

PRODUCTIVIDAD DE LA CIANOBACTERIA *Anabaena* PCC 7120 EN CULTIVOS SEMICONTINUOS

César Loreto y Ever Morales*

Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela. E-mail: everm@iamnet.com

Resumen. Se evaluó el crecimiento, el contenido de pigmentos y de proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en cultivos semicontinuos, a una tasa de renovación diaria del 10, 20, 30 y 50% del volumen de cultivo. Los ensayos se realizaron por triplicado, con un volumen de 200 mL, a una intensidad luminosa de $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo 12h de luz: 12h de oscuridad y una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. La mayor densidad celular se obtuvo a la tasa de renovación del 10% ($134,32 \pm 31,03 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$), seguida de las correspondientes al 20% y 30% con $91,04 \pm 24,98$ y $83,27 \pm 2,34 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ respectivamente. El contenido de clorofila, más elevado se alcanzó al 20%, mostrando diferencias significativas ($p < 0,01$), con una productividad de $1,03 \pm 0,23 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; mientras que la ficocianina correspondió al 30% con $11,52 \pm 1,87 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La mayor productividad de proteínas se logró al 20%, obteniéndose $79,68 \pm 4,11 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 se puede utilizar para la producción diaria de proteínas, ficocianina y clorofila a en cultivos semicontinuos, con una mayor eficiencia en comparación a los discontinuos.

Palabras clave: *Anabaena* PCC 7120, cianobacteria, crecimiento, cultivo semicontinuo, pigmentos, proteínas, tasa de renovación.

*Autor para la correspondencia.

Recibido: 03 Junio 2002 / Aceptado: 18 Junio 2002
Received: 03 June 2002 / Accepted: 18 June 2002

PRODUCTIVITY OF THE CYANOBACTERIUM *Anabaena* PCC 7120 IN SEMICONTINUOUS CULTURES

Abstract. The growth, pigment and protein content of cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 were evaluated in semicontinuous cultures, to a renewal rate of 10, 20, 30 y 50% of culture volume. Trials were carried out in triplicate, with a volume of 200 mL, light intensity of $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, photoperiod 12h k light: 12h dark and a temperature of $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Highest cell density was obtained at a renewal rate of 10% ($134.32 \pm 31.03 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$), followed by 20% and 30% with values of 91.04 ± 24.98 and $83.27 \pm 2.34 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$, respectively. Highest chlorophyll content was reached at 20%, showing significant differences ($p < 0.01$), with a productivity of $1.03 \pm 0.23 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Whereas phycocyanin productivity was maximum at 30% with $11.52 \pm 1.87 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Highest protein productivity was obtained at 20% with a value of $79.68 \pm 4.11 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Cyano-bacteria *Anabaena* PCC 7120 can be utilized for daily protein, phycocyanin and chlorophyll production in semi-continuous cultures with greater efficiency than in a batch system culture.

Key words: *Anabaena* PCC 7120, cyanobacteria, pigments, proteins, semicontinuous culture.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son microorganismos procariotas, capaces de sintetizar clorofila a y realizar fotosíntesis oxigénica o anoxigénica bajo determinadas condiciones; además, pueden presentar un potencial para la producción industrial de ficocianina, ficoeritrina y exopolisacáridos (Apt y Behrens 1999). Estas propiedades pueden ser evaluadas mediante sistemas de cultivos discontinuos o semicontinuos, con el fin de inducir una mayor producción de biomasa enriquecida (Moreno *et al.* 1998). Se ha señalado a los sistemas semicontinuos como una alternativa frente a los discontinuos, por su facilidad de operación para el mejoramiento de la productividad y la composición bioquímica de la biomasa obtenida, utilizando los parámetros: tasa de renovación y concentración de nutrientes (Fábregas *et al.* 1998). En este sistema de cultivo la metodología consiste en

aplicar una tasa de renovación, la cual se basa en retirar un volumen indicado del cultivo y la reposición del mismo, con medio fresco en un intervalo de tiempo conocido, con lo cual se obtiene una producción diaria de biomasa (Fábregas *et al.* 1996).

Anabaena, constituye un género de cianobacteria fijadora de nitrógeno con importancia fisiológica y económica. Tal es el caso de *Anabaena* PCC 7120, de la cual se han descrito trabajos sobre cultivo mixotrófico con glucosa (Guo *et al.* 2000), tolerancia a la salinidad (Rai y Tiwari 1999) y producción de sulfolípidos en relación a la irradiancia (Archer *et al.* 1997). Asimismo, esta cepa se ha estudiado para evaluar el efecto del pH y CO₂ sobre la producción de pigmentos y exopolisacáridos (Morales *et al.* 2002), y el contenido de pigmentos y proteínas en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia (Loreto *et al.* 2003).

