Phormidium* sp. y con amonio como aporte químico de nitrógeno. Con el aporte químico de amonio en el medio de cultivo para *Phormidium* sp. se encontró un mayor valor de PSO ( $121.333 \pm 3.346 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y también mayor síntesis de proteínas ( $31.909\% \pm 0.582$ ), con menor porcentaje de carbohidratos ( $9.199\% \pm 0.716$ ). Cuando el aporte de nitrógeno al medio fue en forma de nitrato, hubo un menor crecimiento del cultivo, esto representó un menor contenido de proteínas ( $24.674\% \pm 3.862$ ) y un mayor contenido de carbohidratos ( $19.789\% \pm 1.378$ ). Algunos autores

mencionan que estos cambios en la síntesis son el resultado de un balance entre la producción de biomoléculas (Fry y Packer, 1990) y describen que la productividad de un componente de la biomasa (en este caso carbohidratos) se incrementa a expensas de la producción de otro componente de la biomasa (proteínas).

En este trabajo el contenido de lípidos evaluado para *Phormidium* sp. al tenerse en cultivo con dos aportes químicos de nitrógeno y en dos fases de crecimiento, mostró altos valores de desviación de los datos. Los altos valores de desviaciones de los datos de lípidos para *Phormidium* sp. fueron debidas a que se utilizó cloroformo:metanol para la separación de los lípidos y con esta técnica se forma una bifase. Sin embargo, durante el procedimiento de análisis, no en todas las muestras estuvo bien separada la bifase y esto influyó en tener mayor desviación de los datos obtenidos y posiblemente en una subestimación. No obstante, lo anterior los valores de lípidos evaluado para *Phormidium* sp. al suministrar nitratos y amonio como aporte químico de nitrógeno en el medio y en dos fases de crecimiento, se encontró que los valores evaluados para todos los casos corresponden a contenidos de lípidos mayores que los reportados por Jiménez-Valera (2016) para ambas fases de crecimiento y al usar nitratos como aporte químico de nitrógeno.

## ***Synechococcus elongatus***

### Crecimiento

La tasa de crecimiento de *Synechococcus elongatus* en este trabajo fue mayor al suministrar nitratos como aporte químico de nitrógeno en el medio ( $\mu = 1.256 \pm 0.051$ ) respecto a lo obtenido con amonio ( $\mu = 0.870 \pm 0.131$ ). La “hipótesis del costo metabólico” indica que las células deberían inclinarse por absorber amonio por su bajo costo energético. La preferencia en la absorción de amonio se asume que representa una adaptación. Una célula microalgal requiere 36 electrones por molécula de nitrógeno para poder fijarla. De esos 36 electrones, 8 electrones (o el 22%) se utilizan para reducir nitrato a amonio. En condiciones de bajo aporte energético, debería ser posible detectar alguna indicación de esta limitación en células que crecen en nitrato respecto al uso de amonio como aporte químico de nitrógeno (Thompson et al., 1989).

Los resultados obtenidos en este trabajo con *S. elongatus* posiblemente sean debidos a que las células debieron haber desarrollado estrategias para incorporar el nitrato a su metabolismo de mejor manera que el amonio. Entre las posibles estrategias propuestas por Thompson et al. (1989) y Levasseur et al. (1993) se consideran las siguientes: 1) En la primera estrategia, en la cual las células que crecieron con nitratos podrían reducir el costo metabólico de la construcción de biomasa celular nueva a partir de la disminución de la cuota celular de nitrógeno. 2) En la segunda estrategia, podría ser que las células preferentes de nitratos incrementen la producción de energía dirigida a la reducción química y se realiza por medio del aumento del contenido de pigmentos fotosintéticos para

la mejor captación de energía lumínica. Para los resultados de crecimiento obtenidos en este trabajo con *S. elongatus*, se considera que pudo ocurrir la segunda estrategia y que hubo un aumento en la producción de clorofila cuando se suministró el aporte químico de nitrógeno en forma de nitrato. Sin embargo, no se puede atribuir el aumento del contenido de Chl *a* únicamente a esta razón en específica, ya que también el contenido de este pigmento pudo haber cambiado según la fase de crecimiento, también por efecto del aumento de la densidad celular en la fase de crecimiento estacionaria y el efecto de autosombreado por esta mayor densidad celular. 3) En la tercera estrategia y en donde las células crecieron mejor con nitratos, es que podrían hacer más eficiente el uso de reductores en comparación con las células que crecen en amonio.

