



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EFEECTO DE LA DEFICIENCIA DE NITRÓGENO Y LA
RADIACIÓN UV EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA
Y EN LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE LAS
CIANOBACTERIAS *Spirulina (Arthrospira) maxima* y
Phormidium persicinum.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Fredy Hernández Uribe

La Paz, Baja California Sur, febrero del 2016

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 8 horas del día 22 del mes de febrero del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en la actividad fotosintética y en los compuestos antioxidantes de las cianobacterias *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum*"

Presentada por el alumno:

Fredy Hernández Uribe

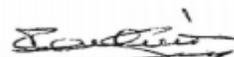
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



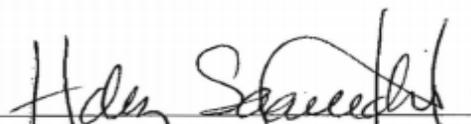
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Director de Tesis



Dra. Tania Zenteno Savín
Co-Tutor



Dr. Félix Diego Lopez Figueroa
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega	Directora de tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Tania Zenteno Savín	Co-Tutora	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Félix Diego López Figueroa	Co-Tutor	Universidad de Málaga

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dra. Tania Zenteno Savín

Dr. Félix Diego López Figueroa

JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dra. Tania Zenteno Savín

Dr. Félix Diego López Figueroa

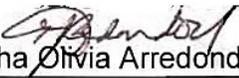
SUPLENTE

Dra. Maria de Lourdes Morquecho Escamilla

RESUMEN EN ESPAÑOL

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos que en condiciones de estrés incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). La presencia de compuestos antioxidantes, indica que poseen mecanismos eficientes de protección. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en las cianobacterias *Spirulina (Arthrospira) maxima* (*Smax*) y *Phormidium persicinum* (*Php*). Las cianobacterias se mantuvieron en cultivo batch en condiciones de laboratorio con los siguientes tratamientos: +N+PAR (control), -N+PAR, +N+PAR+UVR y -N+PAR+UVR. Los parámetros fotosintéticos se determinaron a través de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* del FSII, midiendo el rendimiento cuántico efectivo *in situ* $Y(II)$, rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm), eficiencia fotosintética (α), tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}), irradiancia de saturación (E_k) e irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}). Se cuantificó la capacidad antioxidante total, la tasa de producción endógena de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), crecimiento celular, la actividad antioxidante enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa total (POX), y la concentración de lipoperoxidos (TBARS), proteínas, carbohidratos, lípidos, clorofila *a*, carotenoides totales, ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina), compuestos fenólicos totales, ácidos grasos y vitaminas C y E. En *Smax* la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV provocaron (1) disminución en el crecimiento celular, eficiencia fotosintética, contenido de clorofila *a*, producción endógena de $O_2^{\bullet-}$, capacidad antioxidante total, ficobiliproteínas, carotenoides totales, compuestos fenólicos totales, proteínas, lípidos y ácidos grasos (saturados, monoinsaturados, biinsaturados y poliinsaturados), (2) aumento en TBARS, actividad enzimática (SOD, CAT y POX) y contenido de carbohidratos y (3) no hubo efecto sobre el contenido de vitaminas (C y E). En *Php* se encontró (1) disminución en el crecimiento celular, eficiencia fotosintética, capacidad antioxidante total, concentración de ficobiliproteínas, compuestos fenólicos totales y ácidos grasos biinsaturados, (2) aumento de TBARS, producción endógena de $O_2^{\bullet-}$, actividad enzimática (SOD, CAT y POX), concentración de vitaminas (C y E), carotenoides totales, lípidos, ácidos grasos saturados y poliinsaturados, y (3) no hubo efecto en el contenido de clorofila *a*, contenido de proteínas, carbohidratos y ácidos grasos monoinsaturados. Los resultados de este estudio, indican que la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV disminuyeron la capacidad antioxidante y la actividad fotosintética de *Smax* y *Php*, provocando cambios en el metabolismo primario y secundario, lo que se vio reflejado en los cambios de concentración de los metabolitos analizados.

Palabras clave: actividad fotosintética, antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, cianobacterias, fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a*.

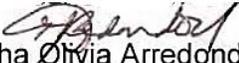

 Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

 Vo.Bo.

RESUMEN EN INGLES

Cyanobacteria are photosynthetic organisms that under stress conditions increase reactive oxygen species (ROS) production. The presence of antioxidant compounds with capacity indicates that the cyanobacteria have efficient protection mechanisms. The study aims to evaluate nitrogen deficiency and UV radiation effect on the cyanobacteria *Spirulina (Arthrospira) maxima (Smax)* and *Phormidium persicinum (Php)*. The cyanobacteria were maintained in batch culture under laboratory conditions with the following treatments +N+PAR (control), -N+PAR, +N+PAR+UVR and -N+PAR+UVR. The photosynthetic parameters were determined by *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of PSII, measuring *in situ* effective quantum yield $Y(II)$, optimum quantum yield (Fv/Fm), photosynthetic efficiency (α), maximum electrons transport rate (ETR_{max}), saturation irradiance (E_k) and photoinhibition irradiance (E_{opt}). The total antioxidant capacity, endogenous production rate of superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), cell growth, enzymatic activities of dismutase superoxide (SOD), catalase (CAT) and total peroxidase (POX), and concentrations of lipid peroxides (TBARS), proteins, carbohydrates, lipids, chlorophyll *a*, total carotenes, phycobiliproteins (phycoerythrin phycocyanin and allophycocyanin), total phenolic compounds, fatty acids, vitamin C and E were quantified. In *Smax* nitrogen deficiency and UV radiation induced (1) a decrease in cell growth, photosynthetic efficiency, chlorophyll *a*, endogenous $O_2^{\bullet-}$ production rate, total antioxidant capacity, concentration of phycobiliproteins, total carotenes, total phenolic compounds, proteins, lipids and fatty acids (saturated, monounsaturated, biunsaturated and polyunsaturated), (2) an increase of TBARS, enzymatic activities (SOD, CAT y POX) and concentration of carbohydrates, and (3) there was no effect on vitamin C and E content. In *Php* nitrogen deficiency and UV radiation induced (1) a decrease in cell growth, photosynthetic efficiency, total antioxidant capacity, concentration of phycobiliproteins, total phenolic compounds and biunsaturated fatty acids, (2) an increase of TBARS, endogenous $O_2^{\bullet-}$ production rate, enzymatic activities (SOD, CAT y POX), concentration of vitamins (C and E), total carotenes, lipids, saturated and polyunsaturated fatty acids, and (3) there was no effect on chlorophyll *a*, proteins, carbohydrates and monounsaturated fatty acid content. The results of this study, indicate that the nitrogen deficiency and UV radiation decreased the antioxidant capacity and photosynthetic activity of *Smax* and *Php*, causing changes in the primary and secondary metabolism, which was reflected as changes in concentration of the analyzed metabolites

Key words: photosynthetic activity, enzymatic and non-enzymatic antioxidants, cyanobacteria, Chlorophyll *a* fluorescence.


 Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
 Vo.Bo.

DEDICATORIA

*A mis padres Ageo y Heladía, a mis hermanos
Elizabeth, Rafael y Sergio.*

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), a la Dirección de Estudios de Posgrado, al Departamento de Control Escolar, al Departamento de Becas y Apoyo Estudiantil, al Laboratorio de Cómputo, al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, al Laboratorio de Estrés Oxidativo, al Grupo de Investigación “Fotobiología y Biotecnología de Organismos Acuáticos (FYBOA)” de la Universidad de Málaga, España por todo su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de maestría otorgada (565220). Al proyecto fiscal AC0.2: Productos de alto valor agregado a partir del cultivo de microalgas y cianobacterias. 913-0: Desarrollo e implementación de una tecnología innovadora y eficiente para la fabricación de gomitas formuladas con ingredientes funcionales.

Al comité Tutorial: Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, Dra. Tania Zenteno Savín y Dr. Félix Diego López Figueroa, por sus consejos, guía, orientación y paciencia los cuales me ayudaron a la realización de este proyecto.

A los técnicos de laboratorio Dra. Laura Carreón Palau e IBQ. Orlando Lugo Lugo por compartir sus conocimientos y por el asesoramiento técnico, pero sobre todo por su invaluable amistad. Al M. en C. Manuel Moreno Legorreta y a la M. en C. Araceli Cazarez Salazar por sus consejos en estadística.

A los compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas: Rosalinda, Araceli, Diana, Ana, Kyriam, Hamid; del Laboratorio de Estrés Oxidativo: Normita, Andrés y Aldo; Al grupo FYBOA: Carolina, Paula, Daniela, Paqui, Roberto, Félix, Fabián y David. Y a las mejores españolas del mundo: Candela y Miriam. Gracias por cada jornada de trabajo, palabra de aliento y momentos de diversión compartidos.

A mis compañeros de maestría: Mayra, Miriam, Paulina, Leandro y Asdrúbal por compartir conmigo el estrés, las noches de diversión y su amistad.

A mis padres Ageo y Heladia y a mis hermanos Elizabeth y Rafael por ser los pilares más grandes de mi vida que sin escatimar esfuerzos me han ayudado y a la distancia han estado presentes en cada día de mi vida, los amo.

A todos y cada uno por guiarme en el camino de la ciencia y de la vida. Por ser personas excepcionales que siempre daré gracias a dios por haberlos conocido y por la inmensa dicha de haber formado un lazo de amistad. Muchas gracias. LO HICIMOS.

Con cariño, respeto y admiración *Fredy Hernández Uribe*

CONTENIDO

RESUMEN EN ESPAÑOL	i
RESUMEN EN INGLÉS	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xx
ABREVIATURAS	xxi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Radicales libres y estrés oxidativo	3
2.2. Efecto de los radicales libres en las biomoléculas	6
2.2.1. Oxidación de lípidos	6
2.2.2. Oxidación de proteínas	6
2.2.3. Oxidación de carbohidratos	7
2.2.4. Oxidación de ácidos nucleicos	7
2.3. Compuestos antioxidantes.....	8
2.3.1. Clasificación y funciones de los compuestos antioxidantes.....	8
2.4. Factores que modifican la concentración de los compuestos antioxidantes	17
2.4.1. Nitrógeno	17
2.4.2. Radiación ultravioleta	18
2.4.2.1. Efectos de la radiación UV en las cianobacterias.....	19
2.4.2.2. Efectos de la radiación UV en el ADN	19
2.5. <i>Spirulina (Arthrospira) maxima</i>	20
2.5.1. Clasificación taxonómica	20
2.5.2. Ciclo de vida	21
2.5.3. Composición bioquímica.....	22
2.6. <i>Phormidium persicinum</i>	23
3. PREGUNTA CIENTÍFICA	25
4. HIPOTESIS	25
5. OBJETIVOS	26
5.1. Objetivo general.....	26

5.2. Objetivos específicos	26
6. JUSTIFICACIÓN	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1. Material biológico y condiciones de cultivo	28
7.2. Análisis	30
7.2.1. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico	30
7.2.2. Medida de la fotosíntesis por la fluorescencia <i>in vivo</i> de la clorofila <i>a</i> asociada al fotosistema II (FSII)	31
7.2.2.1. Rendimiento cuántico efectivo <i>in situ</i> Y(II).....	32
7.2.2.2. Curvas rápidas de luz (RLC)	33
7.2.2.2.1. Absorptancia (A)	34
7.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante total.....	35
7.2.4. Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes	36
7.2.4.1. Superóxido dismutasa (SOD, E.C.1.15.1.1)	36
7.2.4.2. Catalasa (CAT, E.C.1.11.1.6).....	38
7.2.4.3. Actividad de las enzimas peroxidasas totales (POX)	38
7.2.5. Determinación de la actividad antioxidante no enzimática	39
7.2.5.1. Determinación de carotenoides totales	39
7.2.5.2. Determinación de ficobiliproteínas	40
7.2.5.3. Determinación de vitamina C	40
7.2.5.4. Determinación de vitamina E.....	41
7.2.5.5. Determinación de compuestos fenólicos totales	42
7.2.6. Determinación de la condición fisiológica de las cianobacterias	43
7.2.6.1. Determinación de la producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	43
7.2.6.2. Determinación de lípidos totales	44
7.2.6.3. Determinación de ácidos grasos	45
7.2.6.4. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	47
7.2.7. Análisis estadísticos	48
8. RESULTADOS	49
8.1. Curvas de crecimiento	49
8.2. Rendimiento cuántico efectivo <i>in situ</i> Y(II)	55
8.3. Curvas rápidas de luz (RLC).....	58
8.3.1. Eficiencia fotosintética (α).....	58

8.3.2. Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m).....	60
8.3.3. Tasa de transporte de electrones máximo (ETR_{max})	61
8.3.5. Irradiancia de fotoinhibición (E_{opt})	64
8.4. Capacidad antioxidante total.....	66
8.5. Tasa de producción endógena de radical $O_2^{\bullet-}$	68
8.6. Actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y POX)	69
8.6.1. Superóxido dismutasa (SOD)	69
8.6.2. Catalasa (CAT)	71
8.6.3. Peroxidasas totales (POX)	73
8.7. Actividad antioxidante no enzimática	75
8.7.1. Carotenoides	75
8.7.2. Ficobiliproteínas.....	77
8.7.3. Compuestos fenólicos totales.....	80
8.7.4. Ácido ascórbico (Vitamina C)	82
8.7.5. α -Tocoferol (Vitamina E).....	82
8.8. Determinación de las condiciones fisiológicas y bioquímicas	83
8.8.1. Clorofila <i>a</i>	83
8.8.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	85
8.8.3. Lípidos totales	87
8.8.4. Ácidos grasos	89
8.8.5. Proteínas totales.....	94
8.8.6. Carbohidratos totales.....	95
8.9. Análisis de correlación de Pearson.....	103
9. DISCUSIÓN	105
9.1. Actividad fotosintética	105
9.2. Capacidad antioxidante total.....	110
9.3. Radical superóxido y enzimas antioxidantes	111
9.4. Antioxidantes no enzimáticos.....	113
9.4.1. Carotenoides	113
9.4.2. Ficobiliproteínas.....	115
9.4.3. Compuestos fenólicos totales.....	118
9.4.4. Vitamina C y E	119
9.5. Clorofila <i>a</i>	121

9.6. Lipoperoxidación (TBARS)	124
9.7. Lípidos totales.....	126
9.8. Ácidos grasos	128
9.9. Proteínas totales	132
9.10. Carbohidratos	135
9.11. Análisis de correlación entre variables.....	137
10. CONCLUSIONES	141
11. LITERATURA CITADA.....	143
ANEXOS.....	181

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y blancos. El oxígeno (O_2) lleva a la formación de ERO. En el fotosistema II (FSII), el oxígeno singulete (1O_2) es producido por entrada de energía al oxígeno por parte de la clorofila fotosensitizada. En el FSI la reducción univalente de O_2 usando electrones del FSII genera radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El $O_2^{\bullet-}$ es disociado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 por la superóxido dismutasa (SOD) y el H_2O_2 es reducido a agua por las catalasas y peroxidasas. (Modificado de Latifi *et al.*, 2009). 4
- Figura 2.** Un antioxidante es un donador de electrones que neutraliza o estabiliza a los radicales libres. 8
- Figura 3.** Sistema antioxidante. Las superóxidos dismutasas (SODs) son metaloproteínas que dismutan radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La catalasa (CAT) es una hemoproteína que cataliza la conversión de H_2O_2 a agua (H_2O) y oxígeno (O_2). La conversión de H_2O_2 a H_2O puede también ser catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx), un miembro de la familia de las selenoenzimas. (Tomada de Mishra *et al.*, 2009). 12
- Figura 4.** Red antioxidante que muestra la interacción entre las vitaminas E, C y glutatión. ROOH, hidroperóxido orgánico; ROH, alcohol; ROO^{\bullet} , radical peroxilo; RO^{\bullet} , radical alcoxilo; PUFA ácidos grasos poliinsaturados; $O_2^{\bullet-}$ radical superóxido; UVA ultravioleta tipo A, UVB, ultravioleta tipo B; NAD(P)H, nicotinamida adenina difosfato oxidado; NAD(P)⁺, nicotinamida adenina difosfato reducido; H⁺, protón, GSH, glutatión; TRX, tioredoxina. (Modificado de Parcker *et al.*, 2001). 13
- Figura 5.** Organización de las ficobiliproteínas en estructuras celulares, llamadas ficobilisomas. Modificada de <http://www.plantasyhongos.es> 17
- Figura 6.** Efectos de la radiación ultravioleta sobre las cianobacterias y principales estrategias de mitigación. (Modificado de Shailendra *et al.*, 2010). 19
- Figura 7.** Ciclo de vida de *Spirulina* (*Arthrospira*) maxima (Tomado de Sánchez *et al.*, 2003b). 22

- Figura 8.** Visión general del proceso fotosintético. La luz absorbida en forma de energía es usada fotoquímicamente durante las reacciones luminosas. El exceso de energía que no entra a formar parte de la vía fotoquímica, es reemitida como calor o fluorescencia. Para medir la fluorescencia como proceso involucrado en la fotosíntesis, se hace uso de los fluorómetros de amplitud modulada (PAMs)(Tomada de Gil-Jerez C. 2015). 31
- Figura 9.** Método del pulso de saturación. Bajo la luz de medida (ML), se mide F_0 . Después de aplicar un pulso de luz de saturación (SP), se alcanza la máxima fluorescencia (F_m). Más tarde, las muestras se iluminan con luz actínica y se someten a una serie de pulsos de saturación para alcanzar el estado estacionario (F_t) y la fluorescencia máxima (F_m'). Por último, la luz actínica se apaga para medir la fluorescencia mínima después de la iluminación (F_0')..... 32
- Figura 10.** Detalle de los parámetros fotosintéticos en una curva ETR ajustado de acuerdo a Eilers y Peters (1988) a distintas irradiancias PAR. La fotosíntesis aumenta a medida que la irradiancia es mayor, hasta alcanzar el punto de la fotosaturación ($I_s = E_k$), donde la tasa fotosintética es máxima (ETR_{max}) y posteriormente se produce la fotoinhibición ($I_h = E_{opt}$). Podemos obtener parámetros fotosintéticos como la eficiencia fotosintética (α) y la irradiancia de saturación (E_k)..... 34
- Figura 11.** Mediciones de absorptancia (A) con sensor LICOR 192 SB 35
- Figura 12.** Fundamento para la determinación de SOD: el sistema xantina/xantina oxidasa produce el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El $O_2^{\bullet-}$ entra en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce y genera formazán, cuyo cambio puede ser detectado por espectrofotometría cuando la SOD inhibe la reducción del NBT. (Modificado de www.dojindo.com). 37
- Figura 13.** Curva de crecimiento de *Phormidium persicinum* por peso de biomasa total expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada punto representa el valor promedio de réplicas independientes; las barras de dispersión indican desviación estándar. 49
- Figura 14.** Curva de crecimiento de *Spirulina (Arthrospira) maxima* por peso de biomasa total expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada punto representa el valor promedio de réplicas independientes; las barras de dispersión indican desviación estándar. 50

- Figura 15.** Cultivos de *Phormidium persicinum* en medio F/2 en el control (+N+PAR). A) Inicio (T0) y B) Cosecha (T7). 51
- Figura 16.** Cultivos de *Spirulina (Arthrospira) maxima* en medio Jourdan en el control (+N+PAR). A) Inicio (T0) y B) Cosecha (T7)..... 51
- Figura 17.** Cosecha de la biomasa de *Spirulina (Arthrospira) maxima* con la utilización de tamices. 52
- Figura 18.** Curva de crecimiento de *Spirulina (Arthrospira) maxima* en deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada punto representa el valor promedio de réplicas independientes; las barras de dispersión indican desviación estándar. 53
- Figura 19.** Cultivos de *Phormidium persicinum* en medio F/2. A) A las 28 horas de edad de cultivo en el control (+N+PAR). B) 28 horas de cultivo en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). C) 7 días de cultivo en el control (+N+PAR). 53
- Figura 20.** Cultivos de *Spirulina (Arthrospira) maxima* en medio Jourdan. A) Al inicio del cultivo, T0 en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). B) Cultivo a T6 en deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). C) Cultivo a T7 en el control (+N+PAR). 54
- Figura 21.** Rendimiento cuántico efectivo *in situ* de *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 56
- Figura 22.** Rendimiento cuántico efectivo *in situ* en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 57
- Figura 23.** Rendimiento cuántico efectivo *in situ* en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes representan indican significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 57