Sin embargo, no se tienen estudios sobre la producción de biomasa en cultivos semicontinuos. El objetivo de este trabajo es evaluar el crecimiento, contenido de pigmentos, y de proteínas de *Anabaena* PCC 7120 en función de la tasa de renovación en cultivos semicontinuos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMO SELECCIONADO

La cepa de *Anabaena* PCC 7120 se obtuvo de la colección de cianobacterias del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, España. Esta cepa se mantuvo en medio Algal (Fábregas *et al.* 1984).

CONDICIONES DEL CULTIVO

Los cultivos se llevaron a cabo en agua potable, no destilada, esterilizada y enriquecida con nutrientes inorgánicos (Fábregas *et al.* 1984), a una concentración de 8 mM NaNO₃. Los ensayos se realizaron en frascos de vidrio a un volumen de 200 mL, con aireación constante, a una temperatura de 30 ± 2°C, fotoperíodo 12h luz: 12h

oscuridad y una intensidad luminosa de $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ suministrada por lámparas fluorescentes. Los cultivos, por triplicado, se iniciaron a partir de un inóculo en fase exponencial a una DO_{750} de 0,08 correspondiente a una densidad celular de $5,0 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$.

RÉGIMEN SEMICONTINUO

Se aplicaron tasas de renovación diarias del 10, 20, 30, y 50% (v/v). El control correspondió a un cultivo discontinuo. El régimen semicontinuo se inició al término de 11 días de cultivo en que los tratamientos alcanzaron el final de la fase exponencial del sistema discontinuo. Este ensayo se mantuvo hasta alcanzar una densidad celular de estabilización durante 15 días.

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO

El crecimiento se determinó por la turbidez (DO_{750}) usando un espectrofotómetro Milton-Roy Spectronic 21D. La densidad celular se calculó mediante el recuento de alícuotas, mediante el uso de una cámara de Neubauer. Este recuento se realizó centrifugando una alícuota de 0,5 mL de los cultivos, a objeto de fragmentar los filamentos y homogeneizar la biomasa (Mundt *et al.* 2001).

DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS

El contenido de pigmentos se determinó a partir del extracto metanólico de la biomasa fresca colectada por centrifugación. Los extractos obtenidos se clarificaron por centrifugación y la concentración de clorofila *a* se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 665 nm y de acuerdo a el método de Marker (1972), mientras que los carotenoides se determinaron a partir del mismo extracto, midiendo la absorbancia a una longitud de onda a 480 nm según Britton (1985). La ficocianina se determinó según el método de choque osmótico y mediante espectrofotometría (Bennet y Bogorad 1973).

El contenido celular de pigmentos se expreso en pg cel^{-1} , mientras que el contenido por volumen se hizo en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los valores de productividad se expresaron en $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas totales se determinaron según el método de Lowry modificado por Herbert *et al.* (1971), y se empleó como estándar una disolución de seroalbúmina bovina (BSA) de 1 mg mL^{-1} . El contenido de proteínas por célula se expresó en pg cel^{-1} , mientras que el contenido volumétrico se realizó en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los valores de productividad se expresaron en $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados obtenidos se expresaron como los promedios \pm desviación estándar de los triplicados de cada tratamiento. Los valores de pigmentos y proteínas, en fase estacionaria, se compararon mediante el Análisis de la Varianza de una vía y se utilizó el programa StaMost for Windows versión 3,0. Se aplicó la prueba de Rangos Múltiples de Scheffe a un nivel de significancia del 99% (Loreto *et al.* 2003).

RESULTADOS

CRECIMIENTO

La densidad celular disminuyó con la tasa de renovación. Los mayores valores se obtuvieron en los cultivos renovados al 10% ($134,32 \pm 31,03 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$), con diferencias significativas ($p < 0,05$) (Fig. 1). La curva de crecimiento indicó que los cultivos renovados al 10% se estabilizaron a los 11 días del cultivo, mientras que en el tratamiento al 20%, se registró a partir del día 21 (Fig. 2).

La aplicación de la tasa de renovación al 50% produjo un efecto de lavado a los 21 días de iniciado el ensayo, lo cual originó un descenso de la densidad celular hasta de un 95% (Fig. 2).

