

PRODUCCION DE PIGMENTOS Y PROTEINAS DE LA CIANOBACTERIA
ANABAENA PCC 7120 EN RELACION A LA CONCENTRACION DE
 NITROGENO E IRRADIANCIA

*PIGMENT AND PROTEIN PRODUCTION OF THE CYANOBACTERIUM
 ANABAENA PCC 7120 IN RELATION TO NITROGEN CONCENTRATION
 AND IRRADIANCE*

César Loreto, Néstor Rosales, José Bermúdez & Ever Morales*

Departamento de Biología, La Universidad Del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Venezuela

*Autor de correspondencia: E-mail: everm@iamnet.com

RESUMEN

Algunas cianobacterias del género *Anabaena* son productoras de pigmentos de interés comercial. Este artículo documenta el efecto de la concentración de nutrientes en función del NaNO_3 a 0, 1, 2, 4 y 8 mM y de la irradiancia a 78, 156 y 238 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sobre el contenido de proteínas y pigmentos de *Anabaena* PCC 7120 en cultivos discontinuos. El crecimiento de la cianobacteria fue poco afectado por la concentración de nitrato, sin diferencia significativa entre 1 y 8 mM ($p < 0,05$). Sin embargo, a 8 mM se alcanzaron los valores más elevados de ficocianina ($174 \pm 2 \mu\text{g ml}^{-1}$), clorofila *a* ($17,4 \pm 1,2 \mu\text{g ml}^{-1}$), proteínas ($563 \pm 2 \mu\text{g ml}^{-1}$) y carotenoides ($4,5 \pm 0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$). Aunque las mayores densidades celulares ($117 (\pm 11) \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$) se produjeron a una irradiancia de 78 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, los valores más elevados de proteína y pigmentos se obtuvieron a 156 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El número de heterocistos por tricoma se redujo con el aumento de la concentración de nitrato. La producción de biomasa de *Anabaena* PCC 7120 enriquecida con ficocianina, clorofila *a* y proteínas fue estimulada con suficiencia en nutrientes y una irradiancia entre 78 y 156 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

PALABRAS CLAVES: Clorofila *a*, cianobacteria, ficocianina, nitrato, nutrientes.

ABSTRACT

Cyanobacteria of the genus *Anabaena* produce pigments of commercial value. The present work reports the effect of nitrogen nutrient concentration (0, 1, 2, 4, and 8 mM NaNO_3) and irradiance (78, 156 and 238 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on growth, pigment and protein content in *Anabaena* PCC 7120 in batch cultures. Growth of the cyanobacterium was little affected by nitrate concentration, with no significant differences between 1 and 8 mM ($p < 0,05$). However, a concentration of 8 mM gave rise to the highest levels of phycocyanin ($174 \pm 2 \mu\text{g ml}^{-1}$), chlorophyll *a* ($17.4 \pm 1.2 \mu\text{g ml}^{-1}$), protein ($563 \pm 2 \mu\text{g ml}^{-1}$) and carotenoids ($4.5 \pm 0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$). Although cell densities were highest ($117 (\pm 11) \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$) at 78 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, maximum levels of protein and pigments were achieved at 156 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The number of heterocysts per trichome decreased with increasing nutrient concentration. Biomass production of *Anabaena* PCC 7120 enriched with phycocyanin, chlorophyll *a*, and protein was enhanced in a saturating-nutrient medium and a irradiance between 78 and 156 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

KEYWORDS: Chlorophyll *a*, cyanobacteria, nitrate, nutrients, phycocyanin.

INTRODUCCION

Diversas cepas de cianobacterias presentan la capacidad de producir compuestos de interés co-

mercial de acuerdo a sus características fisiológicas y de las condiciones de cultivo (Vonshak 1987, Vieira *et al.* 2000, Hernández *et al.* 1998, Mundt *et al.* 2001). Para mejorar la eficiencia en cuanto a la

producción de pigmentos, proteínas o de metabolitos con actividad biológica, es necesario optimizar su crecimiento en función de la temperatura, irradiancia, salinidad, agitación, concentración y naturaleza de nutrientes en condiciones de laboratorio (Hoffmann 1988).