- Figura 24.** Eficiencia fotosintética (α) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 59
- Figura 25.** Eficiencia fotosintética (α) en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 59
- Figura 26.** Eficiencia fotosintética (α) *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 60
- Figura 27.** Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 60
- Figura 28.** Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 61
- Figura 29.** Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 61
- Figura 30.** Tasa de transporte de electrones máximo (ETR_{max}) expresado en $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 62

- Figura 31.** Tasa de transporte de electrones máximo (ETR_{max}) expresado en $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 62
- Figura 32.** Tasa de transporte de electrones máximo (ETR_{max}) expresado en $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UV). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 62
- Figura 33.** Irradiancia de saturación (E_k) expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 63
- Figura 34.** Irradiancia de saturación (E_k) expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 64
- Figura 35.** Irradiancia de saturación (E_k) expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 64
- Figura 36.** Irradiancia de fotoinhibición expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 65
- Figura 37.** Irradiancia de fotoinhibición expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación

- estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student)..... 65
- Figura 38.** Irradiancia de fotoinhibición expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 66
- Figura 39.** Capacidad antioxidante total expresada en μM de *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 67
- Figura 40.** Capacidad antioxidante total expresada en μM de *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 67
- Figura 41.** Tasa de producción endógena de radical superóxido en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores están expresados en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 68
- Figura 42.** Tasa de producción endógena de radical superóxido en *Phormidium persicinum*. Los valores están expresados en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 69
- Figura 43.** Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores son expresados en unidades de SOD $\text{mg}^{-1} \text{proteína}$. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y IV) deficiencia de nitrógeno con UV

(-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 70

Figura 44. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en unidades de SOD mg^{-1} proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 71

Figura 45. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores son expresados en unidades de CAT mg^{-1} proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 72

Figura 46. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en unidades de CAT mg^{-1} proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 73

Figura 47. Actividad de las enzimas peroxidasas totales (POX) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores son expresados en unidades de POX mg^{-1} proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 74

Figura 48. Actividad de las enzima peroxidasas totales (POX) en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en unidades de POX mg^{-1} proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UV). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).
 75

- Figura 49.** Contenido de carotenoides en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher)..... 76
- Figura 50.** Contenido de carotenoides en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), II) deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher)..... 76
- Figura 51.** Contenido de 1) ficocianina, 2) aloficocianina, 3) ficoeritrina y 4) ficobiliproteínas totales en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. I) Control (+N+PAR), II) deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), III) nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y IV) deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 77
- Figura 52.** Contenido de 1) ficoeritrina, 2) aloficocianina, 3) ficocianina y 4) ficobiliproteínas totales en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. I) Control (+N+PAR), II) deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), III) Control con UV (+N+PAR+UVR) y IV) deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher)..... 78
- Figura 53.** Contenido de compuestos fenólicos totales en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 80

- Figura 54.** Contenido de compuestos fenólicos totales en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 81
- Figura 55.** Contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en 1) *Spirulina (Arthrospira) maxima* y 2) *Phormidium persicinum*. Datos expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR) y deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 82
- Figura 56.** Contenido de α -tocoferol (vitamina E) en 1) *Spirulina (Arthrospira) maxima* y 2) *Phormidium persicinum*. Datos expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR) y deficiencia de nitrógeno (+N+PAR). ND = por debajo del límite de detección). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student). 83
- Figura 57.** Contenido de clorofila *a* expresado en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 84
- Figura 58.** Contenido de clorofila *a* expresado en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 85
- Figura 59.** Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en nmol mg^{-1} proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación

- estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 86
- Figura 60.** Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en nmol mg^{-1} proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 87
- Figura 61.** Contenido de lípidos totales en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 88
- Figura 62.** Contenido de lípidos totales en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 88
- Figura 63.** Grupo de ácidos grasos en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores son expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 90
- Figura 64.** Grupo de ácidos grasos en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 91
- Figura 65.** Contenido de proteínas totales en *Spirulina (Arthrospira) máxima*. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV

(+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 94

Figura 66. Contenido de proteínas totales en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 95

Figura 67. Contenido de carbohidratos totales en *Spirulina (Arthrospira) máxima*. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 96

Figura 68. Contenido de carbohidratos totales en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). 96

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Principales especies reactivas de oxígeno (ERO) (Modificada de Beckman <i>et al.</i> , 1993).	5
Tabla II. Clasificación taxonómica de <i>Spirulina (Arthrospira) maxima</i>	21
Tabla III. Clasificación taxonómica de <i>Phormidium persicinum</i>	24
Tabla IV. Peso de la biomasa total $\mu\text{g mL}^{-1}$ de <i>Spirulina (Arthrospira) maxima</i> y <i>Phormidium persicinum</i> cultivadas en condiciones control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR).....	58
Tabla V. Perfil de ácidos grasos de <i>Spirulina (Arthrospira) maxima</i>	92
Tabla VI. Perfil de ácidos grasos de <i>Phormidium persicinum</i>	93
Tabla VII. Resumen de resultados de las variables analizadas por tratamiento probado en <i>Spirulina (Arthrospira) maxima</i> . Los valores más elevados se muestran en negritas.....	97
Tabla VIII. Resumen de resultados de las variables analizadas por tratamiento probado en <i>Phormidium persicinum</i> . Los valores más elevados se muestran en negritas.....	100

ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
A	Absorptancia
ADN	Ácido desoxiribonucléico
APx	Ascorbato peroxidasas
CAT	Catalasa
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
Da	Daltons
DPPH	2,2-difenil-2-picril-hidracil
E	Irradiancia fotosintéticamente activa incidente
<i>Ek</i>	Irradiancia de saturación
<i>Eo</i>	Irradiancia del medio de cultivo
<i>Eopt</i>	Irradiancia de fotoinhibición
ERO	Especies reactivas de oxígeno
<i>Et</i>	Irradiancia del cultivo
<i>ETRmax</i>	Tasa de transporte de electrones máximo
FII	Fracción de clorofila asociada al fotosistema II
<i>Fm</i>	Fluorescencia máxima de los centros de reacción totalmente reducidos
<i>Fo</i>	Fluorescencia basal de los centros de reacción totalmente oxidados
<i>Fv/Fm</i>	Rendimiento cuántico máximo
GPx	Glutación peroxidasas

GR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO•	Radical hidroxilo
HO ₂ •	Radical hidroperoxilo
HOCl	Ácido hipocloroso
MDA	Malondialdehido
MDHA	Monodehidroascorbato
NADPH	Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducido
NiR	Nitrito reductasa
NO•	Óxido nítrico
NR	Nitrato reductasa
O ₂	Oxígeno
O ₂ • ⁻	Radical superóxido
O ₃	Ozono
ONOO ⁻	Peroxinitrilo
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
FSII	Fotosistema II
Radiación UV	Radiación ultravioleta tipo A y B
RLC	Curvas rápidas de Luz
RO•	Radical alcoxilo
RO ₂ •	Radical peroxilo
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

TRX	Tioredoxina
UTEX	Colección algas de la Universidad de Texas
UV-A	Radiación ultravioleta tipo A
UV-B	Radiación ultravioleta tipo B
Y(II)	Rendimiento cuántico efectivo <i>in situ</i>
α	Eficiencia fotosintética

1. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son microorganismos que producen oxígeno por fotosíntesis y que contienen moléculas con capacidad antioxidante. Bajo condiciones de estrés como deficiencia de nitrógeno y alta intensidad lumínica, incrementan la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO). La resistencia frente a las ERO se basa en la acción protectora del sistema enzimático. Éste incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasas (GPx), glutatión reductasa (GR), ascorbato peroxidasas (APX). También existen antioxidantes no enzimáticos como carotenoides, α -tocoferol (vitamina E), ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) y glutatión (GSH) (Polle, 1996). Los antioxidantes son esenciales para el mantenimiento de la actividad fotosintética y de otras funciones metabólicas (Allen, 1997; Asada y Takahashi, 1987; Eltsner, 1982; Halliwell, 1982).

En la literatura se encuentran numerosas investigaciones enfocadas en la identificación de fuentes de compuestos antioxidantes, por ejemplo plantas, algas (macro y microalgas) y cianobacterias, así como métodos de extracción, estrategias para incrementar el contenido de éstos y enfocarlos a la producción biotecnológica de nutraceuticos. Se han descrito factores como el incremento de temperatura, alta irradiancia solar, deficiencia de nitrógeno, entre otros, que inducen la producción de antioxidantes en cianobacterias (Torabinejad y Caldwell, 2000; Frohnmayer y Staiger, 2003; Dinkova-Kostova, 2008). Entre las ventajas de cultivar cianobacterias con respecto a otros organismos, es que éstas presentan altas tasas de crecimiento, pueden crecer en ambientes salinos, dulceacuícolas, salobres, nieve, no necesitan grandes extensiones de suelo para ser cultivados además de que pueden utilizarse suelos desérticos.

Se reconoce la importancia de distintas especies de cianobacterias como fuente natural de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, tales como los ácidos grasos poliinsaturados de las familias ω -3 y ω -6 (Cohen y Vonshak, 1991;

Cohen y Khozin-Goldberg, 2005), antioxidantes tipo β -caroteno (Borowitzka, 2005), vitamina E (Chao *et al.*, 2002; Carballo-Cárdenas *et al.*, 2003; Durmaz, 2007), antioxidantes hidrosolubles como la vitamina C (Ledezma-Gairaud, 2004), complejo de ficobiliproteínas (ficocianina y ficoeritrina) (González *et al.*, 1999, Niu *et al.*, 2007; Marin-Prida *et al.*, 2015), o de compuestos bioactivos utilizados con otros propósitos, por ejemplo los polisacáridos sulfatados como antivirales y esteroides como antimicrobianos (Borowitzka, 1988b; Kanekiyo *et al.*, 2005; Wase y Wright, 2011; Senhorinho *et al.*, 2015).

Aunque para la variedad tan extensa que hay de estos organismos, son pocos los estudios donde se lleve a cabo una caracterización exhaustiva de la composición de las distintas especies, la posibilidad de extraer compuestos bioactivos es una realidad. Basado en lo anterior, el presente trabajo se enfocó a evaluar el efecto de dos condiciones de estrés, la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en los cultivos de las cianobacterias *Spirulina (Arthrospira) maxima (Smax)* y *Phormidium persicinum (Php)* y su respuesta en la producción de antioxidantes, composición bioquímica y actividad fotosintética.

2. ANTECEDENTES

2.1. Radicales libres y estrés oxidativo

El origen de la vida en la tierra inició con una atmósfera reducida (Dietrich *et al.*, 2006). La atmósfera llegó a ser oxidante mediante la producción de oxígeno a partir de la fotosíntesis realizada por la proliferación de cianobacterias desde hace 2,400 a 3,200 millones de años (Brocks *et al.*, 1999). Con la producción de oxígeno se desarrolló la capa de ozono en la estratósfera que filtra parte de la radiación UV-B (280-315 nm).

En todos los organismos aerobios, la respiración es una fuente de generación de ERO producidas dentro de las células (Inoue *et al.*, 2003). El oxígeno molecular difunde pasivamente al interior de las células y es reducido a anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) vía oxidación de flavoproteínas, tales como nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) deshidrogenasa II en *Escherichia coli* (Giorgio *et al.*, 2007).

En organismos fotosintéticos, las ERO son producidas por la cadena transportadora de electrones (Fig. 1). La luz es esencial para la fotosíntesis, pero al mismo tiempo puede ser fuente de estrés. El oxígeno singulete (1O_2) es producido por una entrada de energía al oxígeno por parte de la clorofila fotosensibilizada. Si la intensidad de luz es mucho más alta de la que normalmente es utilizada por la capacidad del flujo de electrones fotosintéticos, no sólo incrementa la producción de 1O_2 , sino también la formación de otras ERO provocando la inactivación del aparato fotosintético (Latifi *et al.*, 2009)

La oxidación es un proceso natural de la célula que crea ERO y radicales libres. Las ERO son entidades químicas reactivas que sirven como señales moleculares cuando están a baja concentración (Finkel, 2011); sin embargo, cuando éstas se producen en exceso pueden producir efectos dañinos. Las ERO difieren entre sí

en las fuentes de las que proceden, los efectos que producen y su reactividad química.

Las ERO se clasifican en dos categorías radicales libres y especies no-radicales (Beckman *et al.*, 1993) (Tabla I). Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, que tienden a secuestrar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, por lo que son altamente reactivos. Con base en esta definición son radicales libres el oxígeno, el átomo de hidrógeno y los metales de transición (Halliwell, 1993; Gutteridge *et al.*, 1982).

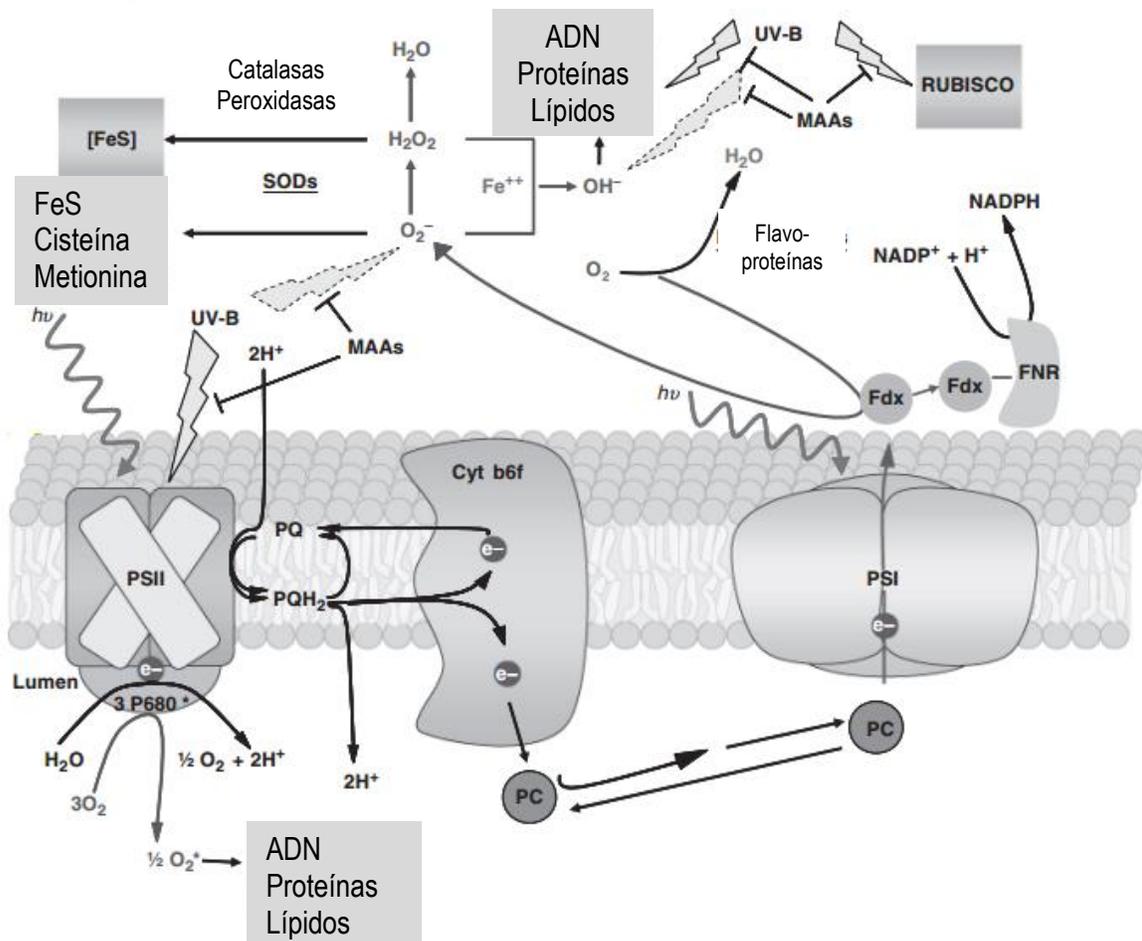


Figura 1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y blancas. El oxígeno (O_2) lleva a la formación de ERO. En el fotosistema II (FSII), el oxígeno singlete (1O_2) es producido por entrada de energía al oxígeno por parte de la clorofila fotosensitizada. En el FSI la reducción univalente de O_2 usando electrones del FSII genera radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El $O_2^{\bullet-}$ es disociado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 por la superóxido dismutasa (SOD) y el H_2O_2 es reducido a agua por las catalasas y peroxidasas. (Modificado de Latifi *et al.*, 2009).

Tabla I. Principales especies reactivas de oxígeno (ERO) (Modificada de Beckman *et al.*, 1993).

RADICALES		NO RADICALES	
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Hidroxilo	HO^{\bullet}	Ácido hipocloroso	$HOCl$
Peroxilo	RO_2^{\bullet}	Ozono	O_3
Alcoxilo	RO^{\bullet}	Oxígeno singulete	1O_2
Hidroperoxilo	HO_2^{\bullet}	Peroxinitrilo	$ONOO^-$

Una vez que un radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que le ha cedido el electrón se convierte en radical libre, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena (Mayo, 1986). Aunque la vida media biológica de un radical libre es de microsegundos, tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un daño a las moléculas y membranas celulares (Sieck, 2004).

Los radicales libres son el resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como la catálisis de alimentos, la respiración, la fotosíntesis o bien por factores ambientales como la radiación solar y contaminación (Halliwell, 1993; Ballester, 1996; Abdollabi *et al.*, 2004). El aumento en los radicales libres ocasiona un fenómeno conocido como estrés oxidativo. El estrés oxidativo es definido como el desbalance entre los oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros que conduce a una interrupción de la señalización y control redox y/o daño a lípidos,

proteínas y ADN, con el desarrollo de patologías y el envejecimiento subsecuente (Finkel y Holbrook, 2000; Sies, 2007).

2.2. Efecto de los radicales libres en las biomoléculas

2.2.1. Oxidación de lípidos

Una molécula reactiva, como es el radical hidroxilo (HO^\bullet), ataca ácidos grasos, constituyentes de triacilgliceroles o fosfoacilgliceroles. La interacción del radical libre va dirigida al carbono adyacente, a un doble enlace, ocasionando un rompimiento homolítico al sustraer un hidrógeno que forma agua al unirse al radical, mientras que el ácido graso presenta un radical libre (electrón) en el carbono afectado por el hidroxilo (Paraskevaïdis *et al.*, 2005). Una vez que a un fosfolípido se le arrebató un electrón, éste busca estabilizar su estructura química y toma el electrón de la molécula próxima, generándose así una reacción en cadena. A esto se le conoce como lipoperoxidación. Los productos de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, esterés, alcoholes. Este proceso repetitivo conduce a perder las propiedades físicoquímicas de la membrana y pueden culminar con la muerte de la célula (Paraskevaïdis *et al.*, 2005).

2.2.2. Oxidación de proteínas

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte de las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el HO^\bullet , aunque algunas son más vulnerables que otras, como es el caso de las cadenas laterales de la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína (Halliwell y Gutteridge, 2015). En consecuencia, la exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones en la estructura terciaria, que pueden acompañarse de una fragmentación química, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de la función biológica (Boix y Pico, 2000).

Uno de los radicales más reactivos a la estructura de las proteínas es el óxido nítrico (NO^\bullet). Además, se ha sugerido que las proteínas pueden actuar como “atrapadoras” de la energía química liberada por los radicales libres, y transferirla a otra molécula (Halliwell y Gutteridge, 2015). Otro mecanismo que da lugar a cambios estructurales en las proteínas, inducidos por radicales libres, es la reacción conocida como auto-oxidación de hexosas, que presentan la fructosa y glucosa; ésta puede ser potencialmente importante en las complicaciones relacionadas, por ejemplo, con pacientes diabéticos (incremento “anormal” en la glucosa plasmática) (Rodríguez *et al.*, 2001).

2.2.3. Oxidación de carbohidratos

La oxidación de carbohidratos puede dar lugar a la formación de moléculas capaces de reaccionar con los grupos carbonilo de las proteínas. Los monosacáridos de la glucosa, una vez oxidados por los radicales libres producidos por metales de transición, pueden combinarse con los grupos carbonilo de las proteínas (Gómez y Medina, 2001).

