

# Efecto de la salinidad y la concentración de nutrientes sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria autóctona *Oscillatoria* sp. MOF-06

Gisela Fuenmayor, Lorena Jonte, Néstor Rosales-Loaiza y Ever Morales\*

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

Recibido: 24-01-08 Aceptado 20-02-09

## Resumen

Se evaluó el efecto de la concentración de nutrientes (4, 8 y 12 mM NaNO<sub>3</sub>) y salinidad (0; 15; 35 y 70 UPS) sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. en cultivos discontinuos. Los bioensayos por triplicado se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio. La cianobacteria fue capaz de crecer bajo todas las concentraciones de nutrientes y salinidad, excepto en ausencia total de fuente nitrogenada. La producción óptima de clorofila *a* y  $\beta$ -caroteno, de  $33,72 \pm 0,97$  y  $0,66 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente, se hallaron a 35 UPS y 12 mM NaNO<sub>3</sub>; mientras que para ficocianina los valores más elevados estuvieron a 12 mM NaNO<sub>3</sub> y entre 35 y 70 UPS, con  $160,17 \pm 1,57$  y  $160,40 \pm 12,68 \mu\text{g mL}^{-1}$ . El máximo de masa seca se halló a 4 mM NaNO<sub>3</sub> y 70 UPS con  $11,00 \pm 0,57 \text{ mg mL}^{-1}$ ; el de proteínas a 12 mM y 35 UPS con  $777,92 \pm 15,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; el de carbohidratos totales y exopolisacáridos a 8 mM y 35 UPS con  $7,15 \pm 0,53 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $3,30 \pm 0,41 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente. De esta forma, es posible modular la producción de biomasa enriquecida con metabolitos de esta cepa halotolerante de *Oscillatoria* sp. en función al efecto combinado de la salinidad y la concentración de nutrientes.

**Palabras clave:** Cianobacteria, nutrientes, salinidad, metabolitos, *Oscillatoria* sp.

## Effect of salinity and nutrient concentration on growth and biochemical composition of the autochthonous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. MOF-06

### Abstract

We assessed the effect of nutrient concentration (4, 8 and 12 mM NaNO<sub>3</sub>) and salinity (0, 15, 35 and 70 PSU) on growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Oscillatoria* sp. in batch cultures. Bioassays by triplicate were maintained on laboratory conditions. The cyanobacterium was able to grow in all nutrient concentrations and salinities tested, except in total absence of nitrogen source. Optimal production of chlorophyll *a* and  $\beta$ -carotene of  $33.72 \pm 0.97$  and  $0.66 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, were found at 35 PSU and 12 mM NaNO<sub>3</sub> with; whereas highest values for phycocyanin were at 12 mM NaNO<sub>3</sub> and between 35 and 70 PSU, with  $160.17 \pm 1.57$  and  $160.40 \pm 12.68 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Maximum dry weight was achieved at 4 mM NaNO<sub>3</sub> and 70 PSU of  $11.00 \pm 0.57 \text{ mg mL}^{-1}$ ; proteins at 12 mM and 35 PSU of  $777.92 \pm 15.37 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;

\* Autor para la correspondencia: evermster@gmail.com

and carbohydrates and exopolysaccharides at 8 mM and 35 PSU with  $7.15 \pm 0.53 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $3.30 \pm 0.41 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectively. Thus, is it possible to modulate enrich biomass production from the halotolerant strain of *Oscillatoria* sp. in function of the combined effect of salinity and nutrient concentration.

**Key words:** Cyanobacterium, nutrients, salinity, metabolites, *Oscillatoria* sp.

## Introducción

El crecimiento de las cianobacterias en ambientes acuáticos está controlado por una variedad de factores ambientales y para su cultivo es necesario condiciones adecuadas de nutrientes, temperatura, pH e iluminación (1). El conocimiento de sus características fisiológicas y bioquímicas en cultivos de laboratorio, en un amplio rango de parámetros puede ayudar no sólo a determinar su potencial biotecnológico, sino también a determinar e interpretar de manera más eficiente los resultados adquiridos del crecimiento de estos microorganismos en su ambiente natural (2).