El control, correspondiente a un cultivo discontinuo, exhibió una fase estacionaria prolongada hasta el día 27 (Fig. 2), con una densidad celular promedio de $116,50 \pm 35,58 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ (Fig. 1). Sin embargo, este valor fue inferior al encontrado en el cultivo renovado al 10% ($134,32 \pm 31,03 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$), con diferencias signifi-

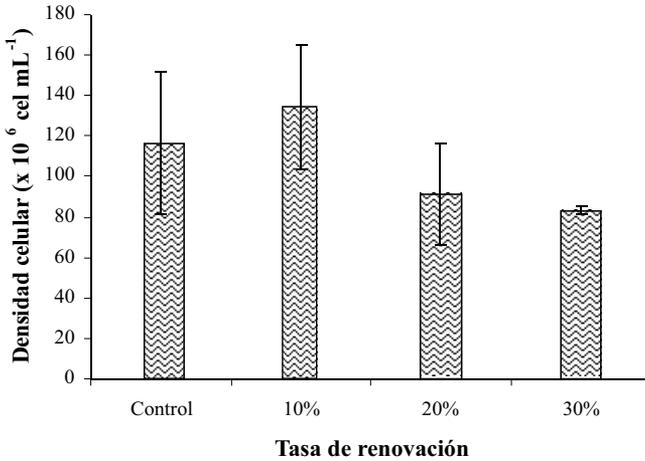


FIGURA 1. Valores promedio de Densidad celular (1×10^6 cel mL⁻¹) de *Anabaena* PCC 7120 en cultivos semicontinuos y a diferentes tasas de renovación.

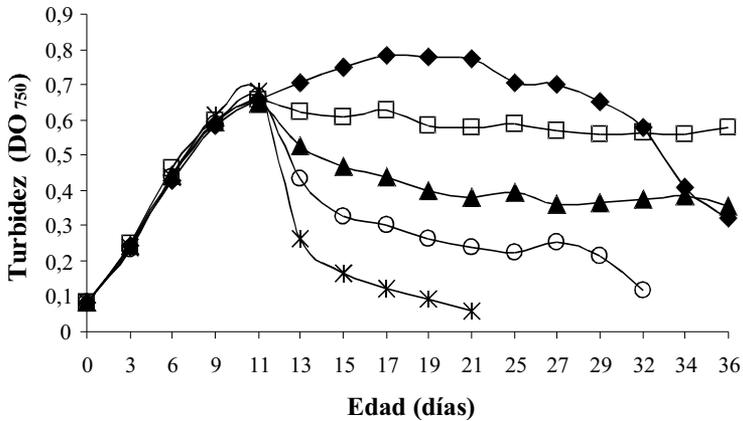


FIGURA 2. Curva de crecimiento por turbidez (DO_{750}) de *Anabaena* PCC 7120 en cultivos semicontinuos y a diferentes tasa de renovación.

cativas ($p < 0,05$). La mayor productividad celular se obtuvo al 30% con $25,10 \times 10^9$ cel L⁻¹ d⁻¹, seguida por la obtenida al 20% y 10% con $18,20$ y $13,43 \times 10^9$ cel L⁻¹ d⁻¹, respectivamente (Tabla 1).

TABLA 1. Productividad celular (1×10^9 cel $L^{-1} d^{-1}$), de pigmentos y de proteínas ($mg L^{-1} d^{-1}$) de *Anabaena* PCC 7120 y a diferentes tasa de renovación (%).

Tasa de renovación	Celular	Clorofila a	Ficocianina	Proteínas
10%	13,43	$0,91 \pm 0,16$	$11,29 \pm 1,87$	$71,46 \pm 5,26$
20%	18,20	$1,03 \pm 0,23$	$9,93 \pm 1,00$	$79,68 \pm 4,11$
30%	25,10	$0,83 \pm 0,29$	$11,52 \pm 1,43$	ND

ND: No determinado.

PIGMENTOS

Se registró al final de la fase exponencial, y antes de la aplicación de la tasa de renovación el mayor contenido de ficocianina y de clorofila *a*, con $216,39 \pm 11,74$ y $21,62 \pm 1,02 \mu g mL^{-1}$ respectivamente. Una vez aplicada la tasa de renovación, se encontró que la estabilización del contenido de pigmentos se inició a partir del segundo día para los renovados al 10% y a partir del décimo día para los renovados al 20 y 30% (Figs. 3 y 4).