2.2.4. Oxidación de ácidos nucleicos

El efecto de las ERO en los ácidos nucleicos provoca modificaciones o deleciones de las bases de la molécula del ADN, un efecto similar al presenciado en proteínas. Aunque parece existir una baja posibilidad de reacciones en cadena, el daño puede ser significativo, aunque sea muy limitado en extensión y localización (Halliwell y Gutteridge, 2015). La interacción de radicales libres con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases, ruptura de una cadena o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, ocasionando que el sistema de reparación presente una mutación antes de la replicación. Esto conduce a la producción de genes mutados y, por ende, de proteínas disfuncionales (Halliwell y Gutteridge, 2015). Las modificaciones de las bases se deben en gran parte, a los metales de transición, principalmente al ión ferroso (Fe^{2+}), que se encuentra unido al ADN y que en presencia de H_2O_2 , genera el hidroxilo (HO^\bullet), el cual modifica las bases del

ADN. El HO^\bullet puede atacar tanto a purinas como pirimidinas, además de generar rupturas en las cadenas de ADN (Rodríguez *et al.*, 2001).

2.3. Compuestos antioxidantes

Las células han desarrollado mecanismos que las protegen del efecto nocivo de los radicales libres debido a un complejo sistema de defensa constituido por los agentes antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2015). Cuando se incrementa la producción de radicales libres, se activan los mecanismos antioxidantes para controlar y estabilizar el ambiente redox intra o extracelular (Mátes, 2000). Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que, en bajas concentraciones, retardan o previenen la oxidación. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón y se oxida (Fig. 2). Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan a estos radicales libres (Pietta, 2000)

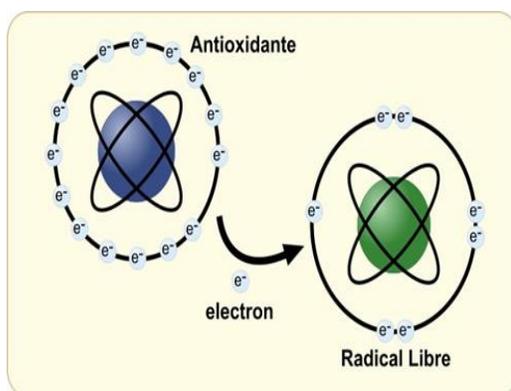


Figura 2. Un antioxidante es un donador de electrones que neutraliza o estabiliza a los radicales libres.

(<https://www.fundacionunam.org.mx/blog/ciencia/el-efecto-antioxidante.html>)

2.3.1. Clasificación y funciones de los compuestos antioxidantes

Los antioxidantes pueden clasificarse con base en:

1.-Su fuente de obtención (García-Bacallao *et al.*, 2001).

Endógenos (enzimáticos), hacen referencia a aquellos que se producen mediante mecanismos enzimáticos del organismo (SOD, CAT, POX). Algunas de

estas enzimas necesitan cofactores metálicos como selenio, cobre, zinc o magnesio para poder realizar la función de protección celular.

Exógenos (no enzimáticos), son aquellos que se introducen por la dieta y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación (vitaminas E y C, carotenoides, flavonoides, entre otros).

2.-Su forma de actuar (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004).

a) Antioxidantes primarios, éstos previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar, o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Ejemplo de ellos son las enzimas SOD, CAT y GPx. Las SODs son metaloproteínas que catalizan la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y oxígeno molecular (O_2) (McCord y Fridovich, 1988) (Fig. 3). Dependiendo del metal de transición encontrado en su sitio activo, las SODs pueden ser categorizadas en tres tipos: la Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y la Fe-SOD. La primera se encuentra principalmente en el citosol y en el cloroplasto de células eucariontes y en algunas especies de bacterias; la Mn-SOD se localiza en la mitocondria de eucariontes y en procariontes, y la Fe-SOD en procariontes (Raha y Robinson, 2000).

La Cu/Zn-SOD tiene un peso molecular de 32,000Da, está formada por dos subunidades idénticas, una contiene Cu^{2+} y la otra Zn^{2+} (Halliwell y Gutteridge, 2015). Las propiedades de esta SOD se han mantenido a través de la evolución, y la enzima obtenida de hongos, plantas, aves y mamíferos son casi las mismas, excepto por diferencias menores en la composición de aminoácidos (Weisiger y Fridovich, 1973; Sawada *et al.*, 1972; Asada *et al.*, 1973; Beem *et al.*, 1974; Steinman *et al.*, 1974). Los metales están en estrecha proximidad, el Cu^{2+} y Zn^{2+} están unidos por un ligando común, el anillo de imidazol de His 61, el Cu^{2+} está relativamente expuesto al solvente mientras que el Zn^{2+} está dentro de la estructura (Richardson *et al.*, 1974). Las propiedades redox del Cu^{2+} de la SOD han sido ampliamente estudiadas. El H_2O_2 puede reducir este Cu^{2+} pero también

puede inactivar irreversiblemente la enzima a altas concentraciones. La Mn-SOD presente en *E. coli* y mutantes de *Streptococcus*, tiene la misma actividad catalítica pero totalmente opuesta a Cu/Zn-SOD. Esta enzima contiene un átomo de manganeso por subunidad. Tiene un peso molecular de 40,000Da y es un dímero formado por dos subunidades del mismo tamaño. La actividad catalítica de la Mn-SOD es dependiente del pH. A pH 7.0 es tan activa como la Cu/Zn-SOD, pero cuando el pH se eleva progresivamente se vuelve menos activa, mientras que la Cu/Zn-SOD no se ve afectada por el pH en el rango de 5.5 a 10 (Halliwell y Gutteridge, 2015).

La Fe-SOD ha sido identificada en *E. coli*, y está localizada en el espacio periplásmico. Sus propiedades y la secuencia de aminoácidos indican una cercana relación con la Mn-SOD. La valencia del hierro en esta SOD ha sido establecida como Fe³⁺. Enzimas muy similares han sido descritas en dos cianobacterias *Plectonema boryanum* y *Spirulina platensis* (Misra, 1974; Lumsden y Hall, 1974).

Las CAT son enzimas que catalizan la conversión del H₂O₂ en H₂O y O₂ (Fig. 3). Requieren como cofactores hierro (Fe²⁺) o magnesio (Mg²⁺). Esta proteína se localiza en los peroxisomas de la mayoría de las células eucariontes (Chelikani *et al.*, 2004). En algunas especies, la CAT contiene moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfatado en su forma reducida (NADPH) ligadas estrechamente a la enzima (Kirkman y Gaetani, 1984). El NADPH unido a la enzima no está involucrado en su actividad catalítica o peroxidativa. Esta molécula puede intervenir en la prevención y reversión parcial de la inactivación de la CAT por su propio sustrato tóxico y estabiliza a la enzima por tener un efecto alostérico sobre su conformación (Halliwell y Gutteridge, 2015). Además, la CAT constituye un reservorio de NADPH, lo cual juega un papel importante durante el estrés oxidativo (Kirkman y Gaetani, 1984).

La GR es una enzima homodimérica compuesta por dos subunidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro, cada subunidad contiene 478 aminoácidos

con un peso molecular de 51,569Da, y en su estructura presenta una extensión N-terminal flexible (Halliwell y Gutteridge, 2015) (Fig. 3). Ambas subunidades presentan residuos esenciales que contribuyen a los sitios activos y de unión al glutatión oxidado (GSSG), por lo que no presenta actividad enzimática en su forma monomérica, ya que su sitio de unión para el sustrato y su sitio catalítico están compuestos por residuos de ambas subunidades (Bray *et al.*, 2000).

La GR permite mantener concentraciones de GSH en la célula, no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H₂O₂, sino que el GSH es también utilizado en la recuperación de las vitaminas C y E luego de participar en la eliminación de radicales libres generados *in situ* o a distancia (Mishra *et al.*, 2009).

b) Antioxidantes secundarios, capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena. Pueden estar asociados a membrana (vitamina E, carotenoides, ficobliliproteínas), dispersos en el citoplasma (aminoácidos tipo micosporinas), o unidos a compuestos reductores solubles en agua, como el GSH y la vitamina C (Noctor y Foyer, 1998; Mittler, 2002; Carletti *et al.*, 2003).

Otra clase de antioxidantes son los compuestos fenólicos simples como el ácido caféico y ácido clorogénico, los flavonoides complejos, quercetina, catequina, así como las antocianinas (Aqil *et al.*, 2006; Turyanitzza *et al.*, 2006; Moon y Shibamoto, 2009; Ahmad *et al.*, 2010).

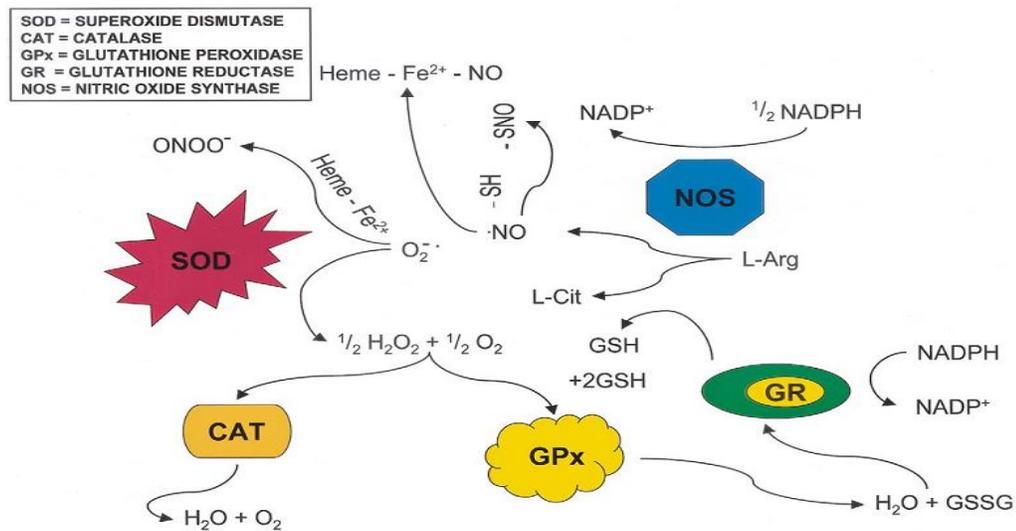


Figura 3. Sistema antioxidante. Las superóxidos dismutasas (SODs) son metaloproteínas que dismutan radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La catalasa (CAT) es una hemoproteína que cataliza la conversión de H_2O_2 a agua (H_2O) y oxígeno (O_2). La conversión de H_2O_2 a H_2O puede también ser catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx), un miembro de la familia de las selenoenzimas. (Tomada de Mishra *et al.*, 2009).

La vitamina E se incorpora en las membranas celulares y la actividad antioxidante que ejerce, evitan la propagación de los radicales libres (como el radical RO_2^{\bullet}) entre los lípidos de membrana y los ácidos grasos poliinsaturados (Packer *et al.*, 2001). La vitamina E es parte de un sistema de ciclos oxido-reducción que reduce a las ERO que se generan después de la lipoperoxidación y posteriormente, regresa a su estado nativo reducido (Constantinescu *et al.*, 1993) (Fig. 4). Ello ocurre mediante interacciones entre las sustancias hidro- y liposolubles, aunado a mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, transformando el radical tocotrienoxilo o tocoferoxilo de nuevo a tocotrienol o tocoferol, respectivamente. La vitamina C puede regenerar a la vitamina E directamente, y el GSH puede regenerar a la vitamina E directamente mediante la vía de la vitamina C (Packer *et al.*, 2001) (Fig. 4).

La vitamina C es un antioxidante que se encuentra en la mayoría de las células vegetales, en los organelos y apoplasto. Previene el daño oxidativo atrapando a

las ERO y como consecuencia, produce un radical libre, el monodehidroascorbato (MDHA), una molécula relativamente estable que reacciona preferentemente consigo misma, previniendo la propagación de radicales libres (Noctor y Foyer, 1998) (Fig. 4).

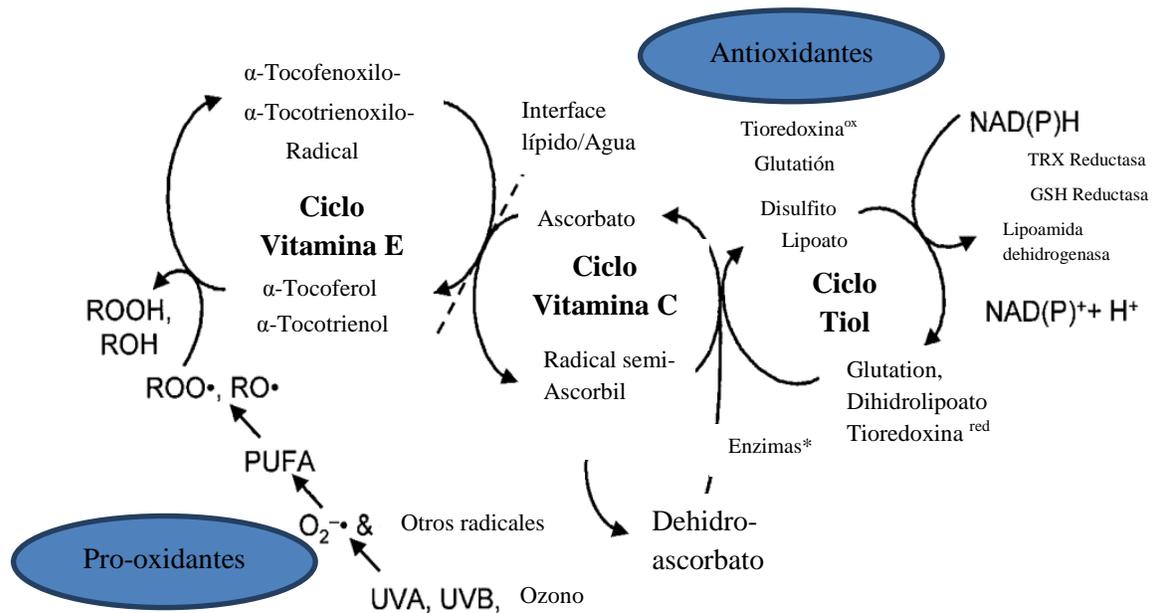


Figura 4. Red antioxidante que muestra la interacción entre las vitaminas E, C y glutatión. ROOH, hidropéroxido orgánico; ROH, alcohol; ROO^{\bullet} , radical peróxido; RO^{\bullet} , radical alcóxido; PUFA ácidos grasos poliinsaturados; $O_2^{\bullet -}$ radical superóxido; UVA ultravioleta tipo A, UVB, ultravioleta tipo B; $NAD(P)H$, nicotinamida adenina difosfato oxidado; $NAD(P)^+$, nicotinamida adenina difosfato reducido; H^+ , protón, GSH, glutatión; TRX, tioredoxina. Modificado de Parcker *et al.*, (2001).

Los carotenoides son tetraterpenos constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Existen dos tipos de carotenoides, aquellos que no contienen oxígeno en sus anillos terminales y las xantofilas que si los tienen (Rodríguez- Amaya, 1999).

Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales sintetizados por las plantas, microalgas y cianobacterias (Bauernfeind, 1972; Gordon y Bauernfeind, 1982). Por su insaturación son sensibles al oxígeno, metales, ácidos, peróxidos,

calor, luz y a las lipoxigenasas (Begoña *et al.*, 2001). Los carotenoides, son supresores de ERO y a bajas concentraciones pueden proteger a los lípidos de la oxidación (Grill y Tuteja, 2010). Desempeñan un papel importante en el ensamblaje de los complejos captadores de luz y tienen una función indispensable, ya que protegen al aparato fotosintético del daño fotooxidativo (Taíz y Zeiger, 2006; Rao y Rao, 2007). Los carotenoides no actúan solos en este proceso ya que existe otro grupo de componentes endógenos que también funcionan como antioxidantes. La astaxantina, es una xantofila presente en microalgas (*Haematococcus pluvialis* y *Chlorella zofingiensis*) que se encuentra ligada a una proteína mediante enlaces no covalentes, formando compuestos estables e hidrosolubles de color azul-grisáceo o verdoso llamados carotenoproteínas. Al ser hidrolizados estos compuestos, ya sea por calentamiento, o por solventes orgánicos, se libera la astaxantina exhibiendo su característico color rojo-naranja (Foss *et al.*, 1987).

Algunos de estos carotenoides tienen la capacidad de actuar como provitamina A, dependiendo de la presencia de la β -ionona. Aproximadamente 50 de ellos serán precursores de vitamina A basándose en consideraciones estructurales. El caroteno más abundante es el β -caroteno, éste es importante por tener dos anillos de β -ionona al cual se le asigna un 100% de actividad. Otros carotenoides con actividad de provitamina A son: α -caroteno (50-54%), β -zeacaroteno (20-40%), γ -caroteno (50-52%), β -criptoxantina (50-60%) y β -apo-8'-carotenal (72%), mientras que las xantofilas como la zeaxantina, luteína, licopeno, astaxantina y violaxantina no son precursores de esta vitamina (Rodríguez-Amaya, 1989).

Las funciones y acciones antioxidantes de los carotenoides están determinadas por las propiedades físicas y químicas de las moléculas. La geometría integral molecular (tamaño, tipo, presencia de grupos funcionales) define si el carotenoide es afín con las estructuras celulares y subcelulares, y el sistema de dobles enlaces conjugados determina sus propiedades fitoquímicas y reactividad química.

Además, las interacciones específicas con otras moléculas en la vecindad inmediata son cruciales para el funcionamiento correcto (Young y Lowe, 2001).

El GSH es la principal forma de almacenamiento de sulfato y actúa como un potente detoxificador de xenobióticos a través de reacciones de conjugación. Junto con su forma oxidada (GSSG), el GSH mantiene el equilibrio redox en los compartimentos celulares (Mendoza y Moreno, 2006; Mishra *et al.*, 2009). Además, participa en la regulación del ciclo celular. El GSH reacciona con las ERO para prevenir la oxidación de grupos tiol de enzimas, por lo que es importante en la estabilización de muchas enzimas (Szalai *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos se pueden agrupar dependiendo de su estructura. Los ácidos fenólicos como, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cumárico y ácido sináptico, derivados del ácido hidroxicinámico y los flavonoides (chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas y taninos condensados) comparten una estructura común de difenil pirano, permitiendo generar una multitud de variaciones para dar lugar a una gran cantidad de compuestos (Karou *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2007).

Se considera que la propiedad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de su capacidad para quelar Fe^{2+} y atrapar radicales libres, además de inhibir enzimas oxidadas, como lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y xantina oxidasa. Estas propiedades contribuyen a evitar la formación de ERO y de hidroxiperóxidos orgánicos (Escamilla *et al.*, 2009). La biosíntesis y regulación de los flavonoides está influenciada por factores ambientales como radiación ultravioleta (UV), en particular la UV-B (Zhang y Björn, 2009).

Las ficobiliproteínas actúan como pigmentos accesorios para la fotosíntesis en algas marinas de las familias de las Rhodophyceae, Cyanophyceae, Cryptophyceae y algunas Pirrophyceae (Gantt y Lipschultz, 1974; Ma *et al.*, 2003). Se encuentran organizadas en estructuras celulares, llamadas ficobilisomas (Fig. 5), las cuales están unidas en conjuntos regulares a la superficie exterior de los

tilacoides. Las ficobiliproteínas son solubles en agua y están compuestas de subunidades α , β y γ de las ficoeritrinas (Wang *et al.*, 1998), cada una de las cuales consiste de una apoproteína y uno o más grupos prostéticos tetrapirrólicos de cadena abierta (cromóforos llamados bilinas), unidos mediante enlaces covalentes a los residuos específicos de cisteína de las apoproteínas (Glazer, 1981).

Las ficobiliproteínas se dividen en tres clases según sus propiedades de absorción, ficoeritrinas ($\lambda_{\max} \sim 540\text{--}570$ nm), las cuales contienen los cromóforos ficoeritrobilina y ficourobilina; ficocianinas ($\lambda_{\max} \sim 610\text{--}620$ nm), que contienen ya sea una mezcla de los cromóforos ficocianobilina y ficoeritrobilina o sólo ficocianobilina, según la especie de origen; y aloficocianinas ($\lambda_{\max} \sim 650\text{--}655$ nm), con ficocianobilina como grupo prostético (Glazer, 1981; Bermejo *et al.*, 2003).

