

Cultivos a cielo abierto de las cianobacterias *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 para la producción de biomasa enriquecida. Pruebas piloto para cultivos masivos

Néstor Rosales-Loaiza, Laugeny Díaz, Cateryna Aiello-Mazzarri, * Ever Morales- Avendaño.

Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo Venezuela, nestoralgae@gmail.com.

*Laboratorio de Fermentaciones Industriales, Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo Venezuela.

Recibido: 20 octubre de 2016.

Aceptado: 13 de julio de 2017.

Palabras clave: *Anabaena*, *Nostoc*, Cielo abierto, Proteínas, Producción de Biomasa

Key words: *Anabaena*, *Nostoc*, Open cultures, Protein, Biomass Production

RESUMEN. La creciente demanda mundial de alimentos ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de biomasa altamente nutritiva. Las cianobacterias pueden ser utilizadas no sólo como fuente de compuestos de interés biotecnológico, sino también como alimento para animales y humanos, debido a su alta calidad nutricional. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de biomasa de las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 a cielo abierto a dos volúmenes de cultivo: 50 y 100 L usando como medio de cultivo BG11 sin nitrógeno. El crecimiento de las cianobacterias se siguió mediante turbidez de los cultivos y determinación de pigmentos hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. La biomasa fue cosechada, secada y usada para la determinación de masa seca, proteínas, carbohidratos, ficobiliproteínas y lípidos totales. *Anabaena* MOF015 produjo los mayores valores, al compararlos con los cultivos de *Nostoc*, de masa seca, clorofila *a*, ficocianina, ficoeritrina, proteínas y lípidos con $3,85 \pm 0,41 \text{ g L}^{-1}$; $3,76 \pm 0,51$; $6,16 \pm 0,85$; $2,79 \pm 0,25$; $250,31 \pm 10,01$ y $20,11 \pm 1,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente en un volumen de 50 L de cultivo. Mientras que, *Nostoc* LAUN0015 alcanzó la máxima producción de carbohidratos con $754,17 \pm 79,86 \mu\text{g mL}^{-1}$. *Anabaena* MOF015 se destaca por exhibir un mayor crecimiento y producción de biomasa seca ($p < 0,05$) en condiciones diazotróficas; lo cual supone sistemas de cultivos más económicos y de gran valor biotecnológico.

ABSTRACT. The growing world food demand has led to the search for new sources of highly nutritious biomass. Cyanobacteria can be used not only as a source of compounds of biotechnological interest, but also as food for animals and humans, because of their high nutritional quality. The aim of this study was to evaluate the biomass production of nitrogen fixing filamentous cyanobacteria *Nostoc* LAUN0015 and *Anabaena* MOF015 outdoors at two culture volumes: 50 and 100 L using BG11 with no nitrogen as culture medium without nitrogen. Growth was followed by turbidity and determination of pigments until reaching stationary phase of growth. The Biomass was harvested, dried and used for the determination of dry mass of protein, carbohydrates and phycohiliprotin total lipids. *Anabaena* MOF015 produced the highest values of dry mass, chlorophyll, phycocyanin, phycoerythrin, proteins and lipids with $3.85 \pm 0.41 \text{ g L}^{-1}$, 3.76 ± 0.51 , 6.16 ± 0.85 , 2.79 ± 0.25 , 250.31 ± 10.01 and $20.11 \pm 1.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectively in a volume of 50 L culture. *Nostoc* LAUN0015 reached the maximum production of carbohydrates of $754.17 \pm 79.86 \mu\text{g mL}^{-1}$. *Anabaena* MOF015 is prominent for further growth and production of dry biomass and metabolites ($p < 0.05$) in diazotrophic conditions, which means more economical culture systems with great biotechnological value.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos procariotas, capaces de producir una gran variedad de compuestos como proteínas, lípidos, pigmentos, polisacáridos, vitaminas y muchos otros metabolitos. Además, debido a que se adaptan rápidamente a nuevas condiciones medioambientales, son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica, que no son hallados en otros organismos.¹

Las limitaciones en la disponibilidad de tierras cultivables han llevado a la búsqueda de nuevos ingredientes para la alimentación humana y animal. Durante décadas, estos microorganismos han sido considerados como una fuente promisoría de proteínas y carbohidratos.² Las cianobacterias han sido utilizadas por los seres humanos por centenares de años como alimento y fertilizante principalmente. Estos constituyen una fuente alternativa de proteínas, debido a

su alto contenido de aminoácidos esenciales en su biomasa, para la producción de proteína unicelular a ser comercializada como suplemento alimenticio^{3,4}.