Antia et al. (1975) proponen que puede haber estudios con sesgo en los que se hayan seleccionado cepas que crecen mejor en nitrato que en otras formas de nitrógeno, ya sea por su adaptación o bien por sus características fisiológicas.

Otra posible explicación por la cual no se cumple la "hipótesis del costo metabólico" es que el costo adicional de energía que usa la célula sea relativamente bajo con respecto al presupuesto energético destinado a las rutas metabólicas de síntesis. Es posible que cuando se observan diferencias en las tasas de crecimiento con varios aportes químicos de nitrógeno, se deba más a su capacidad limitada en asimilar otra forma de nitrógeno, más que por su costo metabólico (Levasseur et al., 1993; Wood y Flynn, 1995).

En el trabajo de Moore et al. (2002) encontraron que los cultivos de dos cepas marinas de *Synechococcus* sp. "MIT S9220" y "WH 8103" y que fueron mantenidos con amonio como

aporte químico de nitrógeno, tuvieron una mayor densidad celular respecto a lo obtenido al suministrar nitratos. Encontraron tasas de crecimiento mayores con el tratamiento de amonio (con la cepa “MIT S9220”  $\mu = 0.890 \pm 0.000$ , con la cepa “WH 8103”  $\mu = 0.850 \pm 0.020$ ) en contraste con los cultivos mantenidos con nitrato como fuente de nitrógeno (con la cepa “MIT S9220” no hubo crecimiento, y con la cepa “WH 8103”  $\mu = 0.550 \pm 0.030$ ). Es importante destacar, que durante los experimentos se reguló el pH de los cultivos para permitir la mejor absorción de amonio del medio. El pH se considera que es uno de los factores abióticos más importantes para el crecimiento y el desarrollo de las cianobacterias (Karakas et al., 2023).

Según Drath et al. (2008) han encontrado que el amonio es mejor absorbido en un pH menos alcalino (no mayor a 8.2). El pH promedio que mostró *S. elongatus* en los cultivos realizados en este trabajo fue de 9.03 con amonio y con nitrato de 9.51. Es importante destacar que en los cultivos realizados con *S. elongatus* y en los cuales se suministró amonio y nitratos como aporte químico de nitrógeno, no se realizó ajuste de los valores de pH del medio, lo cual posiblemente afectó la absorción del amonio en los cultivos experimentales.

En el trabajo de Laurenço et al. (2002) utilizaron varias especies de microalgas donde se suministraron diferentes aportes químicos de nitrógeno, entre ellos nitrato, amonio y urea. Los cultivos sin aireación aumentaron drásticamente los valores de pH del medio y sin importar la forma química del aporte de nitrógeno. Los autores atribuyen el incremento de pH a la falta de aireación, lo que limitó la entrada de carbono inorgánico de la atmósfera y no se pudo acidificar el medio. En los cultivos realizados en este trabajo con *S. elongatus*, no se implementó un sistema de aireación, por lo que esta puede ser una

explicación para el aumento del pH del medio. Los altos valores del pH del medio en los cultivos de *S. elongatus* en este trabajo, posiblemente influyeron en la incorporación del amonio por las células mantenidas en los cultivos.

En el trabajo de López-Ortega (2023) muestra que *S. elongatus* tiene mayores valores de pH en agua dulce respecto a lo evaluado con agua de mar. La especie de *S. elongatus* es de agua dulce de acuerdo con las bases de datos actualizadas (Guiry, 2020). La salinidad es un factor importante para el desarrollo óptimo de los cultivos de microalgas y cianobacterias. Sin embargo, las cianobacterias se han reportado como organismos halotolerantes o formas halofílicas. Pues muchas especies de agua dulce soportan salinidades más altas que las del agua de mar (Carr y Wyman, 1986). Se ha encontrado que varias especies marinas pueden sobrevivir en salinidades más bajas. Además, para un crecimiento adecuado de estos organismos, sería importante cubrir todas sus necesidades nutrimentales (Rippka et al., 1979). Es importante destacar que *S. elongatus* fue aislado de un canal de toma de agua de mar que abastecía cultivos de camarón en San Blás, Nayarit y esta especie puede crecer tanto en agua de mar como en agua dulce (Aguilar-May et al. 2007; Aguilar-May y Sánchez-Saavedra, 2009; Castro-Ceseña y Sánchez-Saavedra, 2016).