Los cromóforos dan un color característico a cada ficobiliproteína, rojo a la ficoeritrina, azul brillante a la ficocianina, y verde azulado a la aloficocianina. Estos pigmentos tienen uso potencial como colorantes naturales, en las industrias cosmética, farmacéutica y en alimentos gracias a su actividad antioxidante. Algunos de ellos ya han sido extraídos de especies como *Spirulina maxima*, *Spirulina subsalsa*, *Spirulina platensis*, *Phorphyridum cruentum* y *Rhodospirillum rubrum* (Básaca-Loya *et al.*, 2009; Serval *et al.*, 1994). Se han descrito tres mecanismos por los cuales las ficobiliproteínas ejercen un efecto protector. El primero involucra la reducción de marcadores oxidativos debido a su propia estructura química de tetrapirroles lineales ya que pueden actuar como potentes nucleófilos pudiendo neutralizar a las especies reactivas derivadas del oxígeno y nitrógeno evitando daño oxidativo (Bermejo-Bescos *et al.*, 2008; Sathyaikumar *et al.*, 2007). El segundo mecanismo protector se debe a sus propiedades quelantes, ya que estos pigmentos son usados para concentrar metales pesados (Vannela y Verma, 2006). El tercer mecanismo involucra el incremento del sistema antioxidante enzimático ya que se sugiere que los tetrapirroles lineales de las

ficobiliproteínas tienen efectos similares a los de las catalasas (Cano-Europa *et al.*, 2009).

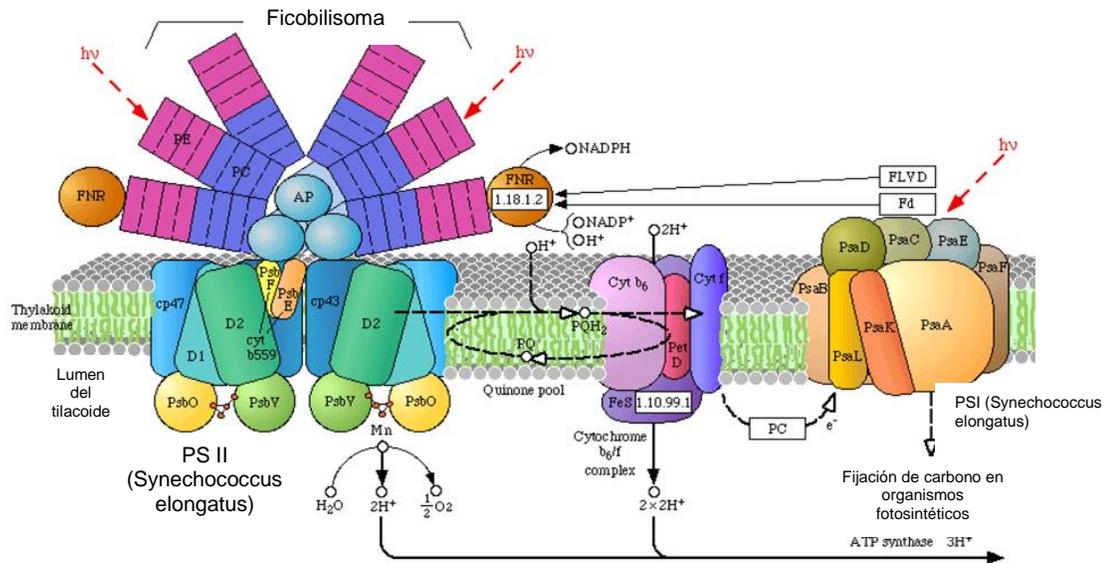


Figura 5. Organización de las ficobiliproteínas en estructuras celulares, llamadas ficobilisomas. Modificada de <http://www.plantasyhongos.es>

2.4. Factores que modifican la concentración de los compuestos antioxidantes

2.4.1. Nitrógeno

La principal fuente de nitrógeno en microalgas y cianobacterias suele ser inorgánica en forma de amonio (NH_4^+), nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-) (Antia *et al.*, 1975; Fisher y Cowdell, 1982; Kaplan *et al.*, 1986a); aunque a veces se utiliza una fuente orgánica como la urea (NH_2CONH_2). Cuando el nitrógeno se incorpora en forma oxidada, como NO_3^- o NO_2^- , debe ser reducido antes de que pueda incorporarse a moléculas orgánicas. La reducción de NO_3^- ocurre en dos pasos catalizados por la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR). La mayoría de las microalgas son capaces de utilizar nitrógeno en forma de NO_2^- , aunque no es tan abundante en la naturaleza como las otras formas de nitrógeno inorgánico. Además, el NO_2^- en altas concentraciones puede inhibir el crecimiento (Morris, 1974; Cresswell y Syrett, 1981).

La asimilación del nitrógeno inorgánico es fuertemente dependiente de la luz; tanto la intensidad luminosa, como la calidad de la luz pueden controlar la asimilación de NO_3^- (Yoch y Gotto, 1982). Trabajos realizados con diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno, han demostrado que el crecimiento así como la composición bioquímica celular, varían ampliamente, por lo que la característica de manipular la concentración de nitrógeno se utiliza para generar biomasa con diferente calidad (Colla *et al.*, 2007). La disponibilidad de nitrógeno afecta negativamente a gran cantidad de procesos bioquímicos, como pueden ser mecanismos de defensa y de reparación de los efectos causados por la radiación UV (Sinha y Hader, 2008). Sin embargo, no se conocen totalmente las consecuencias de la limitación de nitrógeno ante el (los) efecto(s) que la radiación UV induce en la producción primaria y, en general, se afirma que puede incrementar la susceptibilidad hacia el daño producido por ésta. Lo anterior puede ser debido a efectos negativos sobre los procesos de defensa, como por ejemplo, aquellos en los que intervienen enzimas o cofactores proteicos que necesitan del nitrógeno para su síntesis (Roy, 2000); o también enzimas que participan en la detoxificación de ERO cuya presencia se induce por la radiación UV (Lesser y Shick, 1989b). Además, en un cultivo de microalgas y/o cianobacterias, la limitación de nitrógeno disminuye la síntesis de proteínas, clorofila, ADN y el tamaño celular (Doucette y Harrison, 1991).

2.4.2. Radiación ultravioleta

La capa de ozono sirve como barrera para filtrar las radiaciones provenientes del sol. Estas radiaciones se clasifican en tres tipos, ultravioleta C (UV-C, $\lambda=200-280$ nm) que es absorbida plenamente en la atmósfera; ultravioleta B (UV-B, $\lambda=280-315$ nm) que es filtrada un 90% por la atmósfera y que produce el bronceado de la piel, las quemaduras y cáncer de piel; y ultravioleta A (UV-A, $\lambda=315-400$ nm) que causa arrugas, manchas de la edad y pérdida de elasticidad (Matsumura y Ananthaswamy, 2004). La disminución de la capa de ozono estratosférico ha causado un incremento del flujo de radiación UV-B sobre la superficie terrestre y

los ecosistemas acuáticos y, por tanto, un aumento en los daños que esta radiación causa.

2.4.2.1. Efectos de la radiación UV en las cianobacterias

Los efectos más importantes de la radiación UV en las cianobacterias se esquematiza en la figura 6.

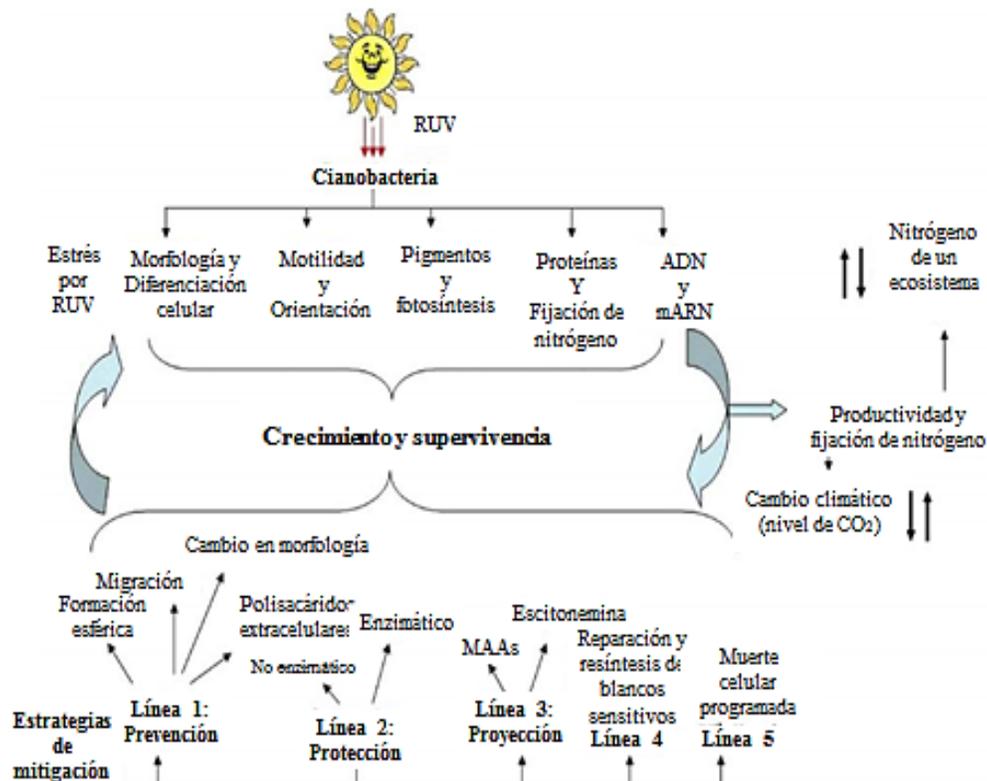


Figura 6. Efectos de la radiación ultravioleta sobre las cianobacterias y principales estrategias de mitigación. (Modificado de Shailendra *et al.*, 2010).

2.4.2.2. Efectos de la radiación UV en el ADN

La radiación ultravioleta absorbida por el ADN (la cual puede ser UV-B en condiciones normales), puede producir varias lesiones pero la mayoría corresponden a la dimerización o la formación de aductos. Ello afecta a las bases de pirimidina adyacentes en una cadena de ADN. Los productos de la dimerización son dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) y los aductos

(propiamente llamados 6-4 pirimidinas, 1-2'-pirimidina), son frecuentemente agrupados como fotoproductos. La radiación UV transforma los fotoproductos a fotoisómeros. Esta transformación se genera tanto con radiación UV-A (Takeuchi *et al.*, 1998) como con UV-B (Ravanat *et al.*, 2001).

Las purinas también son afectadas por la radiación UV. Así, la adenina puede combinarse con las adeninas adyacentes o con los residuos de timina. Esto ocurre muy poco, pero es biológicamente importante debido a que no es tan fácil repararlo como los CPDs y los fotoproductos. Los aductos adenina-timina son altamente mutagénicos (Zhao y Taylor, 1997).

Las bases del ADN también pueden sufrir daño fotooxidativo. Este fenómeno fotooxidativo puede ser producido de diversas formas y su frecuencia aún no ha sido establecida. Un protón incide directo a una base y expulsa un electrón, el espacio vacío del electrón mediante la interacción con el agua puede migrar a lo largo de la cadena del ADN hasta que encuentra un residuo de guanina, formando el 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina. Otra posibilidad es que una pirimidina o una purina después de la fotooxidación entre a un estado de triplete excitado y reaccione con el oxígeno, generando $^1\text{O}_2$ (Ravanat *et al.*, 2001).

2.5. *Spirulina (Arthrospira) maxima*

Es una cianobacteria planctónica que forma poblaciones masivas en cuerpos de aguas tropicales y subtropicales caracterizada por altos niveles de carbonato o bicarbonato y pH elevado (Iltis, 1980). Esta especie representó el principal componente del fitoplancton del lago Texcoco, el cual puede ser considerado el hábitat original de esta especie (Durand-Chastel, 1980).

2.5.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo con la clasificación del manual de bacteriología determinativa de Bergey, *Spirulina (Arthrospira)* pertenece a las bacterias fotosintéticas oxigénicas que cubren los grupos cianobacteria y Prochlorales (Castenholz y Waterbury,

1989; Whitton, 1992), las cuales están por filogenia relacionadas con la secuencia de la ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) sub-unidad 16S. En función de los datos de esta sub-unidad y la sub-unidad ARNr 5S, estos procariontes se clasifican dentro del grupo de las eubacterias. La clasificación taxonómica de *Smax*, se presenta en la tabla II.

Tabla II. Clasificación taxonómica de *Spirulina (Arthrospira) maxima*

Dominio: Bacteria
Phylum: Cyanobacteria
Clase: Cyanobacteria
Orden: Oscillatoriales
Familia: Oscillatoriaceae
Género: <i>Spirulina</i>
Especie: <i>maxima</i>

2.5.2. Ciclo de vida

Un aspecto fundamental de la biología de *Spirulina* es su ciclo de vida, debido a las implicaciones taxonómicas, fisiológicas y de cultivo (Ciferri, 1983; Richmond, 1986). Este periodo se resume en las siguientes etapas fundamentales: a) fragmentación de los tricomas, b) ampliación de los hormogonios celulares, c) procesos de maduración y d) elongación de tricomas. Los tricomas maduros se dividen en varios filamentos pequeños u hormogonios a través de la formación previa de células especializadas, necridios celulares, en el que el material celular se reabsorbe permitiendo la fragmentación. El número de células en el

hormogonio se incrementa por fisión binaria. En este proceso, los tricomas crecen longitudinalmente y se lleva a su forma helicoidal (Fig. 7) (Balloni *et al.*, 1980).

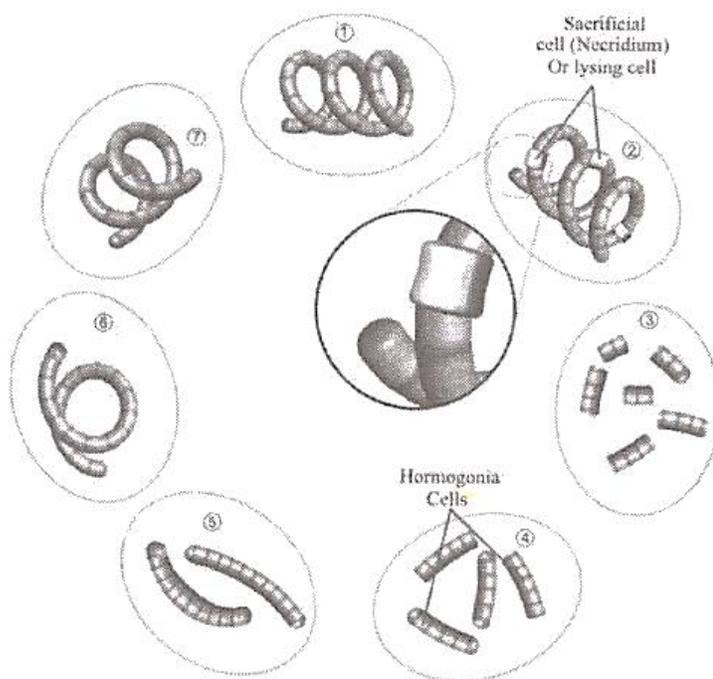


Figura 7. Ciclo de vida de *Spirulina (Arthrospira) maxima* (Tomado de Sánchez *et al.*, 2003b).

2.5.3. Composición bioquímica

Al estar agrupadas como cianobacterias, la *Spirulina* posee un tipo de pared celular característica que logra favorecer su digestibilidad; por lo que sus constituyentes son asimilables. De esta manera, incluso los más frágiles (vitaminas, ácidos grasos esenciales) están disponibles sin degradación alguna (Becker y Venkataraman, 1982).

El contenido de proteínas en *Spirulina* oscila entre 50 y 70% de su peso seco (Becker y Venkataraman, 1982). Desde el punto de vista cualitativo, las proteínas de *Spirulina* contienen todos los aminoácidos esenciales, que representan el 47% del peso total de las mismas (Tiboni y Ciferri, 1985). Al contrario de otros

microorganismos propuestos como fuente de proteínas, *Spirulina* no contiene pared celulósica, sino una cubierta de mureina, relativamente frágil (Tiboni y Ciferri, 1985). Los carbohidratos constituyen del 15 al 25% de la materia seca en *Spirulina*. Los glúcidos simples únicamente están presentes en pequeñas cantidades y estos son glucosa, fructosa y sacarosa; también se encuentran polioles como glicerol, manitol y sorbitol (Belay, 2002).

En *Spirulina platensis* y *Spirulina maxima* se ha reportado que la concentración de lípidos totales es entre 5.6 y 7% del peso seco (Belay, 2002). Otros estudios señalan más del 11% (Becker y Venkataraman, 1982). Los lípidos totales pueden ser extraídos de la fracción saponificable y de la insaponificable. La fracción saponificable está compuesta principalmente por monogalactosil y digalactosil diglicéridos, sulfoquinovosil diglicéridos y fosfatidilglicéridos (Tiboni y Ciferri, 1985).

El β -caroteno representa el 80% de los carotenoides totales de *Spirulina*; el resto está compuesto principalmente de fucoxantina y de criptoxantina (Belay, 2002). Se encuentran entre 700 y 1700 mg de β -caroteno y aproximadamente 100 mg de fucoxantina y de criptoxantina por kilogramo de biomasa seca (Sánchez *et al.*, 2003b).

Las proteínas que tienen el más alto potencial económico son las ficobiliproteínas. *Spirulina* contiene tres ficobiliproteínas ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina. La fracción proteica puede contener hasta un 20% de ficocianina, un pigmento hidrosoluble azul (Ciferri, 1983). La ficocianina puede ser utilizada como pigmento natural para alimentos, medicamentos y en la industria cosmética para reemplazar los pigmentos sintéticos (Vonshak, 1997).

2.6. *Phormidium persicinum*

El género *Phormidium*, incluye un gran número de especies de ambientes marinos y de agua dulce, con diferentes tamaños celulares, diferentes grado de constricción en las paredes transversales (Kutzing, 1849). La clasificación taxonómica de *Php*, se presenta en la tabla III.

Tabla III. Clasificación taxonómica de *Phormidium persicinum*

Dominio: Bacteria
Phylum: Cyanophyta
Clase: Cyanophyceae
Orden: Oscillatoriales
Familia: Phormidiaceae
Género: <i>Phormidium</i>
Especie: <i>persicinum</i>

Esta cianobacteria ha sido poco estudiada. Pintner y Provasol (1958) la cultivaron en condiciones artificiales, determinando el rango de temperatura en el que puede crecer, la fuente de nitrógeno preferencial para su metabolismo y la concentración de vitaminas. Palinska *et al.* (2011), en un análisis taxonómico basado en morfología, pigmentos y marcadores moleculares, la diferenciaron de otras especies del mismo género.

3. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿El cultivo de las cianobacterias bajo condiciones simuladas de estrés ambiental en el laboratorio, como la exposición a radiación UV y deficiencia de nitrógeno inorgánico, incrementará su contenido de antioxidantes y reducirá la actividad fotosintética?

4. HIPOTESIS

Si la capacidad antioxidante es una respuesta intrínseca de las células a las variaciones ambientales como variables físico-químicas (radiación UV y nitrógeno inorgánico), entonces *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum* cultivadas en deficiencia de nitrógeno y expuestas a radiación UV modificarán el contenido de compuestos antioxidantes. Se espera un incremento de la capacidad antioxidante en presencia de radiación UV y deficiencia de nitrógeno inorgánico relacionado con una disminución de la actividad fotosintética.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del estrés provocado por la deficiencia de nitrógeno y radiación UV sobre la actividad fotosintética y la producción de compuestos antioxidantes en las cianobacterias *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum*.

5.2. Objetivos específicos

1. Caracterización fotobiológica (crecimiento y fotosíntesis) de las cepas *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum* cultivadas bajo condiciones control y sometidas a estrés.
2. Determinar la capacidad antioxidante total en las cepas cultivadas bajo condiciones control y sometidas a estrés.
3. Determinar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasas totales (POX) en las cepas cultivadas bajo condiciones control y sometidas a estrés.
4. Determinar el contenido de clorofila *a*, carotenoides, ficobiliproteínas, vitaminas C y E, compuestos fenólicos totales y producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en las cepas cultivadas bajo condiciones control y sometidas a estrés.
5. Determinar el contenido especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), ácidos grasos, lípidos, proteínas y carbohidratos totales en las cepas cultivadas bajo condiciones control y sometidas a estrés.

6. JUSTIFICACIÓN

La toxicidad de los antioxidantes sintéticos ha dado lugar a la reducción de su empleo y al aumento en las investigaciones sobre sustancias antioxidantes de origen natural. La diversidad de especies y la versatilidad metabólica de las cianobacterias frente a condiciones ambientales cambiantes, las convierten en fuentes potenciales de producción de estos compuestos. Aunque los antioxidantes se producen de manera natural en las cianobacterias, es necesario establecer estrategias de cultivo a nivel laboratorio para generar conocimiento fotobiológico, fisiológico y bioquímico para su posible uso biotecnológico.