Las cianobacterias se han descrito como fuentes útiles de clorofilas, carotenoides, ficobiliproteínas, exopolisacáridos, proteínas y otros metabolitos biológicamente activos (3, 4), y su potencial biotecnológico parece incrementarse en cepas que pueden tolerar condiciones extremas de salinidad para evitar parcialmente la competencia de otros organismos menos tolerantes. Así, los organismos halotolerantes son candidatos muy atractivos para su cultivo en masa en ambientes hipersalinos o áridos con alta radiación solar, que no serían utilizables para algún otro tipo de cultivo (2, 3).

La concentración de nutrientes es un factor esencial que se evalúa para discriminar entre aquel factor que puede ser limitante o suficiente para el crecimiento de cianobacterias en condiciones de laboratorio, y en función de la interrelación con otros factores como luz, aireación y salinidad, que también contribuyen a la asimilación de los nutrientes presentes en el medio de cultivo.

En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento, masa seca, producción de pigmentos, proteínas, carbohidratos y exopolisacáridos de una cepa de *Oscillatoria* sp. aislada de una laguna para el cultivo de camarones, en relación a la concentración de nutrientes y variaciones en la salinidad en condiciones de laboratorio.

## Materiales y Métodos

### Organismo

La cianobacteria filamentosa *Oscillatoria* sp. MOF-06, fue aislada de muestras de agua de una granja de camaronicultura, ubicada en las cercanías de Tocopero, Estado Falcón ( $11^{\circ} 29' 26''$  N,  $69^{\circ} 12' 06''$  O). La clasificación de dicha cepa se realizó utilizando claves especializadas sobre cianobacterias filamentosas (5). *Oscillatoria* se caracteriza por filamentos solitarios largos, verde-azulados y con una vaina muy fina, tabicados cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria, con célula terminal redondeada, los filamentos muestran movimiento deslizante (6).

### Condiciones de cultivo y ensayos

Los cultivos por triplicado fueron mantenidos en frascos de 350 mL con 150 mL de medio de cultivo, compuesto por agua de mar o destilada estéril enriquecida con nutrientes (7) con una relación N:P de 20:1. Los frascos se inocularon a una absorbancia de 0,08 a 750 nm ( $\text{DO}_{750}$ ), mantenidos a  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , iluminación unilateral a una intensidad luminosa de  $156 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fotoperiodo luz-oscuridad de 12:12 h. y aireación constante de  $5 \text{ mL s}^{-1}$ .

En una serie de cuatro ensayos, se probó el efecto de la salinidad (ensayo 1: 0 UPS; ensayo 2: 15 UPS; ensayo 3: 35 UPS y ensayo 4: 7 UPS) a diferentes concentraciones de nutrientes, equivalentes a 0, 4, 8 y 12 mM de  $\text{NaNO}_3$ , con aumento o disminución proporcional para el resto de los nutrientes presentes en el medio de cultivo. Todos los cultivos fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio hasta alcanzar la fase estacionaria.

### Análisis de biomasa

El crecimiento se evaluó cada tres días hasta fase estacionaria y se determinó mediante turbidez a una densidad óptica de 750nm. La biomasa se cosechó por centrifugación a  $14 \times 10^3$  g por 15 min. Para los análisis bioquímicos se utilizó biomasa congelada a  $-20^\circ\text{C}$ , excepto para el contenido de pigmentos y masa seca, para los cuales se usó biomasa fresca.

Los pigmentos liposolubles, clorofila *a* y carotenoides se midieron por HPLC utilizando el método descrito por Vidussi *et al.* (8). Se usó una columna Agilent Hypersil MOS ( $4.6 \times 100$  mm,  $5 \mu\text{m}$  de tamaño de partícula), con estándares para la identificación y cuantificación de clorofila *a*,  $\beta$ -caroteno y zeaxantina. El pigmento hidrosoluble, ficocianina, se extrajo por el método de choque osmótico (9) y se determinó según la fórmula de Bennet y Bogorad (10).

Los carbohidratos se midieron por el método de fenol-ácido sulfúrico (11) y los exopolisacáridos (EPS) y cuantificados por precipitación del sobrenadante con metanol (1:1) (12). El contenido de proteínas se midió por el método de Lowry *et al.* (13) modificado por Herbert *et al.* (14). La masa seca se determinó usando un sistema de filtración Millipore® con filtros de fibra de vidrio de  $0,45 \mu\text{m}$  mediante el método descrito por Utting (15).

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 10.0 para

Windows, utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé (16).