La utilización de diferentes cepas de cianobacterias como fuente de alimento depende del conocimiento detallado de una variedad de parámetros como composición química, digestibilidad y capacidad de ser crecida en cultivos masivos.² Aunque el género más conocido dentro de la industria alimentaria es *Spirulina/Arthrospira*^{2,4}, existen una gran cantidad de géneros y cepas que pueden ser caracterizadas, cultivadas y comercializadas como suplemento alimenticio.

En la literatura internacional han aparecido gran cantidad de reportes que señalan que la biomasa de cianobacterias posee numerosos efectos benéficos sobre la salud humana. Se conoce que posee efectos antivirales, antineoplásicos, hipoglucémicos, antibióticos, mejorador del sistema inmunitario, hipocolesterolémico, incluso, coadyuvante de la pérdida de peso^{3,5-8}.

Con base en lo anteriormente explicado, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y composición bioquímica de dos cepas de cianobacterias filamentosas crecidas a escala piloto a cielo abierto, como punto de partida para su utilización como una fuente real de biomasa en cultivos autotróficos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cianobacterias bajo estudio fueron: (a) *Nostoc* LAUN0015, aislada de un ambiente húmedo en Bogotá, y donada por la Universidad Nacional de Colombia⁹ y (b) *Anabaena* MOF015, aislada de lodos activados provenientes de una planta de tratamiento de la industria cervecera en Maracaibo, Venezuela.¹⁰

Los cultivos, por duplicado, fueron crecidos a dos volúmenes de cultivo, 50 y 100 L en envases cilíndricos abiertos de plástico, de 35 x 80 cm y una capacidad máxima de 180 L. El medio de cultivo utilizado fue el BG-11₀, caracterizado por no presentar ninguna fuente de nitrógeno¹¹. Se eligió la cloración del agua como método de desinfección, debido a su eficiencia y practicidad. El agua potable fue tratada con 2 mg L⁻¹ de hipoclorito de sodio por 24 h. Posteriormente, el agua fue burbujeadada por 24-48 horas para la volatilización del cloro y medición del mismo, asegurando un contenido inferior a 0,5 mg L⁻¹ de cloro residual¹².

El experimento se inició con un inóculo del 10 % del volumen total, obtenido de cultivos al final de la fase exponencial, a nivel de laboratorio. El ensayo fue mantenido por 40 d con aireación constante por burbujeo a una velocidad de 5 mL s⁻¹ y agitación manual tres veces al día. Esta agitación era necesaria puesto que al tratarse se cianobacterias filamentosas, la floculación es inevitable a pesar del burbujeo. Los cultivos fueron monitoreados a través de mediciones de turbidez (DO₇₅₀) y pigmentos cada tres días y determinación de composición bioquímica en fase estacionaria. Los registros de temperatura e irradiación se realizaron de forma diaria.

La masa seca fue determinada por métodos gravimétricos.¹³ El contenido de pigmentos se realizó por espectrofotometría, a través de extracciones metanólicas para clorofila *a*¹⁴ y carotenoides;¹⁵ o por ruptura celular para ficobiliproteínas.¹⁶ El contenido de proteínas se estimó por el método Folin.¹⁷ Los carbohidratos se midieron por el método de fenol-ácido sulfúrico¹⁸ y el contenido de lípidos se determinó por el método de carbonización simple.¹⁹

Los análisis estadísticos realizados empleando el paquete SPSS 15.0, usando análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Sheffé para examinar las diferencias en cuanto a crecimiento y composición bioquímica entre las cianobacterias y volúmenes de cultivo.