Entre estas cianobacterias se destaca el género *Anabaena*, para el cual se ha descrito su utilidad como biofertilizante (Vekataraman 1986), fuente de pigmentos (Morales *et al.* 2002) y de exopolisacáridos (Moreno *et al.* 1998). Asimismo, la cepa *Anabaena* PCC 7120 ha sido seleccionada en numerosos estudios sobre biología molecular de ficobilisomas, purificación de ARN polimerasa, diferenciación de heterocistos (Buikema & Haselkorn 1991) e inducción de proteínas (Giraldez-Ruiz *et al.* 1997). No obstante, la elevada estabilidad de su biomasa, la fácil extracción de sus pigmentos y exopolisacáridos en cultivos discontinuos y semicontinuos, favorecen su selección para estudios inherentes a la optimización de condiciones ambientales para la producción de pigmentos, proteínas y de otros compuestos de importancia comercial (Morales *et al.* 2002). Tal es el caso del uso de baja intensidad luminosa y de limitación de nitrógeno en cultivos discontinuos de *Anabaena* PCC 7120 para la inducción de la síntesis de sulfolípidos con actividad antiviral (Archer *et al.* 1997).

En el presente trabajo se reporta el efecto de la concentración de nutrientes y de la irradiancia sobre el crecimiento y el contenido de clorofila *a*, ficocianina, carotenoides y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en cultivos discontinuos, con la finalidad de determinar la concentración de nutrientes y la irradiancia capaz de estimular la producción de estos compuestos.

MATERIALES Y METODOS

MICROORGANISMO

La cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 fue obtenida de la colección de cianobacterias del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, España; y es mantenida en la colección de microalgas del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizó agua potable estéril y enriquecida con nutrientes inorgánicos ALGAL (Fábregas *et al.* 1984) a una concentración equivalente a 8 mM de NaNO_3 . Los medios de cultivos se inocularon con células en fase exponencial a una absorbancia a 750 nm (DO_{750}) de 0,08 y correspondiente a una densidad celular de 5×10^6 cel ml^{-1} . Todos los experimentos se realizaron por triplicado, a un volumen de 200 ml en frascos de vidrio autoclavables y mantenidos en aireación constante a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, con iluminación unilateral a una intensidad luminosa de $117 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperíodo 12:12h.

INFLUENCIA DEL NITRATO

Se realizó un experimento a 0, 1, 2, 4 y 8 mM de NaNO_3 . Se utilizó medio de cultivo ALGAL, para las concentraciones equivalentes de nitrato de sodio entre 1 y 8 mM. Mientras que los otros nutrientes fueron incrementados proporcionalmente (Fábregas *et al.* 1984).

En los cultivos con ausencia de nitrato sólo se utilizó la mezcla de oligoelementos y fosfato. Para este ensayo se lavaron las células del cultivo seleccionado como inóculo mediante centrifugado a 16.000 g por 15 minutos para eliminar el nitrato remanente en el medio. Los cultivos se realizaron a una intensidad luminosa de $117 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a un pH inicial de 7,8.

INFLUENCIA DE LA IRRADIANCIA

El crecimiento de la cianobacteria fue evaluado a 78, 156 y 238 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para ello se utilizó un luxímetro Lutron Lx-101 se convirtieron las unidades de Lux en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ginzburg 1987).

ANÁLISIS DE BIOMASA

El crecimiento de la cianobacteria fue seguido por DO_{750} y mediante recuento celular con una cámara de Neübauer, previa fragmentación de los filamentos mediante homogeneización. El porcentaje de heterocistos se determinó en relación al número total de células presentes en los filamentos (Pattnaik & Singh 1978).

El contenido de pigmentos se realizó mediante métodos espectrofotométricos. A partir del extracto metanólico de la biomasa fresca se determinó la clorofila *a* (Marker 1972) y los carotenoides (Britton 1985). La ficocianina se obtuvo según el

método de choque osmótico (Wyman & Fay 1986) y mediante la fórmula de Bennet & Bogorad (1973).