En el medio natural bajo condiciones de estrés ambiental como puede ser el incremento de dosis de radiación fotosintéticamente activa (PAR), presencia de radiación UV o deficiencia de nutrientes, especialmente nitrógeno inorgánico, la actividad antioxidante en las cianobacterias aumenta como respuesta de protección frente a las ERO. El objetivo del presente estudio, fue evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en la respuesta fotobiológica y en la producción de metabolitos con capacidad antioxidante de las cianobacterias *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum* y proponer para un futuro su posible escalamiento para su utilización en aspectos biotecnológicos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material biológico y condiciones de cultivo

Las cepas de cianobacterias se adquirieron en UTEX The Culture Collection of Algae y se mantienen en el cepario del CIBNOR. *Php* (LB 2425) se cultivó en medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962) en matraces de vidrio en un volumen final de cultivo de 1.9L con un inóculo de 0.9L. *Smax* (LB 2342), se cultivó en medio Jourdan (2006) con volúmenes de cultivo y de inóculo iguales a las anteriormente mencionadas. Todos los cultivos se realizaron en las siguientes condiciones de laboratorio: temperatura $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, irradiancia incidente de $130\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ para *Smax* y $30\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ para *Php*, fotoperiodo 12h luz: 12h oscuridad, aireación continua, pH 7.8 y 10.5, para *Php* y *Smax* respectivamente.

Se realizaron curvas de crecimiento de cada una de las cepas. Se tomó diariamente bajo condiciones de esterilidad una alícuota de 20 mL de cultivo, y se realizó por duplicado la determinación de peso seco total y cenizas (Arredondo Vega *et al.*, 1997).

Conocidas las curvas de crecimiento de ambas cepas en condiciones control, se seleccionó el tiempo en el cual el cultivo estuvo en la fase media exponencial (7 días para ambas) y en esa fase se sometió al estrés por deficiencia de nitrógeno (6 días para *Smax* y 28 horas para *Php*). De todos los cultivos se realizaron 6 réplicas ($n=6$) y se determinó peso seco al inicio y la final del experimento (Arredondo Vega *et al.*, 1997). La biomasa de *Smax* se cosechó con tamices de $30\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. La biomasa de *Php* se cosechó por centrifugación a $629\ \times\ g$, a 10°C durante 5 minutos, y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

En los experimentos además de radiación PAR, también se aplicó radiación UV. Las lámparas usadas para proporcionar radiación PAR fueron lámparas fluorescentes (PHILIPS MASTERTLD 36W/865, Irradiancia_{PAR} = 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y para UVR (UVA, Q-Panel 340, Irradiancia_{UVA}=12-47 W m^{-2} , Irradiancia_{UVB} = 0.67 W m^{-2}). La radiación espectral recibida por los organismos en cada uno de los tratamientos, PAR y PAR+UVR se presenta en el anexo 11.

La distancia a la que se colocaron los cultivos de la fuente de luz para conseguir las irradiancias anteriormente indicadas, se estableció de acuerdo a medidas espectrales tomadas a distintas distancias de las lámparas para poder obtener unas ecuaciones exponenciales que explican la atenuación de la luz (coeficiente de atenuación, K).

A partir de estas ecuaciones ($R^2 = 0.99$) se calculó la distancia a la que debían colocarse los matraces para obtener así la irradiancia deseada. La irradiancia se determinó utilizando un espectroradiómetro de multiodos (Sphere Optics SMS 700). De las ecuaciones obtenidas a partir de los ajustes exponenciales, se obtienen los valores de atenuación (K) para PAR, UV-A y UV-B, siendo y la irradiancia a una distancia x de la fuente de luz. De acuerdo a la atenuación de la luz, en todos los casos se ajustan a una ecuación exponencial negativa ($R^2 = 0.99$). La radiación UV-A y UV-B aplicada fue de 26 W m^{-2} y 1.8 W m^{-2} respectivamente.

$$Y = ae^{bx} \text{ (Ecuación general)} \quad (1)$$

$$Y = 111.71 e^{-7.056x}; K = -7.056 \text{ (PAR)} \quad (2)$$

$$Y = 18.142 e^{-5.83x}; K = -5.83 \text{ (UV-A)} \quad (3)$$

$$Y = 0.9531 e^{-5.602x}; K = -5.602 \text{ (UV-B)} \quad (4)$$

El tiempo de estrés por radiación UV fue el mismo al de estrés por deficiencia de nitrógeno, 6 días para *Smax* y 28 horas para *Php*.

7.2. Análisis

7.2.1. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico

Para la determinación de peso seco total y cenizas, se utilizó la metodología propuesta por Arredondo-Vega y Voltolina (1997). Esta se fundamenta en la separación de la biomasa del medio de cultivo mediante filtración al vacío en membranas de fibra de vidrio, cuya porosidad nominal depende del tamaño de la célula y de una solución de lavado de acuerdo a su naturaleza. Se lavan los filtros con agua destilada y se dejan secar. Una vez secos, se transfieren a sobres de papel aluminio que son prequemados a 490°C por 6 horas. Los filtros prequemados se colocan en un desecador durante 1.5 horas y se pesan hasta verificar que el peso permanece constante.

Se toma un volumen conocido del cultivo y se filtra al vacío en las membranas a peso constante. La muestra de *Php* se lavaron con 10 mL de formato de amonio (0.5 M), en el caso de *Smax* se lavaron con 10 mL de agua destilada. Se filtran nuevamente y se guardan los filtros en el sobre. Los sobres (entreabiertos) con el filtro se colocan en una estufa a 65°C durante al menos 12 h. Después del secado, se pasan los filtros al desecador durante 1.5 horas y se pesan rápidamente. Se regresan los filtros a la estufa y se repitió la operación hasta asegurarse que se logró el peso constante.

Por diferencia entre el peso del filtro vacío y el peso del filtro con la muestra y dividido entre el volumen de cultivo filtrado, se obtiene el peso seco total ($\mu\text{g mL}^{-1}$ o mg mL^{-1}). El filtro con la biomasa seca y pesada se incinera en una mufla a 490°C 6 horas. Se repite el paso estufa-desecador-balanza mencionado anteriormente, hasta peso constante. Por diferencia de peso entre el filtro vacío y el filtro con las cenizas, se obtiene el peso inorgánico o peso de cenizas ($\mu\text{g mL}^{-1}$ o mg mL^{-1}). Por diferencia entre el peso del filtro con la muestra seca y el filtro con las cenizas, se obtiene el peso orgánico.

7.2.2. Medida de la fotosíntesis por la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* asociada al fotosistema II (FSII)

Este tipo de determinación se basa en el comportamiento de la molécula de la clorofila al ser excitada por un fotón. Mediante esta técnica basada en someter a un organismo a pulsos de luz, se puede cuantificar una serie de parámetros. Cuando la molécula de la clorofila es excitada por un fotón, la energía generada puede canalizarse de 3 formas: vía fotoquímica (transporte electrónico), disipación en forma de calor (disipación térmica) y fluorescencia (Fig. 8).

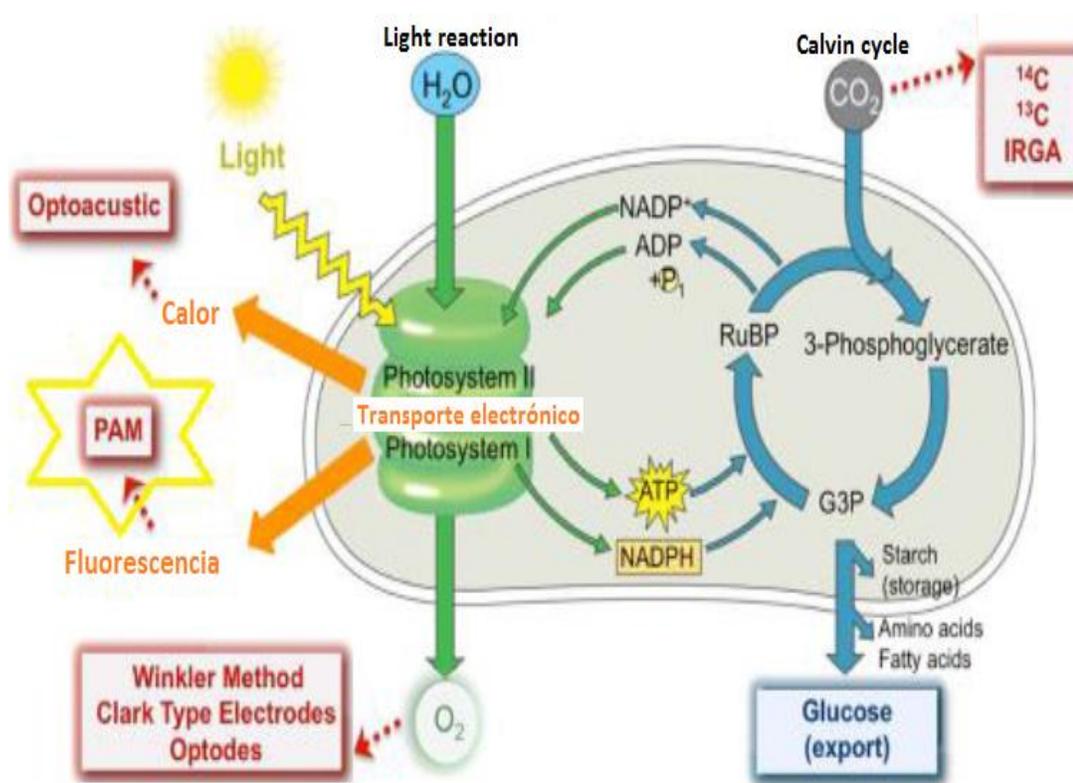


Figura 8. Visión general del proceso fotosintético. La luz absorbida en forma de energía es usada fotoquímicamente durante las reacciones luminosas. El exceso de energía que no entra a formar parte de la vía fotoquímica, es reemitida como calor o fluorescencia. Para medir la fluorescencia como proceso involucrado en la fotosíntesis, se hace uso de los fluorómetros de amplitud modulada (PAMs). Tomada de Gil-Jerez C. 2015.

7.2.2.1. Rendimiento cuántico efectivo *in situ* $Y(II)$

Para la medida del $Y(II)$, se utilizó el método del pulso de saturación con luz roja, proporcionada por el fluorómetro WATER-PAM (Fig. 9). Metodológicamente, la fibra óptica del equipo se colocó por la parte exterior del matraz donde estaba el cultivo de la cianobacteria. Con la luz de medida, el PM-gain y Out-gain, se ajustó la fluorescencia basal de los centros de reacción parcialmente reducidos del FSII (F_0) en un valor entre 200 y 400 mV. Después de ajustar el equipo, se le realizó auto cero. Posterior a esto, se dieron los pulsos de saturación durante el tiempo que duró cada tratamiento en diferentes posiciones del matraz.

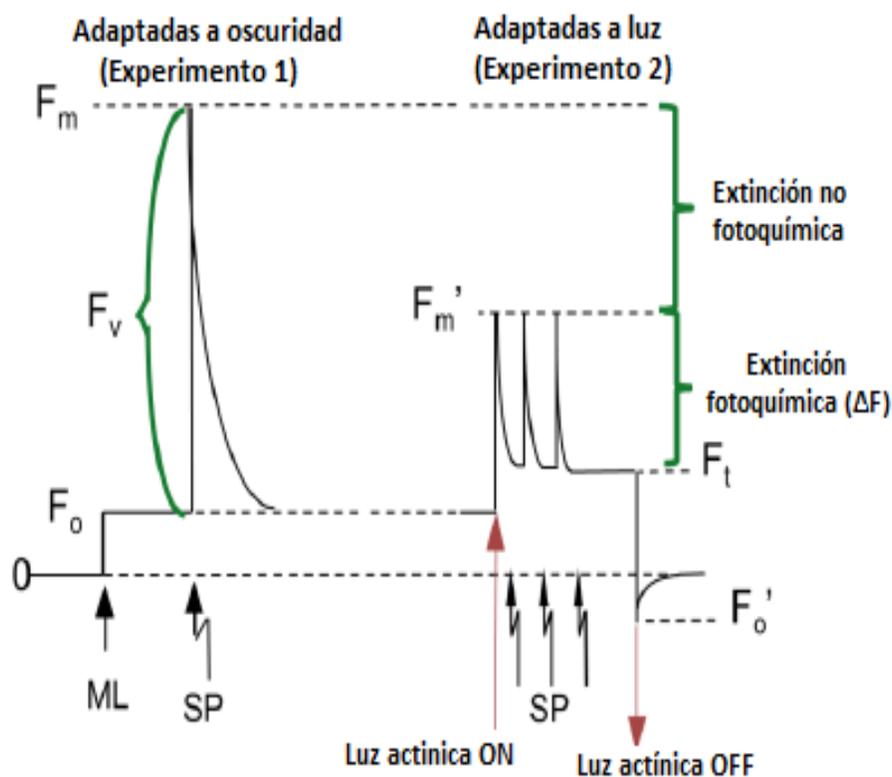


Figura 9. Método del pulso de saturación. Bajo la luz de medida (ML), se mide F_0 . Después de aplicar un pulso de luz de saturación (SP), se alcanza la máxima fluorescencia (F_m). Más tarde, las muestras se iluminan con luz actínica y se someten a una serie de pulsos de saturación para alcanzar el estado estacionario (F_t) y la fluorescencia máxima (F_m'). Por último, la luz actínica se apaga para medir la fluorescencia mínima después de la iluminación (F_0').

7.2.2.2. Curvas rápidas de luz (RLC)

Curvas rápidas de luz (RLC) (Schreiber *et al.*, 1995). Se tomaron 10 mL de cultivo de cada tratamiento a diferentes tiempos. Las alícuotas fueron introducidas a cámaras de incubación. Después de la incubación, se realizaron las RLC a irradiancias crecientes (E1=5, E2=7, E3=11, E4=16, E5=25, E6=38, E7=59, E8=89, E9=126, E10=179, E11=311 y E12=461 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de luz roja proporcionada por el fluorómetro WATER-PAM.

El F_0 (fluorescencia basal de los centros de reacción totalmente oxidados del FSII) y el F_m (fluorescencia máxima de los centros de reacción totalmente reducidos del FSII) se obtuvieron después de 15 minutos en oscuridad para obtener el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m). F_v es la diferencia entre F_m y F_0 (Schreiber *et al.*, 1995). El rendimiento cuántico efectivo ($\Delta F/F_m$) y la tasa de transporte de electrones (ETR) en las cianobacterias ya sometidas a luz, se calcularon de acuerdo a Schreiber *et al.* 1995:

$$\Delta F/F_m = (F_m - F) / F_m \quad (5)$$

$$\text{ETR } (\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}) = \Delta F/F_m \times E \times A \times F_{II} \quad (6)$$

Dónde E es la irradiancia PAR incidente; A es la absorptancia y F_{II} es la fracción de cuantos absorbidos por el FSII en la banda PAR (400-700 nm), que tiene el valor de 0.36 en cianobacterias (Johnsen y Sakshaug, 2007). El ETR máximo (ETR_{max}), la eficiencia fotosintética (α), irradiancia de saturación (E_k), e irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}), fueron obtenidos del ajuste matemático usando modelos tangenciales reportado por Eilers y Peeters (1988) (Fig. 10).

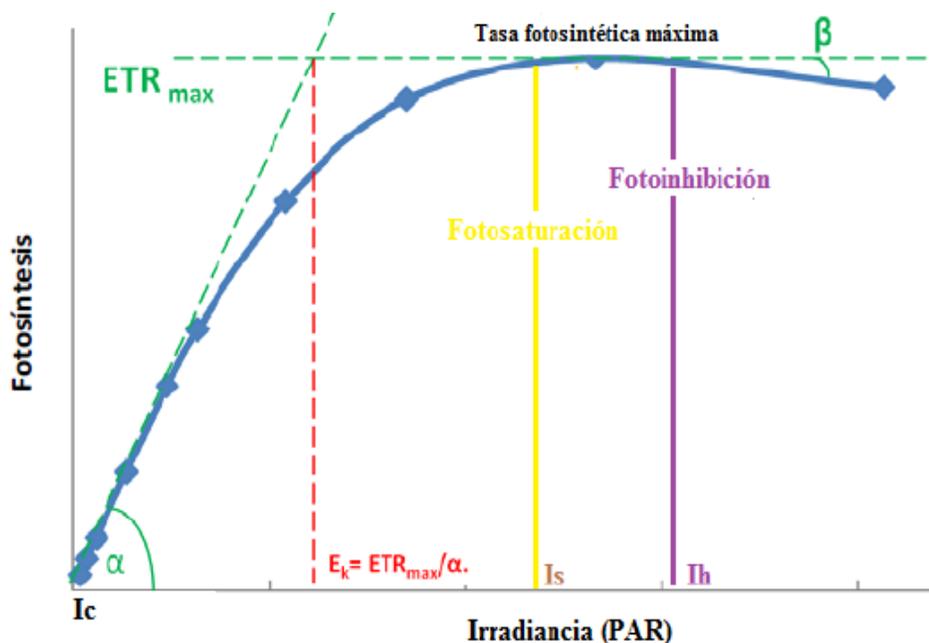


Figura 10. Detalle de los parámetros fotosintéticos en una curva ETR ajustado de acuerdo a Eilers y Peters (1988) a distintas irradiancias PAR. La fotosíntesis aumenta a medida que la irradiancia es mayor, hasta alcanzar el punto de la fotosaturación ($I_s = E_k$), donde la tasa fotosintética es máxima (ETR_{max}) y posteriormente se produce la fotoinhibición ($I_h = E_{opt}$). Podemos obtener parámetros fotosintéticos como la eficiencia fotosintética (α) y la irradiancia de saturación (E_k).

7.2.2.2.1. Absorptancia (A)

Las mediciones de A se realizaron en suspensión. Se tomaron 3 mL de cultivo de cada tratamiento y del medio de cultivo a diferentes tiempos. Para establecer la concentración a la cual se realizó la medición de A, se realizaron mediciones de absorbancia en los cultivos. Se tomó de referencia la longitud de onda de máxima absorción del pigmento mayoritario según Siegelman y Kycia (1978) de cada cepa: ficocianina (615 y 652 nm) para *Smax* y ficoeritrina (562 nm) para *Php*. La absorbancia se estableció en un valor de 0.4 para cada cepa y para todos los tratamientos. Cuando la medición de la absorbancia fue arriba de 0.4, se diluyó con medio de cultivo estéril. 2 mL de cultivo celular fueron colocados en una

cámara para determinar (Fig. 11) E_t y E_o a partir del medio de cultivo. El valor de A fue calculado con la siguiente ecuación:

$$A = 1 - \frac{E_t}{E_o} \quad (7)$$

Dónde A es la absorptancia del cultivo celular de la fracción de irradiancia incidente, E_t es la irradiancia del cultivo y E_o es la irradiancia del medio de cultivo estimados, usando un sensor PAR con un coseno de respuesta (LICOR 192 SB). El montaje del sensor y la fuente de irradiancia PAR, se muestra en la figura 11.

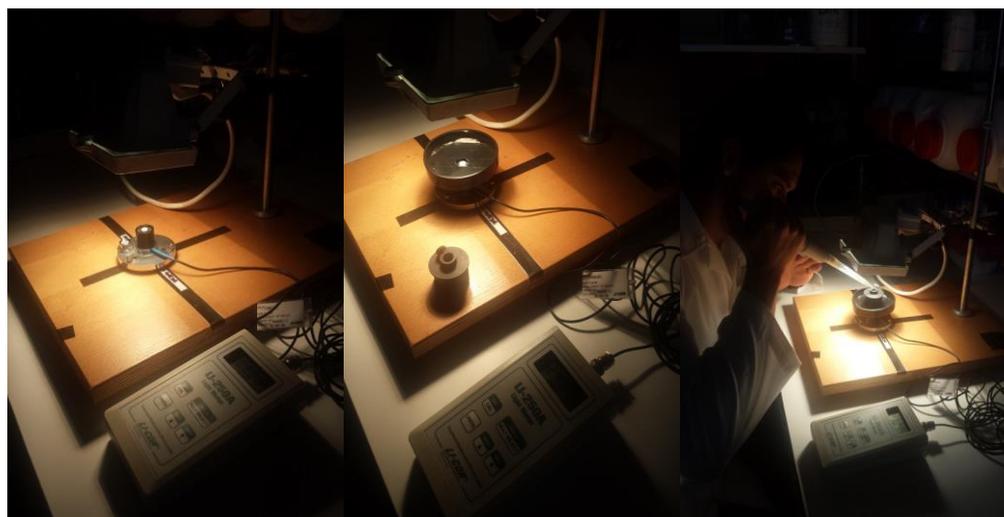


Figura 11. Mediciones de absorptancia (A) con sensor LICOR 192 SB

7.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante total

Se utilizó el protocolo Brand-Williams *et al.* (1995), el cual se fundamenta en la evaluación de la capacidad que tienen las células para atrapar radicales libres.