Diversos autores han indicado que se espera un crecimiento óptimo de cianobacterias en un medio que tenga valores de pH entre 7.4 a 8.0. Sin embargo, las cianobacterias son organismos con amplia tolerancia a diversas condiciones ambientales y la viabilidad de las células al ser mantenidas en pH de 6.4, muestra la versatilidad y adaptación de estos organismos a diferentes condiciones (Bano y Siddiqui, 2004).

Para optimizar el crecimiento de cultivos de microalgas se ha comprobado en varios trabajos, que es mejor estrategia disminuir la intensidad lumínica (antes de llegar a la sobresaturación) y en lugar de suministrar diferentes aportes químicos de nitrógeno en el medio de cultivo. También se menciona que se pueden combinar ambos factores (luz y nutrientes) para obtener un mejor resultado en el crecimiento (Thompson et al., 1989).

### Peso seco

El peso seco total de *S. elongatus* fue mayor con el aporte químico de nitratos en el medio de cultivo ( $309.500 \pm 9.838 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), respecto a lo obtenido con amonio ( $187.083 \pm 3.417 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). La tendencia antes descrita, es opuesta a lo ocurrido en el trabajo de Ruan y Giordano (2017) al mantener cultivos de *Synechococcus* sp. con dos aportes químicos de nitrógeno: amonio y nitrato, además en dos condiciones de estrés: deficiencia de nitrógeno (concentración deficiente=  $22 \mu\text{M}$  de nitrógeno, concentración control=  $550 \mu\text{M}$  de nitrógeno) y deficiencia de energía de la luz (irradiancia deficiente=  $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , irradiancia control=  $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Se encontró que en deficiencia de nitrógeno no hubo diferencias significativas en el peso debido a los aportes de nitrógeno (nitrato=  $1.240 \pm 0.130 \text{ pg célula}^{-1}$ , amonio=  $1.020 \pm 0.20 \text{ pg célula}^{-1}$ ). Cuando hubo deficiencia de energía de la luz, encontraron diferencias significativas en el peso debido a los aportes químicos de nitrógeno. El aporte de nitrógeno con el que se tuvo un mayor peso seco total fue con el amonio ( $2.950 \pm 0.21 \text{ pg célula}^{-1}$ ). Es importante destacar que en este estudio no se especifica la especie de *Synechococcus* utilizada.

Los resultados obtenidos con *S. elongatus* en este trabajo muestran que el mayor peso fue obtenido con nitratos como aporte químico de nitrógeno y en la fase estacionaria. Estos resultados son distintos a lo obtenido por Ruan y Giordano (2017) al mantener cultivos de *Synechococcus* sp. y posiblemente sean debidas a que en este estudio no se colocó deficiencia de nitrógeno antes de usar las dos formas químicas del nitrógeno (nitratos y amonio). Además, es importante resaltar que las especies tendrán un desempeño específico bajo ciertas condiciones a pesar de pertenecer al mismo género (Vishwanath et al., 2016).

#### Composición proximal y pigmentos

No hubo diferencias significativas en el contenido de proteína debido al aporte químico del nitrógeno en el medio para los cultivos de *S. elongatus*, únicamente se encontraron diferencias debidas a la fase de crecimiento. Se encontró una tendencia similar en el contenido de proteínas para *Synechococcus subsalsus* con un valor de  $53.700\% \pm 2.900$  de proteína en el cultivo mantenido con nitrato y con amonio obtuvo un valor de  $50.600\% \pm 2.700$  (Laurenço et al., 2002). Estos resultados representan la versatilidad y capacidad de adaptación que tienen las cianobacterias ante distintas condiciones de cultivo (Bano y Siddiqui, 2004).

En este trabajo se encontró para *S. elongatus* que hubo diferencias significativas en el contenido de carbohidratos debido al aporte químico del nitrógeno, sin embargo, no hubo diferencias por fases de crecimiento. En la fase estacionaria se encontró un mayor contenido de carbohidratos al usar nitrato ( $11.362\% \pm 1.256$ ) respecto a lo obtenido con

amonio ( $6.375\% \pm 1.069$ ). Una tendencia similar, se encontró para *S. elongatus* con mayores valores de Chl *a* ( $195.169 \pm 20.776 \mu\text{g m}^{-3}$ ) y carotenos ( $2.934 \pm 0.540 \mu\text{g m}^{-3}$ ) con el aporte químico de nitrato en el medio, respecto a los valores de Chl *a* ( $91.329 \pm 11.848 \mu\text{g m}^{-3}$ ) y carotenos ( $1.936 \pm 0.626 \mu\text{g m}^{-3}$ ) obtenidos al usar amonio. En el trabajo de Lourenço et al. (2002) encontraron que para *S. subsalsus* tuvo valores similares en el porcentaje de carbohidratos al mantenerlos cultivos con amonio ( $24.600\% \pm 2.600$ ) y de nitrato en el medio de cultivo ( $24.800 \pm 2.000$ ).