Las proteínas totales se determinaron según el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951) modificado por Herbert *et al.* (1971), usando como estándar seroalbúmina bovina (BSA). El contenido de pigmentos y proteínas por célula y por volumen de cultivo fue expresado en pg cel⁻¹ y en µg ml⁻¹ respectivamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los valores de densidad celular, pigmentos y proteínas en fase estacionaria corresponden a promedios con sus desviaciones estandar respectivas (promedio ± d.e.) y todos estos valores comparados mediante análisis de varianza de una vía (StaMost for Windows versión 3.0). Para todas las comparaciones de las medias se realizó la prueba de rangos múltiples de Scheffé y fue tomada una probabilidad de (< 0,05) como significante.

RESULTADOS

INFLUENCIA DEL NÍTRATO

La cianobacteria creció con o sin nitrato y los máximos valores de absorbancia al final de la fase exponencial fueron obtenidos a 8 mM de NaNO₃ con 0,62 ± 0,02 (Fig. 1, Tabla I). Sin embargo, en fase

estacionaria no hubo diferencias significativas entre 1 y 8 mM (p< 0,05). Aunque el menor crecimiento se produjo en los cultivos sin nitrato, con 0,29 ± 0,02 de absorbancia, se obtuvo una proliferación significativa de heterocistos. Al inicio de la fase exponencial, entre los 3 y 6 días, se encontró el mayor porcentaje de heterocistos en los cultivos sin nitrógeno con 4,5 y 1,2 % respectivamente. Mientras que, se obtuvo una reducción de los mismos con la concentración de nitrato, hasta alcanzar porcentajes mínimos del 0,1 y 0,2% en cultivos con 8 mM NaNO₃ (Fig. 2).

El contenido de ficocianina reveló diferencias significativas (p< 0,05) entre todos los tratamientos, excepto entre 2 y 4 mM. El valor más elevado se produjo a 8 mM, con 174 ± 16 µg ml⁻¹ el cual supera en 8,7 y 2,1 veces a los obtenidos a 0 y 1 mM de nitrato, respectivamente (Tabla I).

La clorofila *a* también es acumulada con la concentración del nitrato con diferencias significativas (p < 0,05) y con la edad del cultivo. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los tratamientos 2 y 4 mM. En los cultivos crecidos sin nitrato, el contenido fue de 3,9 ± 0,9 µg ml⁻¹. Mientras que a 2 y 8 mM se incrementó a 13,9 ± 1,1 y 17,4 ± 1,2 µg ml⁻¹ respectivamente (Tabla I).

Los carotenoides presentaron una tendencia a la acumulación hacia el final de la fase estacionaria. Aunque entre 2 y 4 mM no hubo diferencia significativa (p> 0,05), los restantes tratamientos resultaron significativamente diferentes (p<0,05) (Tabla I).

TABLA I. Absorbancia (DO₇₅₀), contenido de pigmentos y proteínas (µg ml⁻¹) de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en función de la concentración de nutrientes (mM NaNO₃).

	[NaNO ₃] (mM)				
	0	1	2	4	8
DO ₇₅₀	0,29 ± 0,02	0,53 ± 0,05	0,59 ± 0,04	0,58 ± 0,05	0,62 ± 0,02
Ficocianina	20 ± 7	82 ± 14	122 ± 11	132 ± 17	174 ± 16
Clorofila <i>a</i>	3,9 ± 0,9	10,4 ± 0,6	13,9 ± 1,1	14,7 ± 1,2	17,4 ± 1,2
Carotenoides	1,2 ± 0,3	3,0 ± 0,1	3,6 ± 0,3	3,9 ± 0,5	4,5 ± 0,3
Proteínas	211 ± 23	409 ± 9	506 ± 73	532 ± 9	563 ± 2