## Resultados y discusión

El crecimiento seguido por turbidez mostró un buen crecimiento de la cianobacteria bajo todas las condiciones de salinidad y nutrientes probadas; con excepción de los cultivos iniciados en ausencia de nitrógeno (0 mM  $\text{NaNO}_3$ ). Se observó que los cultivos iniciados a 4 mM  $\text{NaNO}_3$  entraron en fase estacionaria cerca del día 15 de cultivos, mientras que los cultivos a 8 y 12 mM  $\text{NaNO}_3$  se mantuvieron en fase exponencial hasta el día 21 de cultivo, esto debido a la mayor carga de nutrientes presentes bajo estas condiciones.

Los cultivos mostraron dependencia de nitrógeno para su crecimiento, debido a que bajo su ausencia se exhibió una disminución significativa de la población inicial y pérdida de la pigmentación característica. Esto fue observado no sólo en este primer experimento, sino también a todas las salinidades probadas.

En líneas generales, y sin importar la salinidad ensayada, cuando la cianobacteria fue expuesta a un medio sin nitrógeno, se mantuvo un crecimiento estable durante los primeros 4 días de cultivo, posiblemente utilizando sus reservas celulares de nitrógeno. A partir del quinto día, se observó un blanqueamiento o clorosis de los cultivos, debido a la degradación de las ficobiliproteínas utilizadas como fuente de reserva de nitrógeno (17) y a la disminución de la síntesis de clorofila *a* en respuesta a la deficiencia de nutrientes (18). Este efecto fisiológico demuestra la incapacidad de *Oscillatoria* sp. de exhibir crecimiento diazotrófico y por lo tanto de fijar nitrógeno en un medio carente de fuente nitrogenada (19).

Comparando los datos obtenidos en todos los ensayos, la turbidez de los cultivos

parece ser independiente de la salinidad probada y estar en función de la concentración de nutrientes. Los mayores valores se obtuvieron siempre entre 8 y 12 mM NaNO<sub>3</sub>, con el máximo valor a 35 UPS de salinidad y 12 mM NaNO<sub>3</sub> con 1,01 ± 0,06 unidades de absorbancia (Tabla 1) (p<0,05).

En cuanto a la masa seca, una mejor medida para estimar el crecimiento de cultivos de cianobacterias filamentosas, se observó un comportamiento distinto al observado con la turbidez en el cual la salinidad y no la concentración de nutrientes, parece afectar en mayor grado el crecimiento cianobacteriano. Los mayores valores de 11,0 ± 0,57; 10,83 ± 0,76 y 10,60 ± 0,41 mg mL<sup>-1</sup> se obtuvieron a 70 UPS de salinidad y a 4, 8 y 12 mM NaNO<sub>3</sub>, respectivamente sin diferencias significativas en entre ellos (p<0,05) pero con diferencias significativas (p>0,05) al comparar con el resto de los ensayos a diferentes salinidades (Tabla 1).

El incremento del crecimiento de *Oscillatoria* sp. con el aumento de la concentración de nutrientes también se ha descrito en otras cepas de esta cianobacteria, como *Oscillatoria agardhii* y *O. redekei* en las cuales se demostró una correlación positiva entre el crecimiento y el aumento de nutrientes en el medio de cultivo, hasta valores de 10 mM NaNO<sub>3</sub> (20). Esto también ha sido reportado en otras cianobacterias como *Oscillatoria rubescens*, *Spirulina platensis* (21) y *Anacystis nidulans* (22) y en *Synechococcus* sp. IO9201 (23).

El comportamiento de la masa seca, contrario al obtenido con la turbidez se debe principalmente a la menor velocidad de crecimiento y mayor tasa de duplicación que presentaron los cultivos a las menores concentraciones de nutrientes y mayores salinidades. Bajo estas condiciones, las células mantienen una talla superior que las células con una elevada tasa de crecimiento y también tienden a acumular mayor cantidad de metabolitos (2).

La cianobacteria *Oscillatoria* sp., fue capaz de crecer a todas las salinidades probadas, demostrando que al igual que la mayoría de las cianobacterias marinas son capaces de tolerar un rango amplio de salinidad (24). Además se puede considerar a *Oscillatoria* sp. como una cianobacteria halotolerante, ya que pudo crecer a altas salinidades, de hasta 70 UPS e inclusive, en ausencia total de sal en el medio de cultivo.

El amplio rango de salinidad bajo el cual puede crecer esta cepa puede estar relacionado con la variación de salinidad en su hábitat, de acuerdo a las estaciones seca y húmeda. En *Aphanothece* sp. se ha descrito una rápida adaptación a la salinidad entre 34 y 174 UPS debido posiblemente a la marcada estacionalidad de su hábitat natural (25).