La clorofila representa el pigmento fotosintético más abundante en plantas verdes (Rabinowitch y Govindjee, 1965). En este trabajo se utilizó la Chl *a* como indicador para la cuantificación de la fotosíntesis, ya que la Chl *a* está involucrada en actividades fotosintéticas como captación de la luz solar y conversión de la energía absorbida en energía química que posteriormente podrá utilizar los procesos metabólicos por la célula. Mientras mayor sea el contenido de la Chl *a*, se espera más actividad fotosintética que dará los precursores para la síntesis de los azúcares que son formados a partir de carbohidratos (Björn et al., 2009).

En este trabajo realizado con *S. elongatus*, se plantea que el mayor contenido de Chl *a* esta relacionado con mayor cantidad de precursores de la fotosíntesis y en consecuencia también un aumento en el contenido de carbohidratos en los cultivos de *S. elongatus* al suministrar nitratos en el medio de cultivo y durante la fase de crecimiento estacionaria. Durante la fase de crecimiento estacionaria, las células ya no usan su energía para el crecimiento y síntesis de proteínas, por lo cual acumularán sustancias de reserva como carbohidratos.

En el trabajo de Ruan y Giordano (2017) al mantener cultivos de *Synechococcus* sp. no se obtuvieron diferencias en el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos al mantener los cultivos con irradiancia de  $200 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y suministrar en el medio de cultivo distintos aportes químicos de nitrógeno (amonio y nitratos). Solo se presentaron diferencias significativas en la composición proximal de las células cuando había una limitación de energía lumínica ( $100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y una concentración de  $550 \mu\text{M}$  de nitrógeno en cada tipo de aporte químico de nitrógeno. Es importante destacar que en el trabajo de Ruan y Giordano (2017) al mantener cultivos de *Synechococcus* sp. usaron un valor de irradiancia igual al usado en el presente trabajo con *S. elongatus*, sin embargo, estos autores antes indicados usaron una menor concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, ya que la concentración de nitrógeno que suministra el medio "f" de Guillard y Ryther (1962) para el amonio y los nitratos tienen una molaridad de  $17.660 \times 10^{-4} \text{ M}$  ( $1,766 \mu\text{M}$ ). Lo anterior, influyó en obtener diferencias entre los resultados obtenidos por Ruan y Giordano (2017) con *Synechococcus* sp. y los obtenidos en este estudio con *S. elongatus*.

Collos y Harrison (2014) indican que la concentración de amonio ideal para el grupo de cianobacterias es de  $3000 \mu\text{M}$  y que la concentración de  $13,000 \mu\text{M}$  se considera tóxica. Las concentraciones usadas para los aportes químicos de nitrógeno (amonio y urea) usadas en el medio de cultivo para *S. elongatus* en este trabajo se consideran que no son tóxicas.

Los valores de lípidos para *S. elongatus* no tuvieron diferencias significativas por efecto de los aportes químicos de nitrógeno y tampoco por efecto de la fase de crecimiento. Los altos valores de desviación estándar en el contenido de lípidos, son la causa de esta falta

de diferencias debido al problema de no separar adecuadamente la bifase de los lípidos. Sin embargo, los valores de lípidos obtenidos en este estudio son mayores a los evaluados por Sánchez-Saavedra y Paniagua-Chávez (2017) al mantener cultivos de *S. elongatus* en preservación por refrigeración y oscuridad a 4 °C durante 8 semanas.

## 5. Conclusiones

La especie de cianobacteria *Phormidium* sp. presentó una mayor producción de biomasa en peso seco total con el aporte químico de amonio en el medio de cultivo durante la fase de crecimiento estacionaria.

En los cultivos de *Phormidium* sp. hubo mayor contenido de proteínas y de clorofila a con el uso de amonio en el medio de cultivo en la fase de crecimiento estacionaria. Para *Phormidium* sp. el uso de amonio en el medio de cultivo favoreció la producción de proteínas, mientras que los nitratos incrementaron la síntesis de carbohidratos.

La tendencia general del contenido de lípidos fue de mayores valores en los cultivos de *Phormidium* sp. con nitratos en el medio y en la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, con amonio en la fase de crecimiento estacionaria se tuvo una tendencia de mayores valores en el contenido de lípidos.