RESULTADOS

El crecimiento de *Nostoc* fue muy similar en ambos tratamientos; mientras que para *Anabaena* parece favorecerse el crecimiento a 50 L, a pesar de que la máxima absorbancia se obtuvo al final del cultivo a 100 L. Además, los cultivos de 50 L presentaron una tendencia a declinar su crecimiento más rápidamente que a 100 L. (Fig. 1).

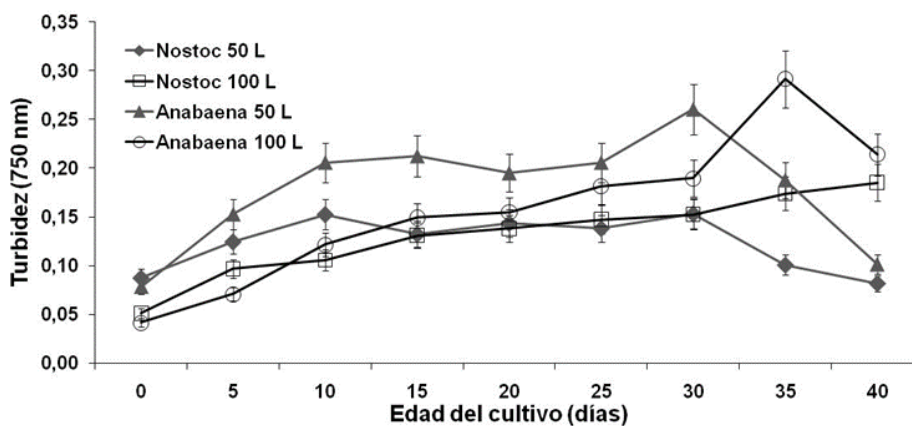


Fig. 1. Crecimiento seguido por turbidez (DO₇₅₀) de *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 a diferentes volúmenes de cultivo

La producción de biomasa fue independiente del volumen de cultivo. Es decir, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los cultivos de 50 y 100 L, para cada cianobacteria. Los cultivos de *Anabaena* producen al menos 2,0 veces más biomasa que los de *Nostoc*, con un máximo valor de $3,85 \pm 0,41 \text{ g L}^{-1}$. (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de biomasa seca (g L^{-1}) de *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 a diferentes volúmenes de cultivo.

<i>Nostoc</i> LAUN0015		<i>Anabaena</i> MOF015	
50 L	100 L	50 L	100 L
$1,50 \pm 0,39^a$	$1,14 \pm 0,23^a$	$3,85 \pm 0,41^b$	$3,08 \pm 0,23^b$

Valores obtenidos en fase estacionaria. Letras iguales como superíndices equivalen a un mismo grupo homogéneo ($p < 0,05$)

La producción de clorofila *a* fue mayor al menor volumen de cultivo de 50 L para ambas cianobacterias, con el valor máximo de $3,76 \pm 0,51 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ alcanzado por *Anabaena* MOF015 (Fig. 2 a) con diferencias significativas ($p < 0,05$). Por su parte los carotenoides también lograron su máximo a 50 L para *Anabaena* MOF015 con $0,72 \pm 0,12 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, pero en este caso sin diferencias significativas con respecto al volumen o cianobacteria usada ($p > 0,05$).

En cuanto a los pigmentos hidrosolubles, la ficocianina obtuvo el mismo patrón de mayor producción a menor volumen de cultivo (Fig. 2 b), con un valor de $6,16 \pm 0,85 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Anabaena* MOF015 ($p < 0,05$) en cultivos de 50 L. En *Nostoc* LAUN0015 la producción de ficoeritrina también fue mayor a 50 L; pero no así para *Anabaena* MOF015 donde se alcanzaron valores de $2,45 \pm 0,53$ y $2,79 \pm 0,25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, para 50 y 100 L; respectivamente y sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