Los pigmentos liposolubles aumentaron con el aumento de la concentración de nutrientes y con el aumento de la salinidad hasta 35 UPS, para luego disminuir a 70

Tabla 1  
Densidad óptica (750 nm) y masa seca (mg mL<sup>-1</sup>) de la cianobacteria autóctona *Oscillatoria* sp., bajo diferentes condiciones de salinidad (UPS) y concentración de nutrientes (mM NaNO<sub>3</sub>).

	Densidad Óptica (750 nm)			Masa seca (mg mL <sup>-1</sup> )		
	4 mM	8 mM	12 mM	4 mM	8 mM	12 mM
0	0,56 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,92 ± 0,08	2,10 ± 0,28	2,40 ± 0,29	3,30 ± 0,82
15	0,75 ± 0,08	0,91 ± 0,05	0,95 ± 0,07	4,10 ± 0,32	4,48 ± 0,33	4,88 ± 0,21
35	0,85 ± 0,05	0,96 ± 0,05	1,01 ± 0,06	7,90 ± 0,96	7,50 ± 0,57	7,78 ± 0,22
70	0,87 ± 0,03	0,90 ± 0,06	0,95 ± 0,02	11,0 ± 0,57	10,83 ± 0,76	10,60 ± 0,41

UPS, con excepción de los cultivos a 4 mM  $\text{NaNO}_3$ . Los mayores valores se produjeron a 35 UPS y 12 mM  $\text{NaNO}_3$  con  $33,72 \pm 0,97$  y  $0,66 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  para clorofila  $a$  y  $\beta$ -caroteno, respectivamente y sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con los valores obtenidos a 8 mM  $\text{NaNO}_3$  a esta misma salinidad (Figura 1). Para los cultivos a 4 mM  $\text{NaNO}_3$  los mayores valores se obtuvieron a 70 UPS con  $22,54 \pm 1,32$  y  $0,40 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para clorofila  $a$  y  $\beta$ -caroteno, respectivamente (Figura 1).

El aumento de la producción de pigmentos y proteínas con la concentración de nitrato obtenida con esta cianobacteria, también se ha descrito en las cianobacterias *Chroococcidiopsis* sp. (26), *Anabaena* sp. PCC 7120 (27) y *Synechococcus* sp. (28), y está relacionado de forma obvia con la mayor disponibilidad de nutrientes en el medio (29).

El aumento de la producción de pigmentos en microorganismos fotosintéticos se caracteriza por un aumento progresivo al aumentar la salinidad en el medio de cultivo, debido a la capacidad osmorreguladora de este tipo de metabolitos (17). Esto ha sido observado para microalgas como *Dunaliella* sp. (hasta 120 UPS; [30]) y ciano-

bacterias como *Synechococcus* sp. (hasta 100 UPS; [2]).

Por otro lado, se observa que la producción de carotenoides sólo aumentó de forma progresiva con el aumento de la salinidad en los cultivos a 4 mM  $\text{NaNO}_3$ . Esto pudo deberse al efecto combinado del estrés salino y las deficiencias en la cantidad de nutrientes disponibles en el medio. En otras cianobacterias se ha reportado carotenogénesis como resultado del incremento de la salinidad (18). Aun así, la producción de  $\beta$ -caroteno de nuestros datos experimentales no es suficientemente alta como para considerar carotenogénesis, ya sea por deficiencia de nutrientes o por estrés salino (25).

En el análisis de ficocianina se observó el aumento de la concentración de este pigmento con el aumento tanto de la salinidad como de la concentración de nutrientes. La mayor producción de este pigmento se obtuvo a 12 mM y a 35 y 70 UPS de salinidad con  $160,17 \pm 1,57$  y  $160,40 \pm 12,68 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente y sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Los máximos valores para 4 y 8 mM  $\text{NaNO}_3$  se obtuvieron también a 70 UPS con  $50,36 \pm 5,94$  y  $96,12 \pm 1,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Figura 1).