Se preparó una solución de 2,2-difenil-2-picril-hidracil (DPPH 125 μM) en metanol. En microplacas se mezcló 20 μL de cada extracto hidroalcohólico de biomasa

lío-filizada (100 mg) y 200 μ L de la solución de DPPH. Previamente se realizó la curva de calibración utilizando ácido gálico en un gradiente de concentración de 5 a 100 μ M y se leyó a $A_{515\text{nm}}$. La capacidad antioxidante total se determinó por la disminución en la absorbancia a 515 nm en un lector de microplacas. Los resultados se expresaron en μ M de ácido gálico.

7.2.4. Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes

Para la determinación de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) se pesaron 100 mg de biomasa fresca de cada cianobacteria, se homogenizó (273 x g, 40 segundos en frío) con 2 mL de la solución para homogenizar (K_2PO_4 50 mM, pH 7.5), y 20 μ L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1 mM en etanol al 96%). El homogenizado se centrifugó a 2,200 x g a 4°C durante 15 minutos. El extracto se empleó inmediatamente para cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes.

7.2.4.1. Superóxido dismutasa (SOD, E.C.1.15.1.1)

La determinación de la actividad enzimática de SOD, se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Suzuki (2000), que se fundamenta en la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ de manera constante a partir del sistema xantina/xantina oxidasa (Fig. 12). El $\text{O}_2^{\bullet-}$ entra en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT), lo reduce y produce formazán, cuyo cambio puede ser detectado por espectrofotometría a 560 nm cuando la SOD inhibe la reducción del NBT.

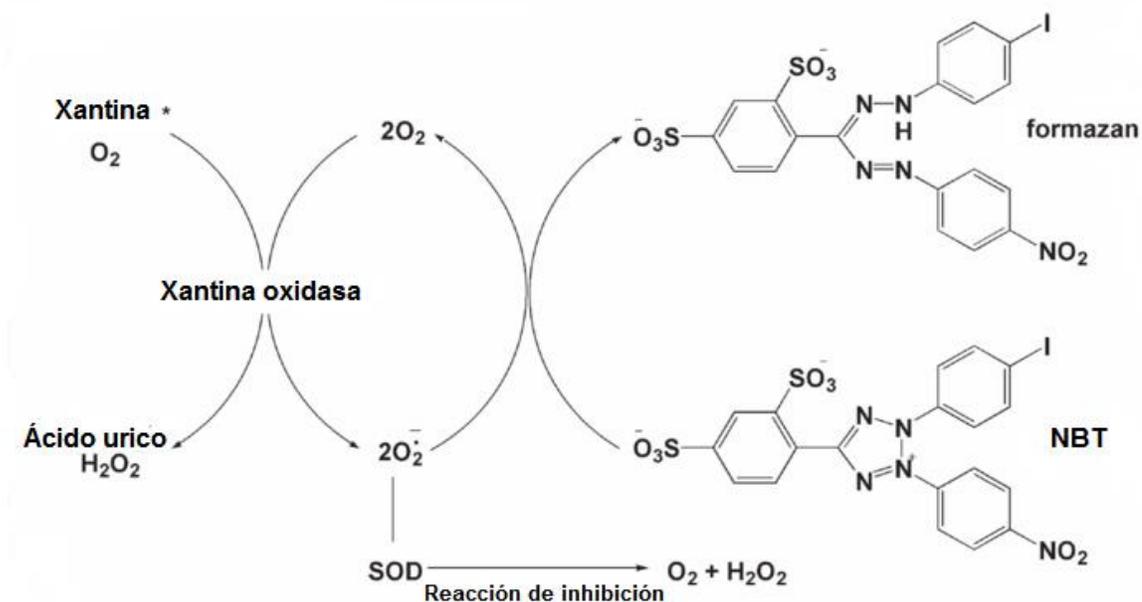


Figura 12. Fundamento para la determinación de SOD: el sistema xantina/xantina oxidasa produce el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El $O_2^{\bullet-}$ entra en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce y genera formazán, cuyo cambio puede ser detectado por espectrofotometría cuando la SOD inhibe la reducción del NBT. (Modificado de www.dojindo.com).

Todos los reactivos se mantienen en baño de agua a 25°C. En una celda de plástico, se mezcló 1.45 mL de la solución de trabajo (solución amortiguadora sodio-carbonato 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025 mM, EDTA 0.1mM), 25 µL de xantina oxidasa (0.1 U mL⁻¹ en sulfato de amonio 2 M) y 25 µL del extracto enzimático. El blanco se preparó sustituyendo el volumen de extracto enzimático con solución para homogenizar. Posteriormente se registró en un espectrómetro el cambio de absorbancia a 560nm cada 30 segundos durante 5 minutos.

Una unidad de SOD se define como la concentración de enzima necesaria para la inhibición del 50% de la máxima reacción del $O_2^{\bullet-}$ con el NBT. La actividad de la enzima se expresa en U de SOD mg⁻¹ proteína.

7.2.4.2. Catalasa (CAT, E.C.1.11.1.6)

Para la determinación de la actividad de la enzima CAT se utilizó el protocolo de Aebi (1984), el cual se fundamenta en la capacidad que tiene ésta en descomponer H_2O_2 en agua y oxígeno, por lo que se cuantifica la descomposición del H_2O_2 por espectrofotometría a $A_{240\text{nm}}$. Todos los reactivos se mantuvieron en baño de agua a 25°C . La solución de trabajo se preparó en fresco utilizando una solución patrón de H_2O_2 (20 mM), la cual se diluyó (1:1) con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 mM). En una celda de cuarzo se mezcló 1.5 mL de la solución de trabajo con 10 μL del extracto enzimático y se registró el cambio en la absorbancia a 240nm cada 15 segundos durante 3 min.

Una unidad de CAT se define como la concentración de enzima necesaria para reducir 1 μmol de H_2O_2 por minuto. La actividad enzimática se expresa en U de CAT mg^{-1} proteína.

7.2.4.3. Actividad de las enzimas peroxidasas totales (POX)

La actividad de las enzimas POX se determinó mediante la técnica propuesta por Kar y Mishra (1976). Las muestras de biomasa fresca (100 mg) se homogenizaron en las mismas condiciones que en SOD y CAT. El extracto se colectó y se empleó para los análisis posteriores. En celdas de cuarzo se mezcló 1350 μL de agua, 125 μL de solución amortiguadora de fosfatos (KHPO_4 , 100 mM, pH 7), 24.5 μL de H_2O_2 (50 mM), 500 μL de pirogalol (50 mM) y 500 μL del extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó por 1 min a 25°C , y la reacción se detuvo con la adición de 250 μL H_2SO_4 (5%v/v). Para el blanco, se mezclan todos los reactivos especificados anteriormente y en el mismo orden, sólo que la reacción se detiene inmediatamente después de agregar el volumen de extracto y se incubaba.

La actividad se determinó por espectrofotometría a 420nm. Una unidad de actividad de POX se define como la concentración de enzima necesaria para incrementar 0.1 unidades de absorbancia por minuto. La actividad de específica de POX se expresa como U de POX mg^{-1} proteína.

7.2.5. Determinación de la actividad antioxidante no enzimática

7.2.5.1. Determinación de carotenoides totales

Para la cuantificación de carotenoides totales, se utiliza el protocolo de Vidusi *et al.* (1996). La técnica se fundamenta en la extracción de estos compuestos liposolubles que se localizan en las membranas celulares con solventes orgánicos como hexano o acetona. Se pesaron 5 mg de biomasa y se colocó en un tubo de vidrio limpio con tapón de rosca, el cual se cubrió con papel aluminio para evitar la fotooxidación.

Se añadió 1 mL de acetona al 100% grado HPLC y 0.5 mL de NaCl 4 M, se homogenizó en vortex durante 1 minuto con la máxima velocidad para permitir la resuspensión celular y la extracción de los pigmentos. Se sonicó en baño de hielo por 20 minutos y las muestras se dejaron extrayendo a -10°C durante 16 horas. Después de incubar, se adicionó 2 mL de agua HPLC y 1 mL de hexano 100%, se sonicó nuevamente en las condiciones anteriores y se centrifugó a $2,215 \times g$ por 10 minutos a 15°C para formar las dos fases. La fase superior (hexano) se separó con pipeta Pasteur limpia y se colocó en otro tubo también limpio y protegido de la luz. Se hicieron lavados hasta que la fase superior quedó transparente. Se secó el extracto con nitrógeno gaseoso y agregó 3 mL de acetona al 100% y finalmente se leyó en el espectrofotómetro a 480 y 510nm.

La concentración de carotenoides totales se calculó mediante la ecuación propuesta por Strickland y Parsons (1972). Los resultados se expresan en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto.

7.2.5.2. Determinación de ficobiliproteínas

Para la determinación de la concentración de las ficobiliproteínas, se utiliza la técnica propuesta por Lawrenz *et al.* (2011). Las ficobiliproteínas o ficobilinas son pigmentos hidrosolubles que se encuentran asociados a la membrana tilacoidal. Para su extracción se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos en frío acompañada de pasos de ruptura de la membrana por congelamiento-descongelamiento. Se pesaron 5 mg de biomasa liofilizada y se le adicionó 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (K_2HPO_4 : KH_2PO_4) 100 mM pH 6. Se homogenizó con vortex durante 1 minuto y se congeló a -20°C por 2 horas. Después se descongeló a 5°C por 48 horas y sonicó durante 15 minutos. El extracto se separó por centrifugación a $2,215 \times g$, 10°C durante 15 minutos y se colocó en un tubo limpio y protegido de la luz (tubo 1).

La pastilla celular se resuspendió en otros 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos y se dejó extrayendo (48 h a 5°C), se centrifugó y se colocó el extracto junto al del tubo 1. La cantidad de ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina, se determinó espectrofotométricamente a 562, 615 y 652nm respectivamente, aplicando las ecuaciones propuestas por Siegelman y Kycia (1978). Calibrando el blanco con solución amortiguadora de fosfato de fosfatos. Los datos se expresaron en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto.

7.2.5.3. Determinación de vitamina C

El contenido de vitamina C en las cianobacterias se determina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando el protocolo adaptado de Carvajal *et al.* (1997) y Ledezma-Gairaud (2004). A partir de 500 mg de biomasa liofilizada, se extrajo con 1 mL de la solución de extracción (ácido metafosfórico al 3%, ácido acético al 8% y EDTA al 0.01 M). Las muestras se homogenizaron, se dejaron reposar 40 min en frío y protegidas de la luz. Posteriormente, se centrifugaron a

2,215 x g por 15 min a 4°C y el extracto obtenido se filtró con membranas de celulosa de 0.45 µm. Se inyectaron 10 µL de cada muestra en el HPLC, acondicionada con una columna BDS HYPERSYL C8 de 250 mm de longitud x 5 µm diámetro externo x 4.6 mm de diámetro interno. Para el sistema de separación se utilizó un gradiente empleando 2 fases móviles, agua desionizada pH 2.4: H₂SO₄: acetonitrilo (grado HPLC). Todos los resultados se obtuvieron a 245 nm. Para los cálculos, se realizó una curva de calibración utilizando ácido L-ascórbico de 5 a 200 ng µL⁻¹, con la que se generó la ecuación de la recta mediante gráficos de área y concentración derivados de la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico mg⁻¹ peso seco.

7.2.5.4. Determinación de vitamina E

Para la cuantificación de vitamina E, se pesó 500 mg de biomasa liofilizada a los cuales se les añadió 1 g de Na₂SO₄ anhidro, 7 mL de hexano, 4 mL de etanol (grado HPLC) y 2 mL de agua destilada. Se homogenizó por 1 minuto, y después se le añadió 200 µL de butilhidroxitolueno (BHT, 12.5% p/v en acetona). Las muestras se centrifugaron a 2,200 x g durante 15 minutos a 25°C. Se separaron las dos fases obtenidas, el extracto y la pastilla celular. La pastilla celular se lavó con 7 mL de hexano, se agitó en un vortex por 30 segundos y se centrifugó una vez más en las mismas condiciones. Se recuperó el extracto y se mezcló con el obtenido anteriormente. La mezcla final de extracto se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso. El extracto concentrado se resuspendió en 12 mL de etanol, 800 µL de pirogallol (1% p/v) y 2 mL de KOH (50%p/v), se mezcló y se colocó en baño de agua a 65°C por 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se enfrió en baño de hielo para detener la reacción. A cada muestra se le añadió 800 µL de BHT (12.5% p/v en acetona), 7 mL de hexano, 5 mL de agua desionizada y se agitó durante 10 segundos para un nuevo lavado. Se recuperó el extracto y se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso. Posteriormente, la muestra se resuspendió en 200 µL de acetonitrilo. Las muestras se filtraron con membranas de acetato de

celulosa de 0.45 μm de porosidad. Durante todo el protocolo, las muestras se mantuvieron protegidas de la luz.

Se inyectaron 10 μL de la muestra en el HPLC (Alava *et al.* 1993) acondicionado con una columna BDS HYPERSYL C8: 250 mm de longitud x 5 μm diámetro externo x 4.6 mm de diámetro interno. El sistema de separación consistió de acetonitrilo (grado HPLC al 100%). Las condiciones del HPLC fueron: detector de UV a 280 nm, flujo de 1 mL min^{-1} . Se realizó una curva de calibración utilizando α -tocoferol en un rango de concentración de 5 a 200 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Los cálculos se realizaron utilizando la ecuación de la recta derivada de la curva de calibración. Los resultados se expresaron como μg de α -tocoferol mg^{-1} peso seco.

7.2.5.5. Determinación de compuestos fenólicos totales

Para extraer los compuestos fenólicos totales se pesaron 250 mg de biomasa liofilizada y se les adicionó 2.5 mL de solución de agua: metanol: acetona (5:3:2) en frío y protegiéndolas de la luz. Se homogenizó en vortex durante 2 minutos y se incubó en agitación por 1 hora a 25°C. Después de la incubación se filtró con jeringas y membranas de acetato de celulosa de 0.45 μm de porosidad. El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Dicho método se fundamenta en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes.

El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reacciona con cualquier fenol. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotungstínico en óxidos, cromógenos de color azul intenso de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional la coloración al número de grupos hidroxilo de la muestra.

En una microplaca se mezcló una alícuota de cada uno de los extractos hidroalcohólicos (10 μL) con 15 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 v/v); se incubó durante 1 min y posteriormente se adicionó 100 μL de la solución de

carbonato de sodio (Na_2CO_3 , al 2% p/v) y 100 μL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH , al 0.4% p/v). La mezcla de reacción se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz antes de leer la absorbancia a 760 nm en un lector de microplacas.

Previamente, se generó la curva de calibración utilizando ácido gálico en un gradiente de concentración de 0.05 a 1 mg mL^{-1} . El contenido de fenoles de cada muestra se expresó en $\mu\text{g mg}^{-1}$ de peso seco, basándose en la curva de calibración del material de referencia de ácido gálico.

7.2.6. Determinación de la condición fisiológica de las cianobacterias

7.2.6.1. Determinación de la producción de radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Este método fotométrico indirecto y discontinuo mide la tasa de producción endógena de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a través de la cuantificación de la reducción de ferricitocromo *c* por el $\text{O}_2^{\bullet-}$ durante un intervalo de tiempo fijo (Markert *et al.*, 1984; Drossos *et al.*, 1995).

Se pesaron 100 mg de biomasa fresca y se le adicionó 1 mL de solución amortiguadora de Krebs: NaCl (118 mM), KCl (4.7 mM), MgSO_4 (1.2 mM), NaH_2PO_4 (12 mM), NaHCO_3 (31.5 mM), glucosa (1 mM). Posteriormente se adicionó 1 mL de solución de citocromo *c* (15 μM). Los tubos se taparon e incubaron en baño de agua a 37°C durante 15 minutos en agitación. Transcurrido el tiempo, se retiraron los tubos del baño de agua y se les adicionó 1 mL de solución de N-etilmaleimida (30 mM) para detener la reacción (evitar que el citocromo *c* continúe reduciéndose). Se centrifugó a 2,200 x *g* a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a una celda de plástico y se leyó a una absorbancia de 550 nm calibrando al aire.

Se retiró el remanente del sobrenadante de los tubos y se adicionó 1 mL de solución amortiguadora de Krebs, 1 mL de solución de N-etilmaleimida (30 mM) y 1 mL de solución de citocromo *c* (15 μ M). Los tubos se taparon, se homogenizaron en vortex y se incubaron por 15 minutos a 37°C. Los tubos se retiraron y se centrifugaron a 2,200 $\times g$ a 4°C durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a una celda de plástico y se leyó la absorbancia a 550 nm calibrando al aire. Para el cálculo de la producción del radical, se utilizó el coeficiente de extinción por el cambio de ferricitocromo a ferrocitocromo que es 21 nmol. Los resultados se expresaron en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} .

7.2.6.2. Determinación de lípidos totales

La determinación de lípidos totales, se basa en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas.

Para la extracción de lípidos totales, se utiliza el protocolo propuesto por Bligh y Dyer (1959). A partir de 5 mg de biomasa liofilizada se realizó la extracción agregando 3 mL de una mezcla de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0.6) y 5 μL de BHT preparada a una concentración de 1 mg mL^{-1} en CHCl_3 . La mezcla se sonicó 15 minutos en un baño de agua con hielo. Las muestras se incubaron a 4°C y protegidos de la luz durante 24 horas, para asegurar la extracción completa de los lípidos. Transcurrido el tiempo, se sonicó nuevamente en frío 15 minutos, se agregó 2 mL de agua destilada y se centrifugó a 2,215 $\times g$ por 10 minutos a 5°C. El extracto cloroformo: lípidos se recuperó con pipeta Pasteur y se colocó en otro tubo. A la pastilla celular se le agregó 1 mL de CHCl_3 , se recuperó el extracto y se colocó en el tubo anterior y se procedió a la cuantificación de lípidos totales.

Para la cuantificación de lípidos totales, se utilizó el método de calcinación de Marsh y Weinstein (1966). A partir de los lípidos totales extraídos, se tomó una alícuota (que se calculó con base en la concentración media de la curva de calibración) y se concentró a sequedad con nitrógeno gaseoso. Posteriormente, se le añadió 2 mL de H₂SO₄ concentrado, se selló el tubo con papel aluminio y se cerró con la tapa. La mezcla se calentó a 200 ± 2°C en una estufa por 15 minutos. Pasado el tiempo, se sacaron las muestras y se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente y después se colocaron en un baño de agua con hielo durante 5 minutos. Enfriada la muestra, se le agregó 3 mL de agua destilada y se mezcló con vortex, verificando que la mezcla quedara homogénea y sin residuos de materia orgánica.

Finalmente se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 375 nm, el equipo se calibró con un blanco de ácido sulfúrico que se trató de igual manera que las muestras. Previamente se realizó la curva de calibración utilizando tripalmitina como estándar en un rango de concentración de 30 a 180 µg mL⁻¹. De la curva de calibración se obtuvo la ecuación en donde la pendiente (m) de la curva corresponde al factor de corrección que se utilizó en los cálculos. Los datos se expresaron en % con respecto al peso seco.

7.2.6.3. Determinación de ácidos grasos

Para la extracción y cuantificación de ácidos grasos es necesario preparar derivados no reactivos de éstos, es decir, metil-ésteres. Los ácidos grasos se extrajeron utilizando una mezcla de solventes con ácido clorhídrico y se transformaron por una reacción de transesterificación a metil-ésteres, en la cual un mol de triglicérido es desplazado por tres moles de otro alcohol (metanol) en condiciones ácidas (Sato y Murata, 1988).