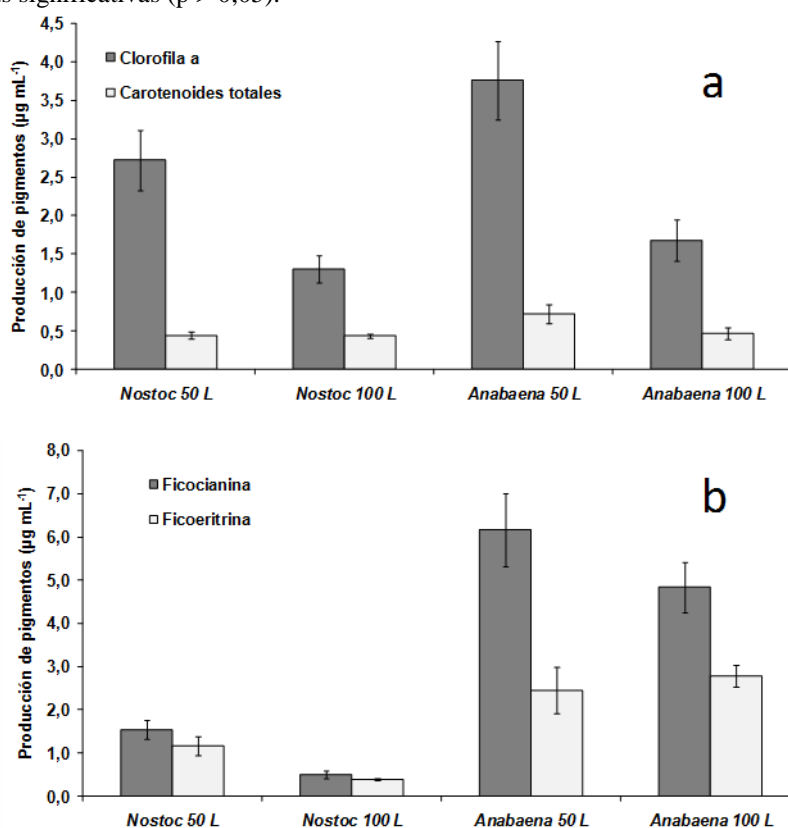


Fig. 2. Producción de (a) clorofila *a* y carotenoides y (b) ficocianina y ficoeritrina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 a diferentes volúmenes de cultivo.

Para el caso de la producción de proteínas, se registró el mayor contenido a 50 L para ambas cianobacterias filamentosas, con valores de $201,56 \pm 7,42$ y $250,31 \pm 10,01 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015, respectivamente ($p < 0,05$) (Tabla 2).

La producción de carbohidratos pareció mejorarse a mayores volúmenes de cultivo para *Nostoc* LAUN0015, donde el valor máximo de $754,17 \pm 9,86 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$) fue obtenido a 100 L (Tabla 2). En cambio, en *Anabaena* MOF015 no hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos a las dos escalas de cultivo ($p > 0,05$). La producción lipídica fue baja, lo cual en general es una tendencia común en cianobacterias. La mayor producción se

alcanzó en 50 L de cultivo para *Anabaena* MOF015 con $20,11 \pm 1,01 \mu\text{g mL}^{-1}$; el cual fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) al resto de los valores (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de proteínas, carbohidratos y lípidos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 a diferentes volúmenes de cultivo.

	<i>Nostoc</i> LAUN0015		<i>Anabaena</i> MOF015	
	50 L	100 L	50 L	100 L
Proteínas	$201,56 \pm 7,42^a$	$141,25 \pm 10,58^b$	$250,31 \pm 10,01^c$	$166,15 \pm 5,96^b$
Carbohidratos	$503,00 \pm 35,19^a$	$754,17 \pm 79,86^b$	$315,11 \pm 30,41^c$	$256,74 \pm 39,96^c$
Lípidos	$15,66 \pm 1,26^a$	$10,10 \pm 0,64^b$	$20,11 \pm 1,01^c$	$13,72 \pm 1,97^a$

Valores obtenidos en fase estacionaria. Letras similares corresponden a valores sin diferencias estadísticas ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Dependiendo del sistema de cultivo, las microalgas y cianobacterias rinden entre $0,1$ y $0,3 \text{ g L}^{-1}$ en sistemas abiertos y de 1 a 4 g L^{-1} en algunos fotobiorreactores²⁰. Los valores de este estudio se encuentran en este rango de entre 1 a 4 g L^{-1} , aunque hay que tomar en consideración que este estudio emplea volúmenes mucho más pequeños a los miles de litros que usualmente se encuentran en sistemas abiertos industriales²¹. Diversos estudios realizados tanto en sistemas abiertos como en fotobiorreactores han coincidido en valores de biomasa similares a los reportados en este trabajo^{21,22}.