El contenido de carotenos en *Phormidium* sp. no se vio afectado por efecto de los aportes químicos de nitrógeno en el medio y en ninguna de las dos fases de crecimiento evaluadas.

La cianobacteria *S. elongatus* presentó una mayor producción de biomasa en peso seco total con el aporte químico de nitrato en la fase de crecimiento estacionaria.

La producción de proteínas en los cultivos de *S. elongatus* no se vio afectada por el aporte químico de nitrógeno en el medio.

En los cultivos de *S. elongatus* la producción de carbohidratos y clorofila a fueron mayores con el tratamiento de nitratos en la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, con amonio la tendencia general del contenido lipídico en los cultivos de *S. elongatus* fue mayor en la fase de crecimiento estacionaria.

Para *S. elongatus* se obtuvo mayor contenido de carotenos con el aporte químico de nitrato durante la fase de crecimiento estacionaria.

## 6. Recomendaciones

En próximos estudios con el uso de amonio y nitratos como aporte químico de nitrógeno en el medio de cultivo para *Phormidium* sp. y *S. elongatus* es importante evaluar el perfil de aminoácidos y de ácidos grasos.

En futuros estudios se debería evaluar el valor nutricional de *Phormidium* sp. y *S. elongatus* al ser mantenidos amonio y nitratos como aporte químico en el medio de cultivo, para conocer el valor nutricional de estas dos especies de cianobacterias para distinto tipo de organismos.

Es importante realizar cultivos masivos en volúmenes de más de 20 l para *Phormidium* sp. y *S. elongatus* y evaluar la composición bioquímica de ambas especies y ver si los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en este estudio al usar 400 ml de medio de cultivo.

Se propone evaluar la composición bioquímica de *Phormidium* sp. y *S. elongatus* al mantener los cultivos con distinta composición espectral de la luz y con el uso de amonio y nitratos como aporte químico en el medio de cultivo.

Sería recomendable evaluar el potencial de compuestos antimicrobianos que puedan producir *Phormidium* sp. y *S. elongatus* al ser mantenidos en cultivo con el uso de amonio y nitratos como aporte químico en el medio de cultivo.

Para la cuantificación de lípidos por el método de Pande et al. (1963) y al usar la mezcla de cloroformo:metanol, se extraiga el sobrenadante únicamente cuando la bicapa se encuentre completamente clarificada para asegurar que, al momento de extraer el metanol, no se encuentren los lípidos en emulsión y se produzca una subestimación.

Se propone agregar urea como otro tratamiento de aporte químico orgánico de nitrógeno y adicional a los otros dos aportes químicos (nitratos y amonio) inorgánicos de nitrógeno en los medios de cultivo de *Phormidium* sp. y *S. elongatus*.

Sería útil medir la concentración de nitratos y amonio en el medio de cultivo para ver la utilización de estos nutrientes en los cultivos de *Phormidium* sp. y *S. elongatus*.

Además, evaluar las rutas metabólicas que involucra cada aporte químico de nitrógeno en las células de *Phormidium* sp. y *S. elongatus*.

## 7. Literatura citada

Andersen, R.A. (1996) *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic Press, San Diego, 29-64.

Antia, N., Berland, B., Bonin, D., y Maestrini, S. (1975) Comparative evaluation of certain organic and inorganic sources of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom*, 55 (3), 519-539, <https://doi.org/10.1017/S0025315400017239>

Aguilar-May, B., Sánchez-Saavedra, M.P., Lizardi, J., y Voltolina, D. (2007) Growth of marine *Synechococcus* sp. immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH. *Journal of Applied Phycology*, 19 (2), 181-18.

Aguilar-May, B. y Sánchez-Saavedra, M. P. (2009) Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* *Journal of Applied Phycology*, 21, 353-360.

Arredondo-Vega, B. O., Cordero-Esquivel, B., Votolinia, D. (2017) *Métodos y herramientas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Segunda edición. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CiBNOR), 23-26.

Bag, P. (2021) Light harvesting in fluctuating environments: Evolution and function of antenna proteins across photosynthetic lineage. *Plants*, 10 (6), <https://doi.org/10.3390/plants10061184>

Bano, A., y Siddiqui, P., (2004) Characterization of five cyanobacterial species with respect to their requirement for pH and salinity. *Pakistan Journal of Botany*, 36 (1), 133-143.