Los valores más altos de clorofila *a* y ficocianina se produjeron a la tasa de renovación del 10%, con $18,89 \pm 1,36$ y $184,02 \pm 12,95 \mu g mL^{-1}$, respectivamente con diferencias significativas ($p < 0,05$). Mientras que a la tasa de renovación del 30%, se obtuvieron los valores más bajos con $7,07 \pm 1,04$ y $71,84 \pm 11,66 \mu g mL^{-1}$, respectivamente (Tabla 2).

El contenido celular de pigmentos, mostró un ligero incremento en la tasa de renovación del 20%, mientras que el cultivo control no varió en comparación con el correspondiente a los cultivos semicontinuos (Tabla 3). Sin embargo, sí se observó variación en cuanto al contenido de pigmento por unidad de volumen, el cual disminuyó con la edad del cultivo (Figs. 3 y 4).

La productividad de clorofila a la tasa de renovación del 20% resultó ser la más elevada ($1,03 \pm 0,23 mg L^{-1} d^{-1}$), con diferencias significativas ($p < 0,01$) respecto a la obtenida al 30%. En cambio, la

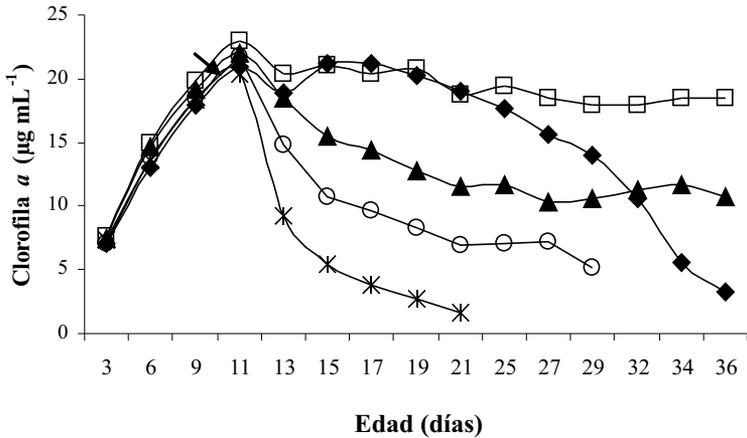


FIGURA 3. Contenido de clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de *Anabaena* PCC 7120 a diferentes tasas de renovación (%).

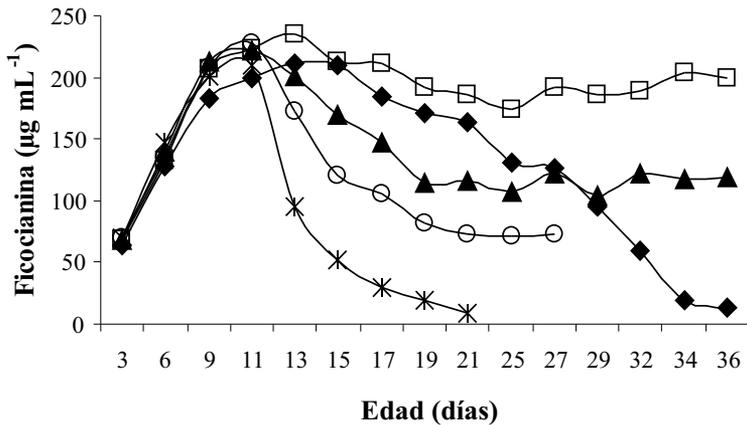


FIGURA 4. Contenido de ficocianina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de *Anabaena* PCC 7120 a diferentes tasas de renovación.

más elevada de ficocianina se produjo al 30 y 10%, con $11,52 \pm 1,87$ y $11,29 \pm 1,87 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Ambas con diferencia significativa ($p < 0,01$) en relación a la obtenida al 20%, de $9,93 \pm 1,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Tabla 1).

TABLA 2. Contenido de clorofila a, ficocianina, carotenoides y proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de *Anabaena* PCC 7120 en cultivos semicontinuos y a diferentes tasa de renovación (%).

Cultivo	Clorofila a	Ficocianina	Carotenoides	Proteínas
Control	17,43 \pm 3,14	140,45 \pm 37,93	5,48 \pm 0,61	156,99 \pm 9,42
10%	18,89 \pm 1,36	184,02 \pm 12,95	4,38 \pm 0,62	752,05 \pm 36,92
20%	11,23 \pm 1,11	115,42 \pm 14,74	2,87 \pm 0,35	443,91 \pm 31,93
30%	7,07 \pm 1,04	71,84 \pm 11,66	1,92 \pm 0,31	ND

Control: cultivo discontinuo, con valores de pigmentos correspondientes a la edad de cultivo entre 21 y 27 días. Valores de proteínas del día 32. ND: No determinado.