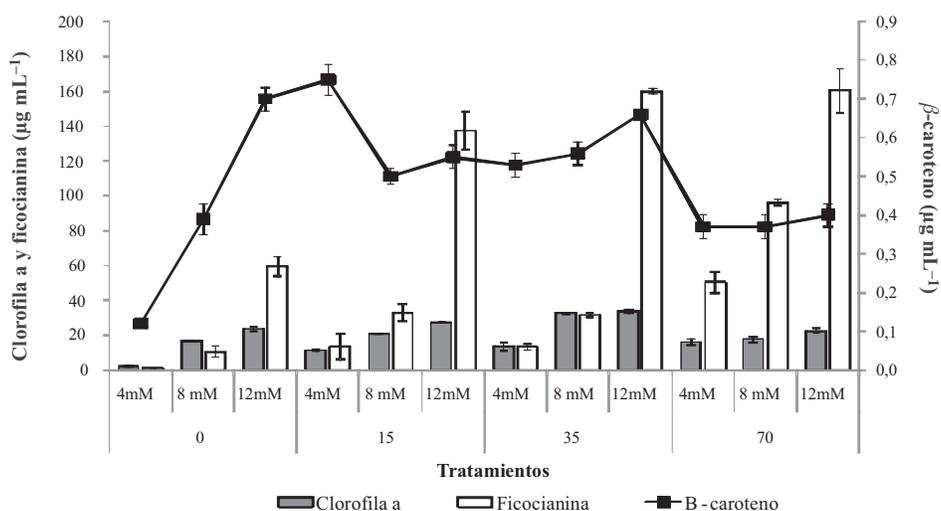


Figura 1. Producción de clorofila  $a$ ,  $\beta$ -caroteno y ficocianina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. bajo diferentes condiciones de salinidad (UPS) y concentración de nutrientes (mM  $\text{NaNO}_3$ ).

Trabajos realizados con cianobacterias como *Anabaena* PCC 7120 y *Nostoc* sp. LAUN0015 demostraron que la producción de ficocianina estuvo estimulada en los cultivos a la mayor concentración de nutrientes probada (27, 31).

El contenido de pigmentos es dependiente de la concentración de nitrato (23). La baja producción de ficocianina en cultivos carentes o limitantes de nitrógeno obedece a procesos de degradación, a fin de movilizar el nitrógeno de esta cromoproteína, hacia rutas metabólicas inherentes al crecimiento y síntesis de otras macromoléculas (32). Nuestros resultados confirman que es necesaria la adición de suficientes concentraciones de nitrato para una significativa síntesis de clorofila a, carotenoides y ficocianina en esta cepa de *Oscillatoria*, bajo las condiciones de cultivo establecidas.

La producción de proteínas parece estar modulada positivamente por la concentración de nutrientes. Por otro lado, y a bajas concentraciones de nutrientes (4 mM NaNO<sub>3</sub>), se observa un efecto inverso al aumentar la salinidad; mientras que no se observa un patrón definido con el aumento de la salinidad bajo suficiencia de nutrientes (8 y 12 mM NaNO<sub>3</sub>) en el medio de cultivo. Los máximos valores se hallaron a 0 UPS y 12

mM NaNO<sub>3</sub> con  $803,29 \pm 19,88 \mu\text{g mL}^{-1}$ , con diferencias significativas al ser comparado con el resto de los valores (Figura 2) ( $p < 0,05$ ).

El contenido de proteínas en las cianobacterias depende de la fuente de nitrógeno suministrada (15). La respuesta a salinidades elevadas puede implicar algunos cambios fisiológicos en las células microalgales, sugiriendo un cambio metabólico. El aumento de la salinidad de 29 a 117 UPS en *Cyanothece* 16Som2, reduce la producción de proteínas y carbohidratos (33). Sin embargo, en *Aphanothece* sp. el aumento de la salinidad produce un aumento de la producción proteica, tanto celular como por volumen de cultivo (25).

El análisis de carbohidratos totales indicó que hubo un incremento con la salinidad hasta 35 UPS, con excepción del tratamiento a 4 mM NaNO<sub>3</sub> donde el aumento se observó hasta la máxima salinidad de 70 UPS. De igual forma, la concentración de nutrientes parece tener una gran influencia en la producción de carbohidratos, con diferencias estadísticas significativas al comparar las diferentes concentraciones de nutrientes probadas en cada salinidad ( $p < 0,05$ ). El máximo de  $7,15 \pm 0,53 \mu\text{g mL}^{-1}$  fue obtenido a 35 UPS y 8 mM NaNO<sub>3</sub> (Figura 3).