La disminución de la masa seca producida por un cultivo al aumentar el volumen utilizado ha sido previamente observada en microalgas como *Porphyridium cruentum*, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis* sp. y *Scenedesmus*.²³⁻²⁶ Esto es debido principalmente a que, al aumentar el volumen de cultivo, la relación entre el área iluminada y el volumen total disminuye, cuando se comparada con cultivos de escala de laboratorio.²⁷

Se debe tomar en cuenta que todos los cultivos realizados fueron desarrollados en condiciones diazotróficas; es decir, sin la adición de nitrógeno al medio de cultivo. Esto representa una estrategia metabólica que le permite a ciertas cianobacterias crecer en ambientes pobres en nitrógeno, donde otros organismos fotosintéticos no podrían prosperar en ausencia de fuente nitrogenada en el medio o sustrato sobre el cual están creciendo.²⁸

Por lo tanto, los resultados obtenidos son de gran interés biotecnológico; ya que se alcanzó un alto contenido de pigmentos, proteínas y carbohidratos, sin utilizar fuentes de nitrógeno como elemento esencial en todos los medios de cultivos comerciales; los cuales se hacen más costosos por la adición de nitrato o amonio.

De tal manera que, con los cultivos a mayores escalas de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, se incrementa la eficiencia de producción de biomasa con tecnologías altamente competitivas en cuanto al uso de sistemas de cultivos discontinuos aireados y alimentados con los otros nutrientes requeridos por las cianobacterias con heterocistos.^{28,29} Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno están ampliamente distribuidas entre los géneros filamentosos formadores de heterocistos, como *Anabaena*, *Nostoc* y *Rivularia*, entre otras.²⁹ En un estudio previo, se ha comprobado que en el caso de *Nostoc* LAUN0015, es capaz no sólo de crecer en ausencia de nitrógeno, sino que además parece crecer mejor y producir metabolitos a mayores concentraciones que bajo condiciones de presencia de este elemento en el medio de cultivo.³⁰

Se ha establecido la disminución de la densidad celular y producción de biomasa en cultivos a gran escala, con parámetros de cultivo como la irradiancia. Esto se debe al efecto de ensombrecimiento a un mayor volumen y a la falta de las células de exponerse a la intensidad luminosa respectiva.³¹ Los cultivos con un volumen de 100 L tenían una profundidad de 30 cm , casi el doble de los cultivos de 50 L , lo que se traduce en un mayor ensombrecimiento y menor ingreso de la luz a la columna de agua.

En fotobiorreactores, las concentraciones de pigmentos, tanto liposolubles como hidrosolubles, obtenidas en cultivos cianobacterianos son mucho mayores a las reportadas en este estudio.^{22,25,32} Lakaniemi y col.²² obtuvieron valores de clorofila *a*, cercanos a $35 \mu\text{g mL}^{-1}$, unas diez veces más alto de lo alcanzado por *Anabaena*. En *Scenedesmus*, Andrade y col.²⁵ demostraron un mantenimiento de la producción de clorofila y carotenoides en medios mixotróficos a diferentes escalas. De igual forma la producción de ficocianina y ficoeritrina fue mucho más baja que las encontradas bajo condiciones de laboratorio en otros estudios, e inclusive con estas mismas cepas.^{30,32,33}

En cultivos a cielo abierto el aumento del volumen de cultivo, que implica la disminución del área iluminada; aunado a una agitación deficiente, producen una limitación lumínica.²⁷ Las células creciendo bajo estas condiciones están expuestas a un régimen de luz mucho más complejo que el ciclo circadiano. Este ciclo es inducido por el flujo turbulento del cultivo, donde las células cambian de una zona de alta iluminación cuando están en la capa más superior del cultivo a una zona de obscuridad total en el fondo de la unidad de cultivo. Este régimen "instantáneo" de luz es uno de los principales moduladores del crecimiento y producción de pigmentos de microalgas y cianobacterias en cultivos masivos.³⁴

En estos cultivos la fuerte radiación solar puede alterar de forma negativa la eficiencia del sistema; lo cual es particularmente cierto en esta zona del trópico. Los valores de iluminación variaron desde 24 kW m^{-2} en días

nublados a mayores de 40 kW m⁻² (límite de detección del fotómetro), mientras que la temperatura de los cultivos varió entre 30 y 39 °C. Estos dos factores produjeron una evaporación generalmente cercana a 1 L d⁻¹, condiciones que en la mayor parte de los casos produce una disminución de la productividad³⁴.