TABLA 3. Contenido celular de clorofila a, ficocianina, carotenoides y proteínas (pg cel^{-1}) de *Anabaena* PCC 7120 en cultivos semicontinuos y a diferentes tasa de renovación (%).

Cultivo	Clorofila a	Ficocianina	Carotenoides	Proteínas
Control	0,16 \pm 0,03	1,19 \pm 0,28	0,05 \pm 0,002	3,43 \pm 0,20
10%	0,10 \pm 0,01	0,98 \pm 0,07	0,03 \pm 0,002	6,64 \pm 0,32
20%	0,12 \pm 0,01	1,14 \pm 0,22	0,03 \pm 0,002	3,66 \pm 1,31
30%	0,10 \pm 0,02	1,06 \pm 0,31	0,03 \pm 0,005	ND

Control: cultivo discontinuo. ND: No determinado.

PROTEÍNAS

Las proteínas se determinaron solo a las tasas de renovación del 10 y 20% debido a las mayores densidades de estabilización obtenidas por la cianobacteria, exhibiendo valores de $714,62 \pm 52,62$ y $398,38 \pm 20,55 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabla 2); y el ensayo control disminuyó con la edad de cultivo. Cabe destacar, que para el día 19 se encontró un valor de $884,28 \pm 61,60 \mu\text{g mL}^{-1}$, y para el día 32 fue de $156,99 \pm 9,42 \mu\text{g mL}^{-1}$. La mayor productividad se obtuvo a la tasa de renovación del 20%, con un valor de $79,68 \pm 4,11 \text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, con diferencias significativas ($p < 0,01$) respecto a la tasa del 10% (Tabla 1).

DISCUSIÓN

El presente estudio permitió demostrar la capacidad de *Anabaena* PCC 7120 en mantener una producción diaria de biomasa en cultivos semicontinuos. En cambio, en los cultivos discontinuos a pesar de presentarse una fase estacionaria estable, se determinó un descenso progresivo de los pigmentos y proteínas con la edad del cultivo. En los cultivos semicontinuos, el ingreso de nutrientes favorece el mantenimiento de células en condiciones fisiológicas similares a las correspondientes en fase exponencial, con lo cual se alcanza una estabilización en cuanto a la producción de biomasa (Fábregas *et al.* 1995).

Anabaena PCC 7120 produjo un alto rendimiento en la producción de biomasa hasta la tasa de renovación del 30%. No obstante, se encontró un efecto de lavado en los cultivos renovados al 50%. Esto podría ser consecuencia de una baja velocidad de crecimiento, en relación a su capacidad para regenerar la población de células cada 24 horas. De acuerdo a estos resultados, probablemente la cianobacteria necesitaría un mayor tiempo para alcanzar un crecimiento estabilizado a la tasa de renovación del 50%. Se ha reportado en *Limnothrix redekei* una producción sostenida de biomasa cada tres días a una tasa de renovación del 20% (Mundt *et al.* 2001).

La mayor densidad celular de estabilización obtenida a la tasa de renovación mas baja del 10%, y la mayor productividad celular registrada a la más elevada tasa de renovación del 30%, coincide también con los resultados descritos para *Phaeodactylum tricorutum* y *Porphyridium cruentum* (Fábregas *et al.* 1996, 1998). En estas microalgas se ha demostrado que a medida que incrementa la tasa de renovación disminuye la densidad celular, contenido de pigmentos y de proteínas; mientras que la productividad celular se incrementa con la tasa de renovación, esto se debe al aumento en número de células, es directamente proporcional al volumen de cultivo retirado cada día.

La disminución del contenido celular de clorofila *a* a la tasa de renovación obtenida en el presente estudio, se ha descrito en cultivos semicontinuos en microalgas (García 1998). Es decir, a medida que aumenta el volumen de cultivo reemplazado, se produce una dismi-

nución de la población de células, y por lo tanto un incremento de la disponibilidad de luz, lo cual aumenta el flujo de fotones. De tal manera que, las células requieren menos pigmentos para optimizar la tasa fotosintética (Fábregas *et al.* 1998).