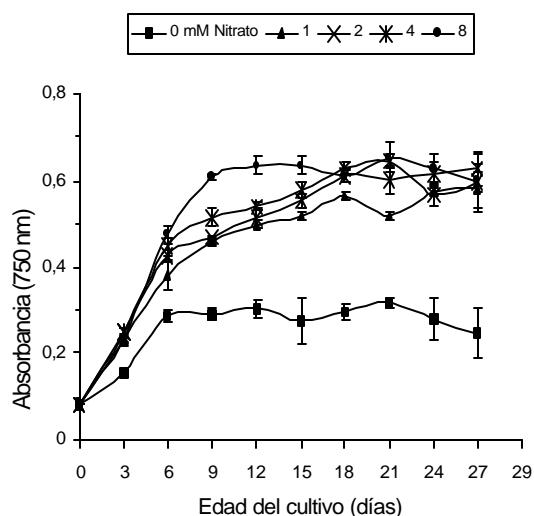


FIGURA 1. Crecimiento (DO_{750}) de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en función de la concentración de nutrientes (mM de $NaNO_3$).

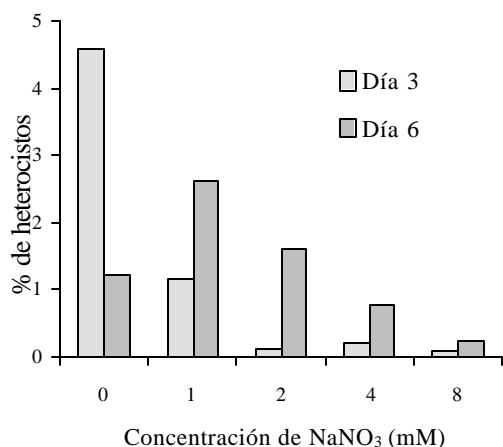


FIGURA 2. Porcentaje de heterocistos en relación al total de células en los tricomas de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función de la concentración de nutrientes (mM $NaNO_3$).

El contenido de proteínas también se incrementó con la concentración del nitrato. En los cultivos a 0 y 1 mM fue de 211 ± 23 y $409 \pm 9 \mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente; hasta alcanzar el máximo valor de $563 \pm 2 \mu\text{g ml}^{-1}$ a 8 mM con diferencia significativa ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que el contenido de ficocianina, clorofila *a*, carotenoides y de proteínas es incrementado cuando la cianobacteria es cultivada a la concentración de nutrientes más elevada y equivalente a 8 mM de $NaNO_3$ (Tabla I). A pesar de que la producción de biomasa sea similar entre 1 y 8 mM (Fig. 1).

INFLUENCIA DE LA IRRADIANCIA

La densidad celular más elevada de $117 (\pm 11) \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$ se alcanzó a $78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mientras que a $238 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ se redujo a $82 (\pm 51) \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$ (Tabla II). Sin embargo, el análisis estadístico no detectó diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las tres intensidades luminosas evaluadas.

En los cultivos mantenidos a 78 y $156 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ se produjeron los valores más elevados de clorofila *a*, ficocianina y carotenoides por volumen de cultivo y sin diferencia significativa ($p > 0,05$). Las proteínas se acumularon más a $156 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con un valor de $677 \pm 28 \mu\text{g ml}^{-1}$, con diferencia significativa ($p < 0,05$). En cambio, a $238 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ se detectó disminución de los pigmentos y proteínas (Tabla II).

DISCUSION

La capacidad de crecimiento de *Anabaena* PCC 7120 a las diferentes concentraciones de nitrógeno demostró su versatilidad fisiológica para adaptarse, incluso a medios limitantes o carentes de nitrógeno (Fig. 1). Es decir, su crecimiento a bajas concentraciones de nitrato es compensado por su propiedad fijadora de nitrógeno. Esto se evidencia con el incremento de heterocistos a estas condiciones de cultivo (Fig. 2), lo cual ha sido reportado en otras cianobacterias filamentosas (Tandeau de Marsac & Houmard 1993). En *Anabaena cylindrica* el porcentaje de heterocistos puede ser incrementado hasta un 12% cuando es cultivada sólo con nitrógeno atmosférico (Stacey *et al.* 1977). Mientras que un aumento de la concentración de fuentes nitrogenadas en el medio de cultivo induce un descenso de heterocistos (Mishra 1997).