A partir de los lípidos extraídos anteriormente, se sometió a una reacción de metanólisis (o derivatización), en el cual se adicionó 2.5 mL de una mezcla de HCl: CH₃OH (5% v/v) y se colocaron en un baño a 85°C por 2.5 horas. Pasado ese tiempo, se sacaron las muestras y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los metil-ésteres obtenidos de la reacción, se extrajeron con 1.5 mL de hexano (grado HPLC) y con una pipeta Pasteur limpia, se tomó la fase superior y se colocó en un tubo. La mezcla se lavó una segunda vez con 1.5 mL de hexano (grado HPLC); nuevamente se separó la fase superior y se colocó en el tubo anterior. Los ácidos grasos metilados se colocaron en un vial de 2 mL de capacidad y se le cubrieron con la tapa de aluminio que contiene teflón.

Los viales se colocaron en carrusel del GCMS y se procedió a inyectar. Previamente se realizó la curva de calibración con una mezcla comercial de 37 ácidos grasos metilados. Para la separación de los ácidos grasos metilados en el GCMS, se utilizó una columna capilar OMEGAWAX 250 (SUPELCO) cuyas dimensiones son: 30 m longitud x 0.25 mm diámetro externo x 0.25 µm diámetro interno. Las condiciones del GCMS fueron: volumen de inyección: 1 µL, gas portador: He (pureza 99.997%), flujo de He en la columna: 0.9 mL min⁻¹, inyección sin división (splitless), temperatura del inyector: 250°C, temperatura del detector 260°C. El programa del GCMS fue: temperatura inicial del horno 110°C durante 3 minutos, incremento de 30°C minuto⁻¹ hasta 165°C, se mantiene a esa temperatura 2 minutos y posteriormente se incrementa 2.2°C minuto⁻¹ hasta 209°C. Se mantuvo a esa temperatura 35 minutos. El método de adquisición de espectros de masas es: retardo del solvente: 4.5 minutos, rango de masas: 45-450 unidades de masa atómica (uma), tiempo entre barridos 0.5 minutos. La identificación de cada ácido graso se realizó comparando los tiempos de retención de los ácidos grasos de la curva de calibración, y se corroboró mediante la identificación de los iones característicos de los espectros de masas de cada grupo de ácidos grasos.

La cuantificación se realizó considerando la pendiente de cada uno de los ácidos grasos de la curva de calibración, en donde el área de cada pico de ácido graso es directamente proporcional a la concentración de ese ácido graso de la curva de calibración. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco.

7.2.6.4. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos resultantes de la peroxidación de la membrana celular reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y forman malonaldehído (MDA) de color rosa cristalino con absorción máxima entre 532-536 nm.

La cuantificación de TBARS se realizó mediante el protocolo propuesto por Persky *et al.* (2000). Del extracto enzimático para cuantificar SOD y CAT, se colocó 250 μL en tubos eppendorf y se incubaron en baño de agua a 37°C con agitación durante 15 minutos. Después de la incubación, se colocaron en baño de hielo y se detuvo la reacción adicionando a cada tubo 250 μL de solución para detener el ensayo (ácido tricloroacético (TCA), HCl (1mol L^{-1})). Después de detener el ensayo se adicionó 500 μL de TBA al (1% p/v). Se homogenizó en vortex e incubó en baño con agua a 90°C con agitación durante 10 minutos. Los tubos se retiraron del baño y se colocaron en hielo por 5 minutos para enfriarlos. Se centrifugaron a $2,200 \times g$ a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a una celda de plástico y se leyó la absorbancia a 532 nm, calibrando el espectrofotómetro al aire.

Para el cálculo de TBARS se realizó una curva de calibración con 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) de 0 a 5 nmoles con 250 μL de solución para homogenizar. Se graficó la absorbancia contra la concentración de la curva estándar. Se calculó la ecuación de regresión lineal de la curva y se obtuvo la concentración de los TBARS en cada muestra a partir de la ecuación de la curva estándar. Los datos se corrigieron por la concentración de proteína en cada muestra y se expresaron en nmol mg^{-1} proteína.

7.2.7. Análisis estadísticos

Todos los análisis de las muestras se realizaron por triplicado. A los datos obtenidos se aplicaron pruebas de normalidad de Kolmogórov-Smirnov y Lilliefors para comprobar el cumplimiento de los supuestos de normalidad. Se evaluaron diferencias significativas en S_{max} en la concentración de vitaminas C y E, $Y(II)$ en T7, eficiencia fotosintética (α), tasa de transferencia de electrones máxima (ETR_{max}), irradiancia de saturación (E_k), irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}), rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) en T6 y T7. Para *Php* vitamina C, eficiencia fotosintética (α), ETR_{max} , E_k , E_{opt} , F_v/F_m en T1, T3, T5 y T7 (días) en los tratamientos +N+PAR y +N+PAR+UVR. Para los tratamientos -N+PAR y -N+PAR+UVR se evaluaron en T4, T8 y T24 (horas) mediante la prueba de t de Student. Además se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), con prueba post-hoc de F de Fisher para comparaciones múltiples en la capacidad antioxidante total, producción endógena de radical superóxido, SOD, CAT, POX, carotenoides totales, ficobiliproteínas (FC, AFC, FE y FBP totales), compuestos fenólicos totales, clorofila a , TBARS, lípidos totales, ácidos grasos, carbohidratos y proteínas totales. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa Estadística v7 (Statsoft, Inc, 19984-2004). En todos los casos el nivel de significancia estadística fue de $\alpha=0.05$.

8. RESULTADOS

8.1. Curvas de crecimiento

Con la finalidad de conocer la curva de crecimiento de las cianobacterias *Php* y *Smax*, las cepas se cultivaron en condiciones de laboratorio bajo los siguientes tratamientos, control con radiación PAR (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno y PAR (-N+PAR), con nitrógeno y radiación PAR más UVR (+N+PAR+UVR) y sin nitrógeno y radiación PAR más UVR (-N+PAR+UVR). Las curvas de crecimiento se determinaron por peso de biomasa total (Figs. 13 y 14).

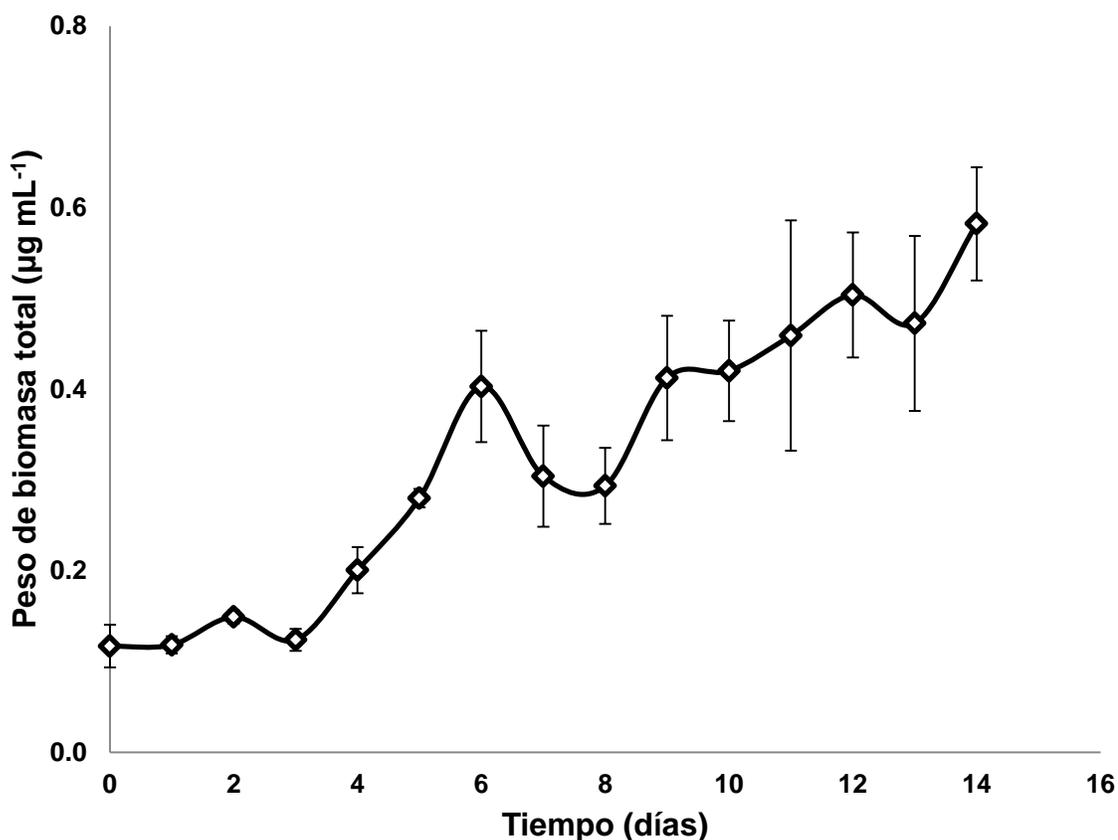


Figura 13. Curva de crecimiento de *Phormidium persicinum* por peso de biomasa total expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada punto representa el valor promedio de réplicas independientes; las barras de dispersión indican desviación estándar.

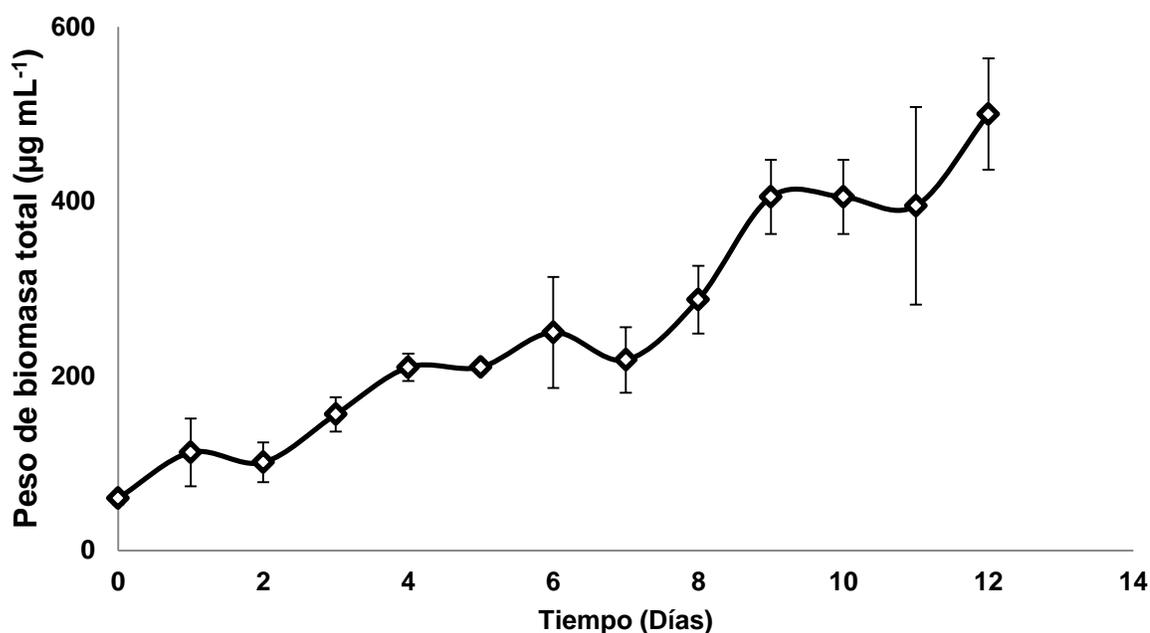


Figura 14. Curva de crecimiento de *Spirulina (Arthrospira) maxima* por peso de biomasa total expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada punto representa el valor promedio de réplicas independientes; las barras de dispersión indican desviación estándar.

De la información generada, se determinó el tiempo de cosecha de los cultivos en condiciones control (+N+PAR) a los 7 días (T7). A partir de ese momento, se iniciaron los cultivos en las condiciones de laboratorio indicadas en Materiales y Métodos para generar biomasa suficiente para los análisis comprometidos en el trabajo. Al inicio de cada cultivo (T0) y al momento de la cosecha (T7) se tomaron alícuotas de 20 mL por duplicado para determinar el peso seco total y el contenido de cenizas (Tabla IV). Los cultivos de cada una de las cepas en condiciones control (+N+PAR) considerando los tiempos en los cuales se tomaron las alícuotas para determinar el peso seco total y las cenizas se muestran en las figuras 15 y 16.



Figura 15. Cultivos de *Phormidium persicinum* en medio F/2 en el control (+N+PAR). A) Inicio (T0) y B) Cosecha (T7).

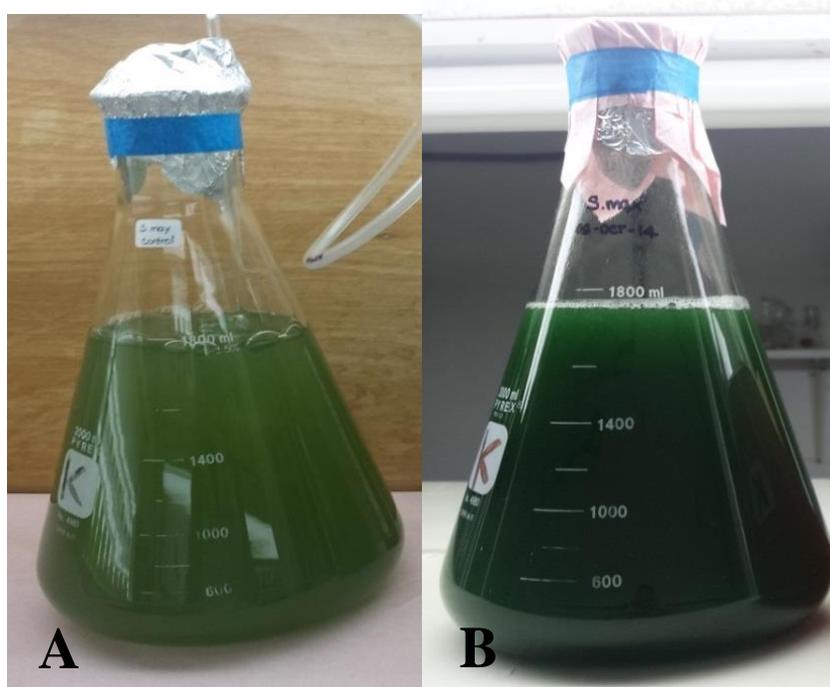


Figura 16. Cultivos de *Spirulina (Arthrospira) maxima* en medio Jourdan en el control (+N+PAR). A) Inicio (T0) y B) Cosecha (T7).

Transcurridos los 7 días, se cosechó la biomasa de ambas cianobacterias. En el caso de *Php*, el cultivo celular se sometió a un cambio de temperatura (de 25°C a 10°C) para permitir la sedimentación de las células, se retiró el sobrenadante y finalmente se eliminó el exceso de medio de cultivo mediante centrifugación a 629 x *g*, 10°C durante 5 minutos. Para *Smax*, se utilizaron tamices de 30 µm de tamaño de poro (Fig. 17). El exceso de medio de cultivo se retiró mediante secado por difusión con papel secante.



Figura 17. Cosecha de la biomasa de *Spirulina (Arthrospira) maxima* con la utilización de tamices.

Para las condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), se realizaron las curvas de crecimiento de ambas cepas y posteriormente el escalamiento del cultivo para la obtención de biomasa. En el caso de *Php*, se tomaron muestras cada 2 horas (datos no mostrados). Los tiempos de cosecha fueron, 28 horas para *Php* y 6 días para *Smax* (Fig. 18).

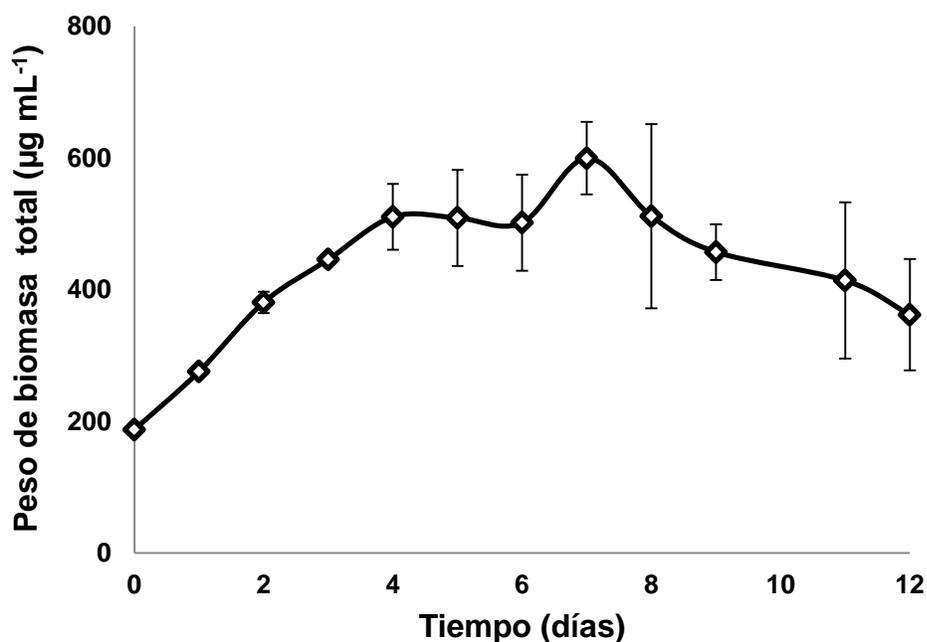


Figura 18. Curva de crecimiento de *Spirulina (Arthrospira) maxima* en deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada punto representa el valor promedio de réplicas independientes; las barras de dispersión indican desviación estándar.

En las figuras 19 y 20 se muestran los cultivos en condiciones control y en deficiencia total de nitrógeno de ambas cepas.

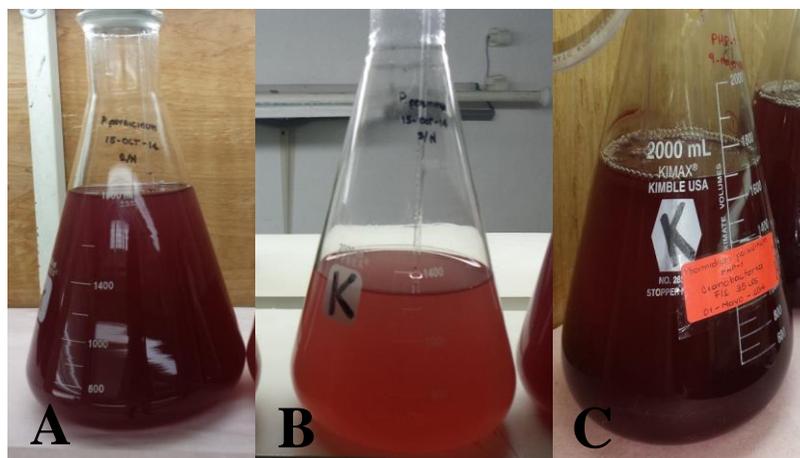


Figura 19. Cultivos de *Phormidium persicinum* en medio F/2. A) A las 28 horas de edad de cultivo en el control (+N+PAR). B) 28 horas de cultivo en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). C) 7 días de cultivo en el control (+N+PAR).

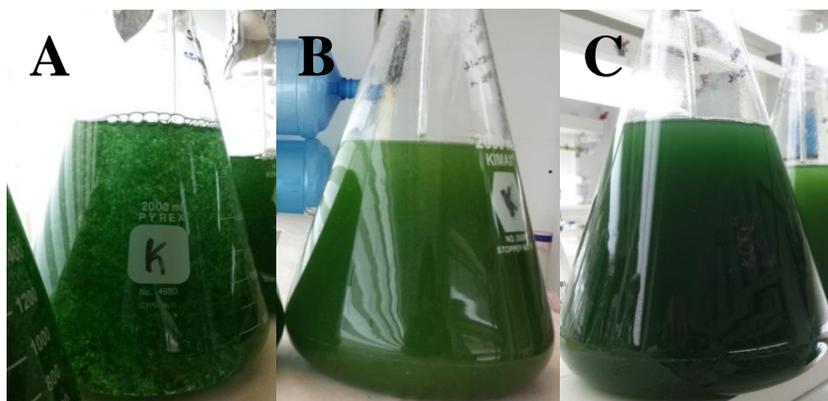


Figura 20. Cultivos de *Spirulina (Arthrospira) maxima* en medio Jourdan. A) Al inicio del cultivo, T0 en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). B) Cultivo a T6 en deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). C) Cultivo a T7 en el control (+N+PAR).