Bergman, B., Gallon, J. R., Rai, A. N., Stal, L. J. (1997). N<sub>2</sub> fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 19 (2), 139-185.

Björn, L., Papageorgiou, G., Blankenship, R., y Govindjee. (2009) A viewpoint: Why chlorophyll a?. *Photosynthesis Research*, 99, 85-98. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9395-x>

Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*, 37 (8), 911-917, doi:10.1139/o59-099.

Blomqvist, P., Pettersson, A. y Hyenstrand, P. (1994) Ammonium-nitrogen: A key of non-nitrogen- fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Archiv für Hydrobiologie*, 132 (2), 141-164

Bold, H. C., Wynne M. J. (1985) *An introduction to Algae. Structure and Reproduction*, 2<sup>nd</sup> ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ

Braga, V., Mastrantonio, D., Vieira, J., y Greque, M. (2018) Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. *Bioresource Technology*, 269, 221-226.

Cai, T., Park, Y., Li, Y. (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects, *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 19, 360–369, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>.

Campa-Ávila, M. A. (2002) Evaluación del efecto en el valor nutritivo del rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con una microalga y una cianobacteria. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 97 pp.

Carr, N., y Wyman, M.. (1986) Cyanobacteria: their biology in relation to the oceanic picoplankton. En: Plat, T., y William, K., (1986): *Photosynthetic picoplankton*. (Ed.): W.K.W. Li. *Canadian bulletins of fisheries and aquatic sciences*, 214, 159-204.

Castro-Ceseña, A.B. y Sánchez-Saavedra, M.P. (2016) Effect of glycerol and PEGMA coating on efficiency of cell holding in alginate immobilized *Synechococcus elongatus*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 63-71.

Clemente, A., Wilson, A., Oliveira, S., Menezes, I., Gois, A., y Capelo-Nieto, J. (2020) The role of hydraulic conditions of coagulation and flocculation on the damage of cyanobacteria. *Science of the Total Environment*, 740 (20), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139737>

Collos Y., y Harrison P. (2014) Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Marine Pollution Bulletin*, 80 (1-2), 8–23, doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.006.

Dai, G. Z., Shang, J. N., y Qiu, B. (2012) Ammonia may play an important role in the succession of cyanobacteria blooms and the distribution of common algal species in shallow freshwater lakes. *Global Change Biology*, 18, 1571-1581.

Dortch, Q., Clayton, J., Thoresen, S., y Ahmed, S. (1984) Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Marine Biology*, 8, 237-250.

Drath, M., Kloft, N., Batschauer, A., Marin, K., Novak., y Forchhammer, K. (2008) Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Physiology*, 147 (1), 206-215, <https://doi.org/10.1104/pp.108.117218>

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350-356, doi:10.1021/ac60111a017

Ellis, E., Beusen, A., Goldewijk, K. (2020) Anthropogenic Biomes: 10,000 BCE to 2015 CE. *Land*, 9(5), 129.

Errat, K., Creed, I., Trick, C., (2020) Differential drawdown of ammonium, nitrate, and urea by freshwater chlorophytes and cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 56 (2), 458-468. doi: 10.1111/jpy.12960-19-100

Esteves-Ferreira, A., Inaba, M., Fort, A., Araújo, W., y Sulpice, R. (2018) Nitrogen metabolism in cyanobacteria: metabolic and molecular control, growth consequences and biotechnological applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 44 (5), 541–560, doi:10.1080/1040841x.2018.1446902

Flores, E., Herrero A. (2005) Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 33, 164–167.

Flynn, K., Fasham, M., y Hipkin, C. (1997) Modelling the interactions between ammonium and nitrate uptake in marine phytoplankton. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 352, 1625–1645.

Fogg, G., y Thake, B. (1987) *Algal Culture and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, London

Fry, I., y Packer, L. (1990) *Cyanobacteria in CELSS: Growth strategies for nutritional variation and nitrogen cycling*. NASA. Ames Research Center, Controlled Ecological Life Support Systems: CELSS '89 Workshop

Glibert, P., Wilkerson, F., Dugdale, R., Raven, J., Dupont, C., Leavitt, P., Parker, A., Burkholder, J., y Kana, T. (2016) Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. *Limnology and Oceanography*, 61 (1), 165–197.

Guillard, R., y Ryther, J. (1962) Studies on marine planktonic diatoms I. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239, doi: 10.1139/m62-029.