De forma contraria a la producción de biomasa, el contenido de carbohidratos tiende a aumentar con la alta irradiancia y evaporación que se presentaron en los cultivos; que constituyen factores estresantes que activan la producción no sólo de polisacáridos intracelulares, sino también de exopolisacáridos y polisacáridos capsulares.³⁵

Para la producción de lípidos a gran escala, generalmente son las clorofitas y las diatomeas las más empleadas. Géneros como *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Pavlova*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Phaeodactylum*, *Neochloris* y *Botryococcus* entre otros; son muy utilizadas en los estudios de producción lipídica, debido a que, en todos estos casos, y bajo condiciones de cultivo generalmente relacionadas con la limitación por nitrógeno, se obtienen contenidos de lípidos saturados superiores al 50 % respecto a biomasa seca.³⁶⁻³⁷

En el caso de las cianobacterias, la producción de lípidos generalmente no supera el 10 %, aunque existen cepas especialmente de *Arthrospira/Spirulina* que alcanza el 20 %.³⁰ Esto ocurre porque las cianobacterias en ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo, poseen una alta relación C:N, por lo que desvían las grandes cantidades de carbono fijado principalmente en la producción de carbohidratos, especialmente de exopolisacáridos.³⁵

CONCLUSIONES

Las cianobacterias *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 lograron ser cultivadas a cielo abierto de forma efectiva, obteniendo moderados resultados de crecimiento y producción de biomasa enriquecida. De las dos cianobacterias, *Anabaena* MOF015 cultivada a un volumen de 50 L, se verifica como mayor productora de biomasa, pigmentos, proteínas y carbohidratos.

Esto verifica su idoneidad para ser producida en cultivos al aire libre, más aún tomando en cuenta que este crecimiento fue obtenido sin utilizar fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, lo cual podría traducirse en una reducción importante en los costos de producción, obteniendo al mismo tiempo biomasa de gran calidad bioquímica y nutricional.

1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gouveia L, Marques A, Sousa J, Moura P, Bandara N. Microalgae: source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 2010; 7: 21-37.
2. Skrede A, Mydland L, Ahlstrom O, Reitan K, Gislerød H, Overland M. Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *Journal of Animal Feed Science*. 2011; 20: 131-142.
3. Batista A, Gouveia L, Bandarra N, Franco J, Raymundo A. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*. 2013; 2: 164-173.
4. Samek D, Mišurcová L, Machu L, Buňka F, Fisera M. Influencing of amino acid composition of green freshwater algae and cyanobacterium by methods of cultivation. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2013; 38(4): 360-368.
5. Caicedo N, Heyduck-Söller B, Fischer U, Thöming J. Bioproduction of antimicrobial compounds by using marine filamentous cyanobacterium cultivation. *Journal of Applied Phycology*. 2011; 23: 811-818.
6. De Jesus Raposo M, Santos Costa de Morais R, Miranda Bernardo de Morais A. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*. 2013; 93: 479-486.
7. Koller M, Muhr A, Braunegg G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*. 2014; 6: 52-63.
8. Ejike C, Collins S, Balasuriya N, Swanson A, Mason B., Udenigwe C. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends in Food Science and Technology*. 2017; 59: 30-36.
9. Herrera R. Evaluación de los exopolisacáridos producidos por una cepa nativa de cianobacteria *Nostoc* sp. como sustrato en la producción de bioetanol. [Tesis en opción del título de magíster en Ingeniería Química], Bogotá, Colombia Universidad Nacional de Colombia; julio 2012.
10. Díaz L. Estudios de tratabilidad de agua petrolizada empleando bacterias heterotróficas, aeróbicas y microorganismos fotosintéticos autóctonos. [Tesis en opción del título de doctora en Ingeniería Ambiental] Maracaibo, Venezuela Universidad del Zulia.; marzo 2011.
11. Rippka R, Deruelles J, Waterbury J, Herdman M, Stanier R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. 1979; 111: 1-61.
12. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4ta Edición. Ginebra, Suiza: 2011.
13. Utting S. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquaculture Engineering*. 1985; 4: 175-190.
14. Marker A, Nusch E, Rai H, Riemann B. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standarization of methods: conclusions and recommendations. *Archives of Hydrobiology*. 1980; 14: 91-106.
15. Strickland J, Parsons T. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board Canadian Bulletin. 1972: 167: 310.