En cuanto a la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, en *Anabaena* PCC 7120 parece ser más eficiente el mecanismo de producción

TABLA II. Densidad celular ($\times 10^6$ cel ml^{-1}), contenido de pigmentos y proteínas ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en función de la irradiancia.

	Irradiancia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
	78	156	238
Densidad celular	117 \pm 11	97 \pm 8	84 \pm 21
Clorofila <i>a</i>	14,6 \pm 1,7	15,7 \pm 1,2	12,6 \pm 3,2
Ficocianina	122 \pm 23	139 \pm 20	112 \pm 29
Carotenoides	3,4 \pm 0,3	3,8 \pm 0,5	3 \pm 0,7
Proteínas	576 \pm 39	677 \pm 28	558 \pm 25

de biomasa a concentraciones limitantes entre 1 y 4 mM de nitrato, debido a que logra alcanzar valores similares de crecimiento respecto a 8 mM. Aunque en otras cianobacterias como *Oscillatoria agardhii*, *O. redekei* (Foy 1993), *O. rubescens*, *Spirulina platensis* (Becker 1994), *Anacystis nidulans* (Lau et al. 1997) y en *Synechococcus* sp. IO9201 (Betancourt 1997), se ha descrito una disminución drástica de su crecimiento a 2mM de nitrato. Posiblemente, la capacidad fijadora de nitrógeno que presenta *Anabaena* sea un factor importante para incrementar su eficiencia en cuanto a su crecimiento a bajos niveles de nitrato, en comparación a las otras cianobacterias carentes de heterocistos.

La concentración de nitrato también influyó en el contenido de pigmentos y de proteínas. De tal manera, que para alcanzar una mayor producción de ficocianina, clorofila *a*, carotenoides y proteínas es necesario utilizar concentraciones de nutrientes equivalente al menos a 8 mM de NaNO_3 (Tabla I). En cambio, cuando la cianobacteria se cultivó entre 0 y 1 mM se produjeron los valores más bajos de estos compuestos. En este sentido, la baja producción de ficocianina y de proteínas totales obedece a la deficiencia de nitrógeno y al proceso de degradación, a fin de movilizar el nitrógeno hacia rutas metabólicas inherentes al crecimiento y síntesis de otras macromoléculas (Lewitus & Caron 1990).

El incremento de ficocianina, clorofila *a* y de proteínas con la concentración de nitrato, amonio y glutamina también ha sido descrito en estudios previos con *Anabaena* PCC 7120 (Mishra 1997). Sin embargo, cuando se comparó el contenido de estos compuestos con los obtenidos en nuestro estudio,

se encontró que el contenido de ficocianina, clorofila *a* y de proteínas fue de 63, 2,6 y 4,0 veces superiores a los alcanzados por Mishra (1997).

Por otra parte, el rango de irradiancia utilizado en este estudio parece influir poco en el crecimiento de la cianobacteria, puesto que entre 78 y 238 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no se logró un incremento significativo ($p > 0,05$) del mismo (Tabla II). No obstante, cianobacterias de un mismo género pueden presentar diferente respuesta de crecimiento al incremento de la irradiancia (Wilmutte 1988). Por ejemplo, el crecimiento de una especie de *Anabaena* aumentó a irradiancias entre 7 y 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con una estabilización del crecimiento de hasta 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Martín-Trillo 1995). Asimismo, diversas cianobacterias pueden tolerar desde la luz solar directa hasta muy bajas irradiancias entre 1 y 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tandeau de Marsac & Houmard 1993).