Guiry, G. (2020) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>

Hill, S. L., E. J. Murphy, K. Reid, P. N. Trathan, Constable, A. J. (2006) Modelling Southern Ocean ecosystems: krill, the food-web, and the impacts of harvesting. *Biological Reviews*, 81, 581–608.

Jaiswal, D., Sengupta, A., Sengupta, S., Madhu, S., Pakrasi, H., Wangikar, P. (2020) A Novel cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11802 has distinct genomic and metabolomic characteristics compared to its neighbor PCC 11801. Scientific Reports, 10 (191), <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57051-0>.

Jeffrey, S. W., Humphrey, G. F. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen, 167 (2), [doi: 10.1016/s0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(17)30778-3)

Jiménez-Valera, S. (2016) Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

Karakas K., Eryalçın, K., Ergönül, M., Atici, T., y Atasagun, S. (2023) The evaluation of the growth performance of a cyanobacterium *Phormidium lucidum* (Kützing ex Gomont, 1982) grown under different environmental conditions and its use as a dietary source for *Daphnia Magna* (Straus, 1820). Communications faculty of sciences university of Ankara series C: biology, 32 (1), 70-86, <https://doi.org/10.53447/communc.1241869>

Khazi, M., Demirel, Z., y Dalay, M. (2018) Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. Journal of Applied Phycology, 30, 1513–1523, <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1398-1>

Kolber, Z., Zehr, J., Falkowski, P. (1988) Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. Plant Physiology, 88, 923–929.

Levasseur, M., Thompson, P. y Harrison, P. (1993) Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. Journal of Applied Phycology, 29, 587–95. doi: 10.1111/j.0022-3646.1993.00587.x

López-Ortega, G. (2023) Evaluación del crecimiento y composición bioquímica de cianobacterias como alternativas nutricionales para humanos (tesis de maestría), Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)

Lourenço, S., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K., y Aidar, E. (2002) Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evolution of aquaculture. Phycologia, 41 (2), 158-168, doi: [10.2216/i0031-8884-41-2-158.1](https://doi.org/10.2216/i0031-8884-41-2-158.1)

Lowry, O. H., Rosebrugh, H. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193.

Lu, S., Wang, J., Ma, Q., Yang, J., Li, X., y Yuan, Y. (2013) Phospholipid Metabolism in an Industry Microalga *Chlorella sorokiniana*: The Impact of Inoculum Sizes. PLoS ONE 8(8). [doi:10.1371/journal.pone.0070827](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070827)

Malara, G., Charra, R. (1972) Dosages des glucides particuliers de phytoplankton selon la méthode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail

Moore, L., Post, A., Rocap, G., y Chisholm, S. (2002) Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. Limnology and oceanography, 47(4), 989–996, <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.4.0989>

Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., Florencio, F. J. (2005) Ammonium assimilation in cyanobacteria. Photosynthesis Research, 83(2), 135–150, [doi:10.1007/s11120-004-2082-7](https://doi.org/10.1007/s11120-004-2082-7)

Naselli-Flores, L., Padišák, J. (2023) Ecosystem services provided by marine and freshwater phytoplankton. Hydrobiologia, 850, 2691–2706, <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04795-y>

Ochoa-De-Alda, J., Tapia, M., Franck, F., Llama, M., Serra, J. (1996) Changes in nitrogen source modify distribution of excitation energy in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. Physiologia Plantarum, 97, 69-78.

Pande, S., Parvin, R., y Venkitasubramanian, T. (1963) Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. Analytical Biochemistry, 6 (5), 415-423, [doi:10.1016/0003-2697\(63\)90094-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(63)90094-0)

Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M. (1984) A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford, <https://doi.org/10.1016/C2009-0-07774-5>

Polis, G., y Hurd, S. (1996) Linking marine and terrestrial food webs: allochthonous input from the oceans supports high secondary productivity on small islands and coastal land communities. The American Naturalist, 147, 396–423.

Rabinowitch, E., y Govindjee (1965) The role of chlorophyll in photosynthesis. Scientific American, 213 (1), 74-83.