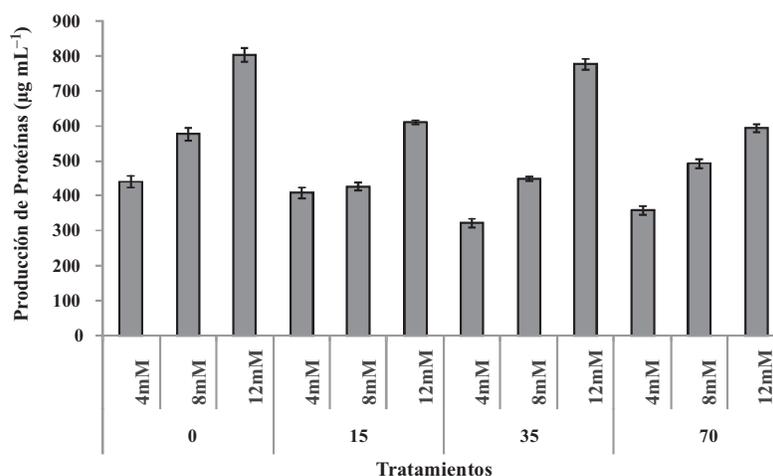


Figura 2. Producción de proteínas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. bajo diferentes condiciones de salinidad (UPS) y concentración de nutrientes (mM NaNO<sub>3</sub>).

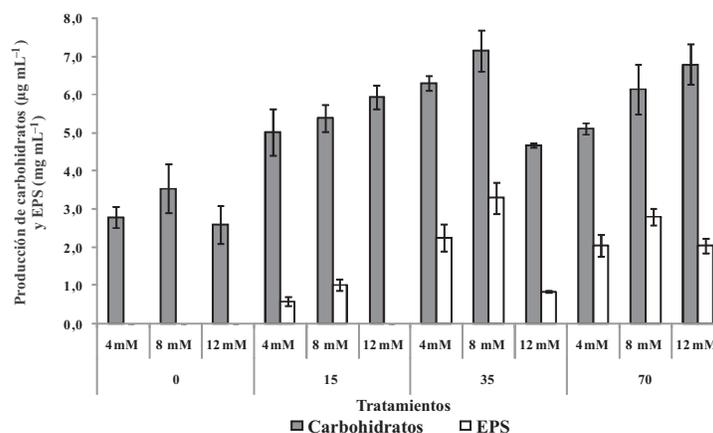


Figura 3. Producción de carbohidratos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y exopolisacáridos (EPS,  $\text{mg mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. bajo diferentes condiciones de salinidad (UPS) y concentración de nutrientes ( $\text{mM NaNO}_3$ ).

La producción de exopolisacáridos (EPS) mostró un comportamiento similar al observado con los carbohidratos totales. El máximo valor fue obtenido a 8 mM  $\text{NaNO}_3$  y 35 UPS con  $3,30 \pm 0,41 \text{ mg mL}^{-1}$ . Además se observó la ausencia total de EPS a 0 UPS en todas las concentraciones de nutrientes probadas y los mayores valores en promedio a la mayor salinidad de 7 UPS (Figura 3).

Se ha reportado en trabajos realizados con cultivos discontinuos de *Cyanothece* sp., que la cantidad de EPS es mucho mayor cuando los medios están limitados de nitrógeno en comparación con los cultivos controles, donde no hay limitación de nutrientes (33). Es conocido que las microalgas y cianobacterias pueden modular la producción de sus EPS como una respuesta a algunos factores ambientales como lo son deficiencias nutricionales o altas salinidades e irradiancias (34). Por otro lado, un trabajo realizado con dos cepas de la cianobacteria *Synechocystis* sp. mostró que la síntesis de EPS en ambas cepas no varió significativamente cuando se les aplicaron variaciones en sus condiciones nutricionales (35).

### Conclusiones

Todos estos resultados indican que *Oscillatoria* sp. es capaz de responder satisfac-

toriamente a cambios de salinidad y concentración de nutrientes en cultivos discontinuos; con una alta producción de metabolitos a concentraciones altas e intermedias de nutrientes y salinidad. 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.