En el presente estudio también se demostró que los cultivos de cianobacterias sometidos a bajas e intermedias irradiancias producen más clorofila y ficocianina que los crecidos a elevadas intensidades luminosas (Tabla II). En este sentido, Raven (1984) ha sugerido que el mayor contenido de clorofila puede ser encontrado a niveles intermedios de luz, en los que los beneficios de la inversión en nueva clorofila compensan el costo de su síntesis. Sin embargo, el contenido de carotenoides no varió con la irradiancia; lo cual significa que en esta cepa de cianobacteria no se estimula la síntesis de carotenoides con el incremento de la irradiancia. Posiblemente, esta cianobacteria activa otro proceso de aclimatación o de control para evitar la fotooxidación de los pigmentos a elevadas intensi-

dades luminosas; tal como se ha descrito en las cianobacterias *Synechococcus* PCC 7002, *Synechococcus* PCC 6301 y *Microcystis aeruginosa*; en las cuales no hay variación en los contenidos de carotenoides (Tandeau de Marsac & Houmard 1993). Asimismo, en *Plectonema boryanum* UTEX 485 se ha encontrado que la concentración de clorofila *a* y β -caroteno disminuyen con el incremento de la irradiancia de 150 a 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Miskiewicz *et al.* 2000).

En cambio, la irradiancia sí ejerció influencia en el contenido de proteínas. El hecho de producirse el mayor contenido a 156 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, podría indicar una condición óptima de irradiancia para la síntesis de proteínas. Es importante destacar que la incorporación del nitrato en microalgas y cianobacterias es dependiente de la fotofosforilación y de la irradiancia (Tischner & Lorenzen 1979). De tal manera que, la velocidad de transporte de este nutriente pueda estar influida a una determinada intensidad luminosa.

En *Spirulina* y *Oscillatoria* spp. se ha descrito que la incorporación relativa de proteínas a las células es inversamente proporcional al incremento de la intensidad luminosa. Posiblemente, a altas irradiancias se induce una elevada tasa de asimilación de carbono total, de tal manera que la incorporación de carbono a la fracción proteica es menor con respecto a la obtenida en la fracción de polisacáridos bajo estas condiciones (Van Rijn & Shilo 1986).

Todos estos resultados indican que *Anabaena* PCC 7120 es capaz de responder satisfactoriamente a cambios de irradiancia y de concentración de nutrientes en cultivos discontinuos. Es decir, su crecimiento no es inhibido, aun a bajas concentraciones de nitrógeno, ni a irradiancias de 238 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por lo tanto, se demuestra que la producción de clorofila *a*, ficocianina y de proteínas es estimulada a elevadas concentraciones de nutrientes y a una irradiancia entre 78 y 156 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esta capacidad de aclimatación a cambios ambientales demuestra también su versatilidad metabólica. Así como también la elevada estabilidad de los cultivos en fase estacionaria constituye otro factor favorable para la producción de biomasa enriquecida con pigmentos de interés económico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a FONACIT - Venezuela por el apoyo financiero a través del proyecto S1-2000000786.

BIBLIOGRAFIA

- ARCHER, S., K. McDONALD & A. JACKMAN. 1997. Effect of irradiance on the production of sulfolipids from *Anabaena* 7120 in a fed-batch photobioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 67: 15-28.
- BECKER, E. 1994. *Microalgae, Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge. 301 pp.
- BENNET, A. & L. BOGORAD. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology* 58: 419-435.
- BETANCOURT, L. 1997. Producción, purificación y caracterización de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 aislada en aguas de Cuba. Tesis Doctoral. Universidade da Coruña. La Coruña, España.
- BRITTON, G. 1985. General carotenoids methods. *Methods in Enzymology* 111: 113-158.
- BUIKEMA W. & R. HASELKORN. 1991. Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* PCC7120. *Gene Development* 5: 321-330.
- FÁBREGAS, J., J. ABALDE, C. HERRERO, B. CABEZAS & M. VEIGA. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrients concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
- FOY, R. 1993. The phycocyanin to chlorophyll *a* ratio and cell components as indicators of nutrient limitation in two planktonic cyanobacteria subjected to low light exposures. *Journal of Plankton Research* 15: 1263-1276.
- GINZBURG, M. 1987. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Advances on Botanical Research* 14: 93-183.
- GIRALDEZ-RUIZ, N., P. MATEO, I. BONILLA & F. FERNÁNDEZ-PIÑA. 1997. The relationship between intracellular pH, growth characteristics and calcium in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 exposed to low pH. *New Phytologist* 137: 599-605.
- HERBERT, D., P. PHIPPS & R. STRANGE. 1971. Chemical analysis of microbial cells. En: *Methods in Microbiology* vol 5B (eds J. Norris & D. Ribbons), pp. 209-344. Academic Press, London.
- HERNÁNDEZ M., L. TRAVIESO & N. O'FARRIL. 1998. Comportamiento de *Anabaena cylindrica* en diferentes medios de cultivo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 29: 89-92.
- HOFFMANN, L. 1988. Criteria for the classification of