Raven, J., Wollenweber, B., Handley, L. (1992) A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. New Phytologist, 121 (1), 19–32, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01088.x>

Reynolds, C. S. (2006) The ecology of phytoplankton. Centre for Ecology and Hydrology, Lancaster. Cambridge University Press, [doi: https://doi.org/10.1017/CBO9780511542145](https://doi.org/10.1017/CBO9780511542145)

Rippka, R. (1988) Isolation, identification and culturing of cyanobacteria. Methods Enzymology, 167, 3-27, doi: [10.1016/0076-6879\(88\)67004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67004-2)

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman M., y Stainer, R. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61, <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>

Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., y Rashid, N. (2018) Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394-404, [doi:10.1016/j.rser.2018.04.034](https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034)

Ruan, Z., y Giordano, M. (2017) The use of  $\text{NH}_4^+$  rather than  $\text{NO}_3^-$  affects cell stoichiometry, C allocation, photosynthesis and growth in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. UTEX LB 2380, only when energy is limiting. *Plant, Cell & Environment*, 40, 227-236, [doi:10.1111/pce.12858](https://doi.org/10.1111/pce.12858)

Rückert, G., y Giani, A. (2004) Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). *Revista Brasileira de Botânica*, 27 (2), [doi:10.1590/s0100-84042004000200011](https://doi.org/10.1590/s0100-84042004000200011)

Sánchez-Saavedra, M.P. y Paniagua-Chávez, C. (2017) Potential of refrigerated marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* used as food for *Artemia* sp. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45 (5), 937-947.

Sánchez-Saavedra, M., Castro-Ochoa, F., Nava-Ruiz, V., Ruiz-Güereca, D., Villagómez-Aranda, A., Siqueiros-Vargas, F., Molina-Cárdenas, C. (2017) Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology*, 30, 783-792, [doi:10.1007/s10811-017-1284-2](https://doi.org/10.1007/s10811-017-1284-2)

Sanz, A., Moreno-Vivián, C., Maldonado, J., y González-Fontes, A. (1995) Effect of a constant supply of different nitrogen sources on protein and carbohydrate content and enzyme activities on *Anabaena variabilis* cells. *Physiologia Plantarum*, 95, 39-44.

Schirrmeister, B., de Vos J., Antonelli A., Bagheri H. (2013) Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the great oxidation event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 1791–1796.

Schluter, D. (1996) Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution*, 50, 1766–1774

Shilo, M. (1989). The unique characteristics of benthic cyanobacteria. En: Cohen, Y., y Rosenberg, E. (ed.) *Microbial mat: physiological ecology of benthic microbial communities*. American Society for Microbiology. Washington, DC.

Shopf, J. (2002) *The ecology of cyanobacteria*. Springer, Dordrecht, 13-35, [https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7\\_2](https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_2)

Sivonen, K. (2009) Cyanobacterial toxins. En: Schaechter, M. (Ed.). Encyclopedia of Microbiology. Elsevier Inc.

Smith, V. (2003) Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. Environmental Science and Pollution Research, 10 (2), 126-139.

Sorokin, C. (1973) Dry weight, packed cell volume and optical density. En: Stein, J. (Ed.). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press

Syrett, P. (1981) Nitrogen metabolism of microalgae. En: T. Platt (Ed.). Physiological bases of phytoplankton ecology. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences, 210, 182-210.

Tapia, M., Ochoa de Alda, J., Llama, M., y Serra J. (1996) Changes in intracellular amino acids and organic acids induced by nitrogen starvation and nitrate or ammonium resupply in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*, Planta, 198 (4), 526-531, [doi:10.1007/BF00262638](https://doi.org/10.1007/BF00262638)

Teneva, I., Dzhabazov, B., Koleva L., Mladenov, y Schirmer, K. (2005) Toxic potential of five freshwater *Phormidium* species (Cyanoprokaryota). Toxicon, 45 (6), 711-725.

Thompson, P., Levasseur, M., y Harrison, P. (1989) Light-limited growth on ammonium vs. nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton? Limnology and Oceanography, 34 (6), 1014-1024.

Valladares A., Montesinos M. L., Herrero A., Flores E. (2002) An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. Molecular Microbiology, 43, 703–715.

Vishwanath, S., y Rajashekhar, M. (2016) Effect of pH, salinity and temperature on the growth of six species of cyanobacteria isolated from Arabian seacoast of Karnataka. International Journal of Biosciences and Technology; Coimbatore, 9 (1), 1-6.

Whitton, B.A., Potts, M. (2000) The ecology of cyanobacteria, the diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, 1-11.

Whyte, J. (1987) Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture, 60, 231-241. [doi:10.1016/0044-8486\(87\)90290-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90290-0)

Wilkerson, F., Dugdale, R., Hogue, V., y Marchi, A. (2006) Phytoplankton blooms and nitrogen productivity in the San Francisco Bay. Estuaries and Coasts, 29 (3), 401–416, [doi:10.1007/BF02784989](https://doi.org/10.1007/BF02784989)