### Referencias bibliográficas

1. WHITTON B., POTTS M. *The ecology of cyanobacteria*. (Eds. Whitton B, Potts M.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (Países Bajos). pp. 281-306. 2000.
2. ROSALES N., ORTEGA J., MORA R., MORALES E. *Cien Mar* 31: 349-355. 2005.
3. VENTOSA A., NIETO J. *World J Biotechnol Microbiol* 11: 85-94. 1995.
4. LAGARDE D., BEUF L., VERMAAS W. *Appl Environ Microbiol* 66: 64-72. 2000.
5. ANAGNOSTIDIS K., KOMÁREK J. *Arch Hydrobiol* 80(1-4): 327-472. 1988.
6. RIPPKA R., DERUELLES J., WATERBURY J., HERDMEN M., STANIER R. *J Gen Microbiol* 111: 1-61. 1979.

7. FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C., CABEZAS B., VEIGA M. **Aquaculture** 42: 207-245. 1984.
8. VIDUSSI F., CLAUSTRE H., BUSTILLOS J., CAILLIAU C., MARTY J. **J Plankton Res** 18: 237-282. 1996.
9. WYMAN M., FAY P. **Procc Royal Soc Lond** 227: 367-380. 1986.
10. BENNET A., BOGORAD L. **J Cell Biol** 58: 419-435. 1973.
11. KOCHERT G. **Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods** (Eds. Hellebust J., Craigie J.). Cambridge University Press. Cambridge (Reino Unido). 95-97. 1978.
12. SHAH V., RAY A., GARG N., MADAMWARD. **Current Microbiol** 40: 274-278. 2000.
13. LOWRY O., ROSENBROUGH H., FARR A., RYALL R. **J Biol Chem** 193: 265-275. 1951.
14. HERBERT D., PHIPPS P., STRANGE R. **Methods in Microbiology** (Eds. Norris J., Ribbons D.). Academic Press. Londres (Reino Unido). pp 209-344, 1971.
15. UTTING S. **Aquacul Engin** 4: 175-190, 1985.
16. SOKAL R., ROHLF F. **The principles and practice of statistics in biological research**. W.H. Freeman. Nueva York (Estados Unidos). 887 pp. 1985.
17. SAUER J., GÖRL M., FORCHHAMMER K. **Arch Microbiol** 172: 247-255. 1999.
18. GÖRL M., SAUER J., BAIER T., FORCHHAMMER K. **Microbiology** 144: 2449-2458. 1998.
19. HUANG T., CHOW T. **FEMS Microbiol Lett** 36: 109-110. 1986.
20. FOY R. **J Plankton Res** 15: 1263-1276. 1993.
21. BECKER E. **Microalgae biotechnology and microbiology**. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge (Reino Unido). 126-195. 1995.
22. LAU R., MACKENZIE M., DOOLITTLE W. **J Bacteriol** 132: 771-778. 1997.
23. BETANCOURT L. Producción, purificación y caracterización de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 aislada en aguas de Cuba (Para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas). Universidade da Coruña. La Coruña (España). 188 pp. 1997.
24. PAERL H. **Ecology of Cyanobacteria**. (Eds. Whitton A., Potts M.). Kluwer Academic Publishers., Dordrecht (Países Bajos). pp.121-149. 2000.
25. BERLAND B., LE CAMPION T., CAMPOS H. **Bot Mar** 32: 317-329. 1989.
26. BILLI D., GRILLI M. **New Phytol** 133: 563-571. 1996.
27. LORETO C., ROSALES N., BERMÚDEZ J., MORALES E. **Gay Bot** 60: 83-90. 2003.
28. ROSALES N., JONTE L., MORALES E. **Bol Centro Invest Biol** 40: 120-132. 2006.
29. MILLER S., MARTIN M., TOUCHTON J., CASTENHOLZ R. **Arch Microbiol** 177: 392-400. 2002.
30. MORA R., ORTÍZ N., CLEMENTE I., BERMÚDEZ J., AVENDAÑO D., MORALES E. **Oceánides** 17: 73-83. 2002.
31. ROSALES N. Evaluación de la actividad biológica de extractos de la cianobacteria *Nostoc* LAUN 0015, en condiciones de laboratorio (Para obtener el título de Magíster en Microbiología). Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. 101 pp. 2007.
32. LEWITUS A., CARON D. **Mar Ecol Prog Ser** 61: 171-181. 1990.
33. DE PHILIPPIS R., MARGHERI M., PELOSI E., VENTURA S. **J Appl Phycol** 5: 387-394. 1993.
34. THÉPENIER C., GUDIN C. **J Appl Microbiol Biotechnol** 1: 257-268. 1985.
35. PANOFF J., PRIEM B., MOVAN H., JOSET F. **Arch Microbiol** 150: 558-563. 1988.