- blue-green algae at the genus and at the species level. *Archives of Hydrobiology / Algological Studies* 50: 131-139.
- LAU, R., M. MACKENZIE & W. DOOLITTLE. 1997. Phycocyanin synthesis and degradation in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. *Journal of Bacteriology* 132: 771-778.
- LEWITUS, A. & D. CARON. 1990. Relative effects of nitrogen and phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Marine Ecology Progress Series* 61: 171-181.
- LOWRY, O., H. ROSEBROUG, A. FARR & R. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- MARKER, A. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology* 2: 361-385.
- MARTÍN-TRILLO, M. 1995. Afloramientos masivos (blooms) de cianobacterias en los arrozales valencianos: seguimiento de su desarrollo y caracterización de dos estirpes formadoras. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Madrid, España.
- MISHRA, A. 1997. Regulation of cellular constituents, heterocyst development, photosynthetic O₂ evolution and enzyme activities of *Anabaena* sp. PCC 7120 by nitrogen sources. *Cytobios* 89: 173-182.
- MISKIEWICZ, E., A. IVANOV, J. WILLIAMS, M. KHAN, S. FALK & N. HUNER. 2000. Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium, *Plectonema boryanum* UTEX 485, to temperature and light. *Plant Cell Physiology* 41: 767-775.
- MORALES, E., M. RODRÍGUEZ, D. GARCÍA, C. LORETO & E. MARCO. 2002. Crecimiento, producción pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencias* 27: 373-378.
- MORENO, J., M. VARGAS, H. OLIVARES, J. RIVAS & M. GUERRERO. 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology* 60: 175-182.
- MUNDT, S., S. KREILOW, A. NOWOTNY & U. EFFMERT. 2001. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203: 327-334.
- PATTNAIK, U. & P. SINGH. 1978. Effect of nitrate nitrogen on the growth, heterocysts differentiation and nitrogen fixation in rice field blue-green alga *Gloeotrichia* sp. *Archives of Hydrobiology / Algological Studies* 20: 318-327.
- RAVEN, J. 1984. A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells. *New Phytologist* 98: 593-625.
- STACEY, G., C. VAN BAALEN & R. TABITA. 1977. Isolation and characterization of a marine *Anabaena* sp. capable of rapid growth on molecular nitrogen. *Archives of Microbiology* 114: 197-201.
- TANDEAU DE MARSAC, N. & J. HOUMAR. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps toward molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews* 104: 119-190.
- TISCHNER, R. & H. LORENZEN. 1979. Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. *Planta* 146: 287.
- VAN RIJN, J. & M. SHILO. 1986. Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp.) and its effect on macromolecular synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 340-344.
- VENKATAMARAN, L. 1986. Blue-Green algae as biofertilizer. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture* (ed. A. Richmond), pp. 455-472. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA.
- VIEIRA, J., G. LINDE, D. PIRES, G. MARTINEZ & R. TRAPP. 2000. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 15-18.
- VONSHAK A. 1987. Strain selection of *Spirulina* suitable for mass production. *Hydrobiologia* 151: 75-77.
- WILMOTTE, A. 1988. Growth and morphological variability of six strains of *Phormidium* cf. *ectocarpus* Gomont (Cyanophyceae) cultivated under different temperatures and light intensities. *Archives of Hydrobiology/ Algological Studies* 50-53: 35-46.
- WYMAN, M. & P. FAY. 1986. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (Cyanobacteria). I. Influence of light quantity. *Proceedings of the Royal Society of London* 227: 367-380.