La disminución de pigmentos en el cultivo control discontinuo se relacionó con la limitación de nutrientes que tiene lugar en fase estacionaria. Tal es el caso de la ficocianina, que actúa como reserva de nitrógeno para mantener la actividad metabólica de las células (Liotenberg *et al.* 1996). En cambio, en los cultivos semicontinuos, el ingreso de nutrientes durante la aplicación de la tasa de renovación, permite una producción sostenida de esta proteína y de la clorofila. De tal manera que, se confirma la utilidad de mantener una producción diaria de biomasa de la cianobacteria, en comparación a la baja eficiencia de producción de los cultivos discontinuos.

El descenso del contenido celular de proteínas, con la tasa de renovación obtenido en *Anabaena* PCC 7120 en condiciones saturantes de nitrógeno, también se ha descrito para *Nannochloropsis gadihana* (Maseda 2002). Sin embargo, en términos de productividad, la extracción de un mayor volumen de cultivo al 20% contribuye en gran medida a incrementar la producción diaria de proteínas respecto a la tasa del 10%.

RECOMENDACIONES

Utilizar una tasa de renovación del 20 y 30% para cosechar diariamente biomasa enriquecida con clorofila *a*, ficocianina y proteínas de *Anabaena* PCC 7120.

CONCLUSIONES

La cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 se puede utilizar para la producción diaria de proteínas, ficocianina y clorofila *a* en relación a la tasa de renovación en cultivos semicontinuos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al FONACIT-Venezuela por brindar el apoyo financiero parcial para el desarrollo de esta investigación a través del proyecto S1-2000000786.

LITERATURA CITADA

- APT K. y P. BEHRENS. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol.* 35: 215-226.
- ARCHER S., K. MCDONALD y A. JACKMAN. 1997. Effect of irradiance on the production of sulfolipids from *Anabaena* PCC 7120 in a fed-batch photobioreactor. *Appl. Biochem. Biotech.* 67: 15-28.
- BENNET A. y L. BOGORAD. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58: 419-435.
- BRITTON G. 1985. General carotenoids methods. *Methods in Enzymology* 111: 113-158.
- FÁBREGAS J., J. ABALDE, C. HERRERO, B. CABEZAS y M. VEIGA. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrients concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
- FÁBREGAS J., M. PATIÑO, B. ARREDONDO, J. TOBAR y A. OTERO. 1995. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 44: 287-292.
- FÁBREGAS J., M. PATIÑO, E. MORALES, B. CORDERO y A. OTERO. 1996. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum* in semicontinuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 266-268.
- FÁBREGAS J., D. GARCÍA, E. MORALES, A. DOMÍNGUEZ y A. OTERO. 1998. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga

Porphyridium cruentum modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. J. Ferment. Bioeng. 86: 463-467.

- GARCÍA D. 1998. Productos biotecnológicos de microalgas marinas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España. 181 pp.
- GUO Y., X. XIAO-FENG y C. ZHAO-LING. 2000. Mixotrophic culture of *Anabaena* sp. PCC 7120. Chinese J. Proc. Engin. 21: 57-62.
- HERBERT D., P. PHIPPS y R. STRANGE. 1971. Chemical analysis of microbial cells. En: Norris J. y D. Ribbons (Eds) Methods in Microbiology vol 5 B. Academic Press, London, 209-344 pp.
- LIOTENBERG S., D. CAMPBELL, R. RIPPKA, J. HOUMARD y N. TANDEAU DE MARSAC. 1996. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. Microbiology 142: 611-622.
- LORETO C., N. ROSALES, J. BERMÚDEZ y E. MORALES. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. Gayana Botánica. En prensa.
- MARKER A. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. Freshwater Biology 2: 361-385.
- MASEDA A. 2002. La luz modifica la productividad, la composición y el proteoma de microalgas del género *Nannochloropsis*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. España. 326 pp.
- MORALES E., M. RODRÍGUEZ, D. GARCÍA, C. LORETO y E. MARCO. 2002. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en función del pH y CO₂. Interciencia 27: 373-378.
- MORENO J., A. VARGAS, H. OLIVARES, J. RIVAS y M. GUERRERO. 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* ATCC 33047 in batch and continuous culture. J. Biotechnol. 60: 175-182.

- MUNDT S., S. KREITLOW, A. NOWOTNY y U. EFFMERT. 2001. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203: 327-334.
- RAI A. y S. TIWARI. 1999. NO₃-nutrition and salt tolerance in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 and mutant strains. *J. Appl. Microbiol.* 86: 991-998.