16. Bennet A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*. 1973; 58: 419-435.
17. Lowry O, Rosenbrough H, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biology and Biochemistry*. 1951; 193: 265-275.
18. Kochert G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. En: Hellebust J, Craigie J., editores. *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press. Cambridge, R.U. 1978; 95-97.
19. Marsh J, Weinstein D. Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*. 1966; 7: 574-576.
20. Mata T, Martins A, Caetano N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010; 14: 217-232.
21. Borowitzka M, Moheimani N. Open pond culture systems. En: Borowitzka M, Moheimani N, editores. *Algae for biofuels and energy, developments in applied phycology 5*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, Países Bajos: 2013: 133-152.
22. Lakaniemi A, Intihar V, Tuovinen O, Puhakka J. Growth of *Dunaliellatertiolecta* and associated bacteria in photobioreactors. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*. 2012; 39: 1357-1365.
23. Morris H, Ramírez A, Martín M, Borges L, Olivares G. Cinética de crecimiento y producción de polisacáridos por la microalga *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta, Porphyridiaceae) en condiciones de radiación solar difusa. *Tecnología Química*. 2004; 24(1): 73-78.
24. Huesemann M, Crowe B, Waller P, Chavis A, Hobbs S, Edmundson S, *et al* validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures. *Algal Research*. 2016; 13: 195-206.
25. Andrade C, Vera A, Cárdenas C, Morales E. Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. Utilizando aguas residuales de pescadería. *Revista Técnica de Ingeniería*. 2009; 32(2): 126-134.
26. Borowitzka M. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. 1999; 70: 313-321.
27. Jorquera O, Kiperstok A, Sales E, Embiruçu M, Ghirardi M. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 1406-1413.
28. James E. Nitrogen fixation. En: Thomas B, Murray B, Murphy D. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 2da edición. Londres, R.U.: 2017.
29. Do Nascimento M, Sanchez Rizza L, Arruebarrena A, Dublan M, Salerno G, Rubio L, *et al* Cyanobacterial biological nitrogen fixation as a sustainable nitrogen fertilizer for the production of microalgal oil. *Algal Research*. 2015; 12: 142-148.
30. Rosales-Loaiza N, Vera P, Aiello-Mazzarri C, Morales E. Comparative growth and biochemical composition of four strains of *Nostoc* and *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocales) in relation to sodium nitrate. *Acta Biológica Colombiana*. 2016; 21(2): 347-354.
31. Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z., Boussiba S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 90: 1429-1441.
32. Kyeong Lee N, Oh H, Kim H, Ahn C. Higher production of C-phycoyanin by nitrogen-free (diazotrophic) cultivation of *Nostoc* sp. NK and simplified extraction by dark-cold shock. *Bioresource Technology*. 2017; 227: 164-170.
33. Xie Y, Jin Y, Zeng X, Chen J, Lu Y, Jing K. Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycoyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresource Technology*. 2015; 180: 281-287.
34. Tredici M. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels*. 2010; 1: 143-162.
35. Otero A, Vicenzini M. *Nostoc* (Cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism. *Journal of Phycology*. 2004; 40: 74-81.
36. Griffiths M, van Hille R, Harrison S. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*. 2012; 24: 989-1001.
37. Nascimento I, Marques S, Dominguez I, Andrade S, Druzian J, Oliveira de Souza C, *et al*. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy Research*. 2013; 6: 1-13.