Definidos los tiempos de cosecha de los cultivos de ambas cepas en deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) de *Php* (28 horas) y de *Smax* (6 días), se generaron inóculos para realizar el escalamiento y obtener la biomasa bajo las condiciones antes mencionadas. De la misma manera que en las condiciones control, a T0 y T6, y T0 y T28 se tomaron alícuotas de cada cultivo (20 mL por duplicado) para determinar peso seco total y cenizas (Tabla IV). La cosecha de la biomasa se realizó de la misma forma que en las condiciones control (+N+PAR), esto es, sedimentación en frío y centrifugación (*Php*) y por filtración en tamices (*Smax*).

Durante la estancia en el Laboratorio de Fotobiología y Biotecnología de Organismos Acuáticos (FYBOA) de la Universidad de Málaga, ambas cepas se sometieron a estrés por radiación ultravioleta. Los tratamientos que se probaron fueron nitrógeno con radiación UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con radiación UV (-N+PAR+UVR). Se procedió al escalamiento para obtener biomasa, la cual se cosechó como se mencionó anteriormente y se almacenó a -80°C para su posterior análisis.

8.2. Rendimiento cuántico efectivo *in situ* Y(II)

Durante la fotosíntesis, se presentan 3 procesos que conforman la distribución de la energía (quenching): la conversión de energía de la luz a energía química (Pq), la disipación de energía en forma de calor (NPq) y las emisiones de menor energía en forma de fluorescencia de las moléculas de clorofila (Fq).

A partir de las emisiones de fluorescencia de la clorofila *a* asociada al FSII, se midieron los rendimientos cuánticos efectivos *in situ*, así como las curvas rápidas de luz (RLC) con el fluorómetro WATER-PAM, en los cultivos con los tratamientos: control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). En *Smax*, los valores de rendimiento durante el experimento variaron entre 0.2 y 0.45. Los valores obtenidos el día de la cosecha fueron: 0.272 (+N+PAR), 0.24 (+N+PAR+UVR), 0.22 (-N+PAR) y 0.19 (-N+PAR+UVR) (Fig. 21). Los valores mayores de Y(II) corresponden con los datos que se obtuvieron en la determinación de peso de biomasa total (Tabla IV).

En *Php*, un valor mínimo de 0.2 y un máximo de 0.45 en el rendimiento cuántico efectivo *in situ* fueron encontrados durante el experimento. El día de cosecha, los valores por tratamiento fueron: 0.42 (+N+PAR), 0.42 (-N+PAR), 0.43 (+N+PAR+UVR) y 0.34 (-N+PAR+UVR) (Figs. 22 y 23). En los resultados de peso de biomasa total para estos mismos tratamientos fueron 386.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 231.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 238.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 157.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (Tabla IV). Al igual que en *Smax*, el tratamiento -N+PAR+UVR mostró los valores de rendimiento cuántico efectivo *in situ* y los valores de peso de cultivo más bajos.

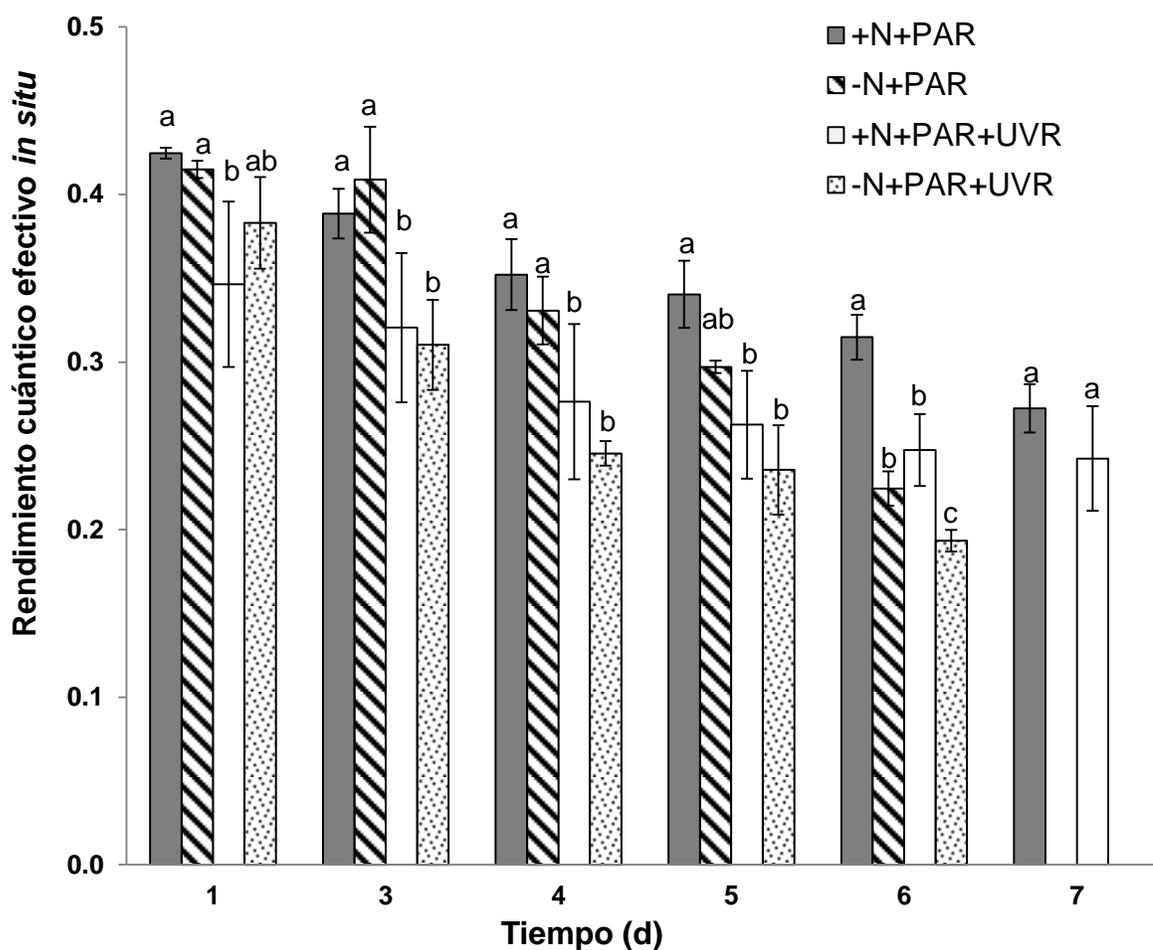


Figura 21. Rendimiento cuántico efectivo *in situ* de *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

En la Tabla IV se muestran los valores de peso de biomasa total al inicio del experimento (T0) y en los tiempos de cosecha en los tratamientos control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR).

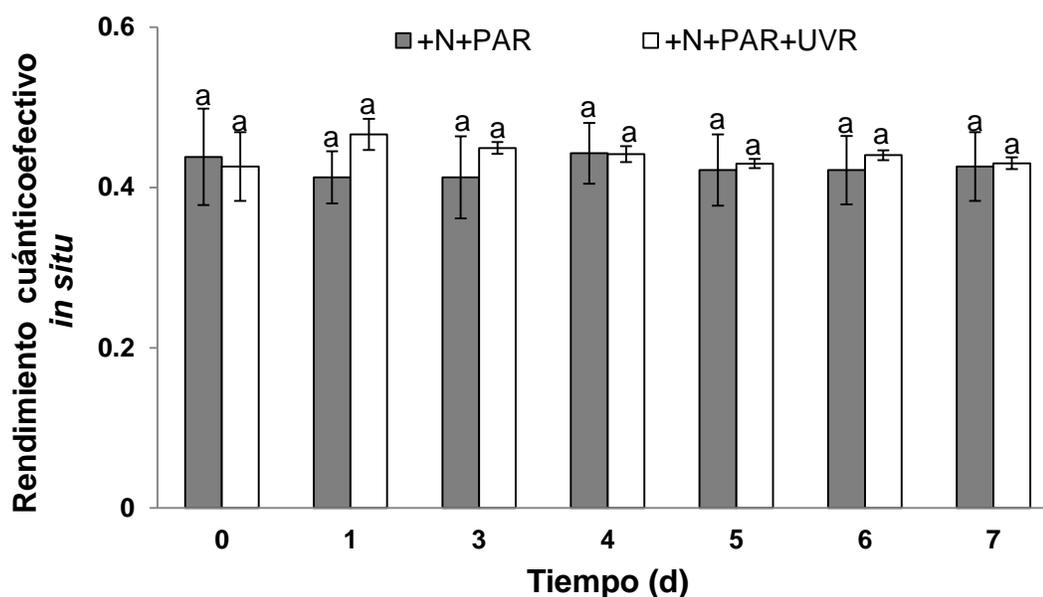


Figura 22. Rendimiento cuántico efectivo *in situ* en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

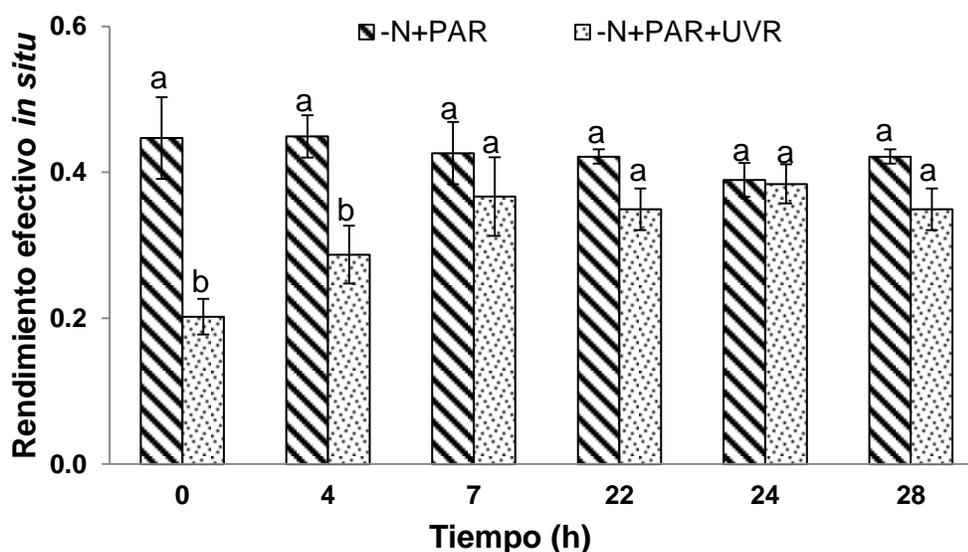


Figura 23. Rendimiento cuántico efectivo *in situ* en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes representan indican significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

Tabla IV. Peso de la biomasa total $\mu\text{g mL}^{-1}$ de *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum* cultivadas en control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR).

CEPA	TRATAMIENTO	Peso del cultivo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
		Inicio	Fin (cosecha)
<i>Spirulina (Arthrospira) maxima</i>	+N+PAR	281.7 \pm 27	769.4 \pm 35
	-N+PAR	187.6 \pm 7	501.9 \pm 73
	+N+PAR+UVR	224.4 \pm 24	698.7 \pm 76
	-N+PAR+UVR	180.6 \pm 8	479.1 \pm 10.3
<i>Phormidium persicinum</i>	+N+PAR	196.3 \pm 21	386.5 \pm 35
	-N+PAR	217 \pm 24	231.2 \pm 32
	+N+PAR+UVR	107.1 \pm 15	238.3 \pm 22
	-N+PAR+UVR	200.9 \pm 61	157.8 \pm 42

8.3. Curvas rápidas de luz (RLC)

8.3.1. Eficiencia fotosintética (α)

En *Smax*, un valor mínimo de 0.01 y un máximo de 0.06 se encontraron en los valores de eficiencia fotosintética en los tratamientos con respecto al tiempo. Al final de cada tratamiento, los mayores valores se obtuvieron en 0.05 (+N+PAR), seguido de 0.03 (-N+PAR+UVR), 0.02 (-N+PAR) y 0.006 (+N+PAR+UVR) (Fig. 24). En *Php*, un mínimo de 0.01 y un máximo de 0.12 en los tratamientos con respecto al tiempo. Al final de cada tratamiento, los valores obtenidos fueron, 0.05 (+N+PAR), 0.01 (-N+PAR), 0.03 (+N+PAR+UVR) y 0.01 (-N+PAR+UVR) (Fig. 25 y 26). Obteniéndose el mismo comportamiento que en la determinación del peso de biomasa total (Tabla IV) donde el valor más elevado fue en el +N+PAR.

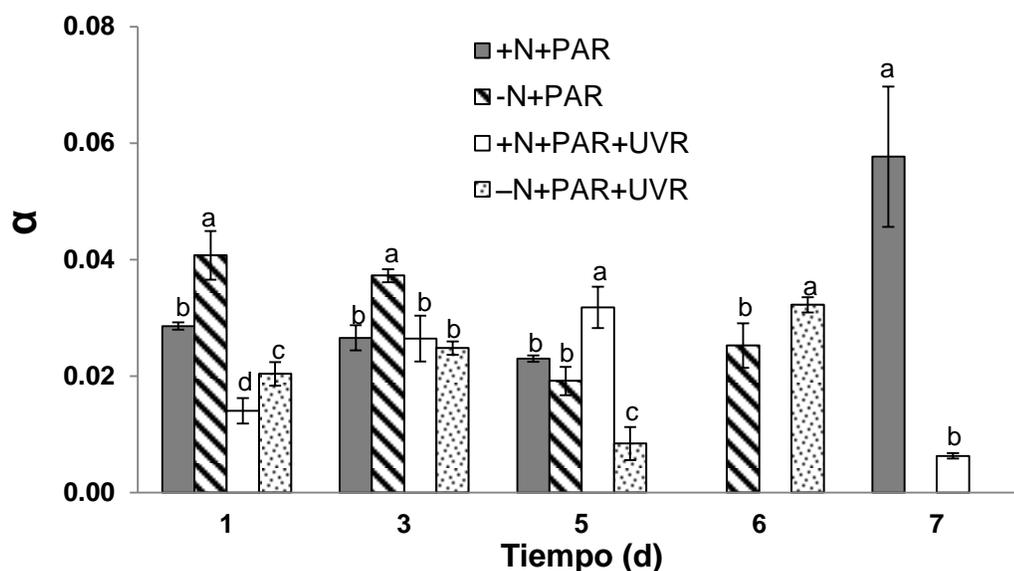


Figura 24. Eficiencia fotosintética (α) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

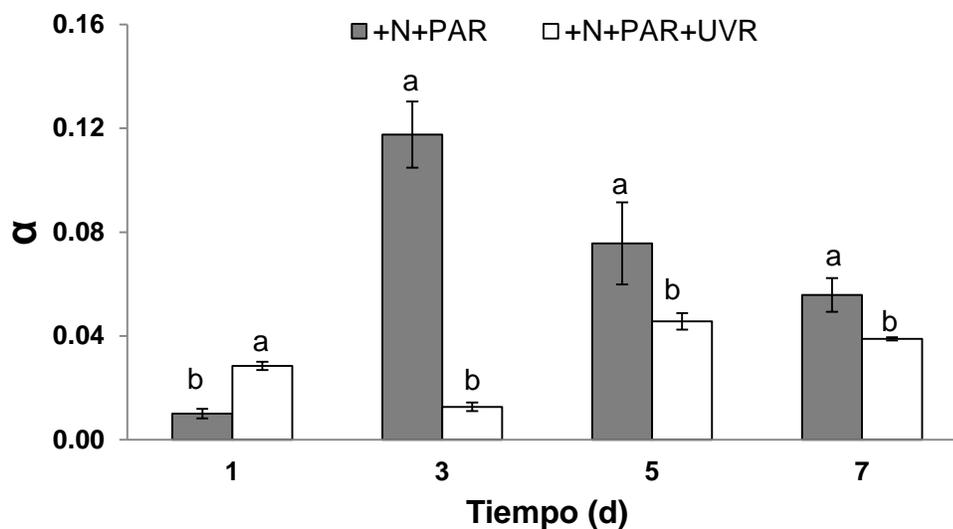


Figura 25. Eficiencia fotosintética (α) en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

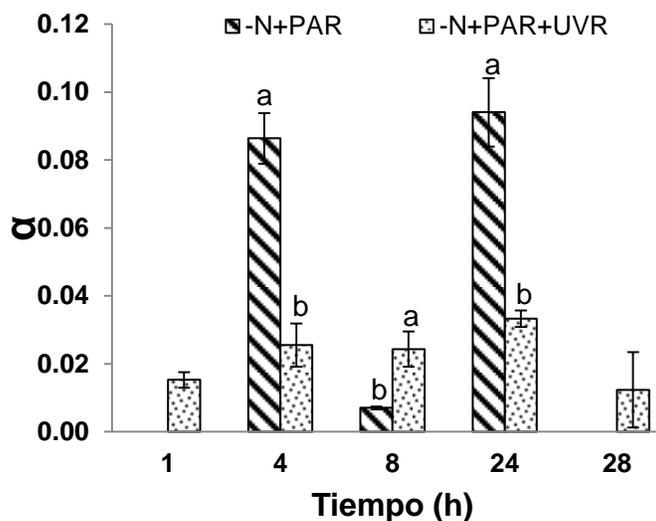


Figura 26. Eficiencia fotosintética (α) *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

8.3.2. Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m)

En *Smax*, el F_v/F_m se encontró un mínimo de 0.33 y máximo de 0.65 en los tratamientos probados. El tratamiento -N+PAR resultó en los valores más elevados en T3, T5 y T6 días. Con radiación UV no variaron significativamente con respecto al control en T3 y T5 días (Fig. 27). En *Php*, se encontró diferencias significativas en +N+PAR+UVR con respecto a +N+PAR en T1 días ($p=0.014$, Fig. 28). En T3, T5 y T7 días no se encontraron diferencias significativas. En los tratamientos en deficiencia de nitrógeno, se encontraron diferencias significativas a las 4 y 8 horas ($p=0.007$ y $p=0.0002$), y a las 24 horas no hubo diferencias significativas (Fig. 29).

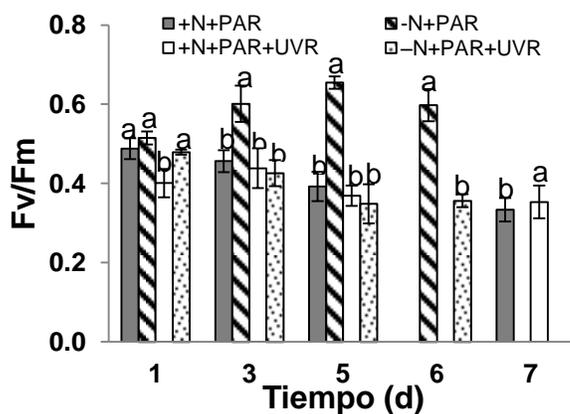


Figura 27. Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR), y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

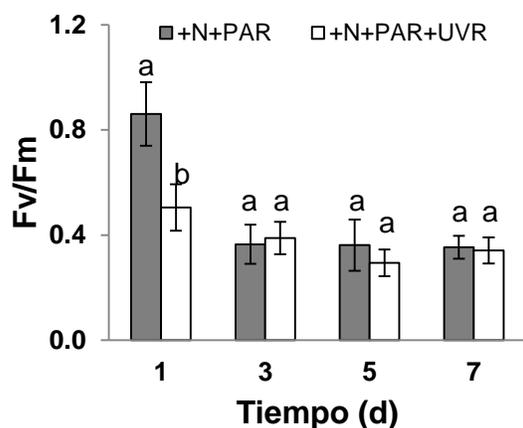


Figura 28. Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

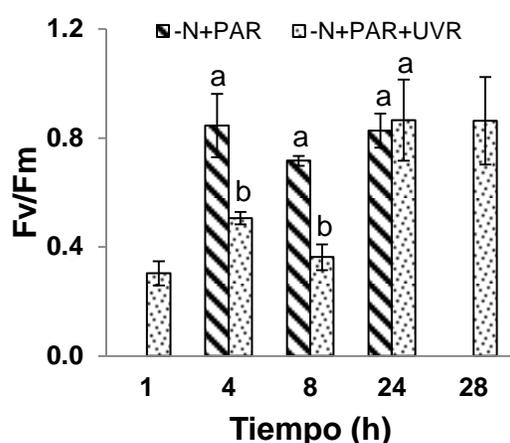


Figura 29. Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

8.3.3. Tasa de transporte de electrones máximo (ETR_{max})

En *Smax*, el ETR_{max} se encontró un mínimo de 0.07 y un máximo de 1.51 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en los días evaluados durante el experimento. Los valores al final de cada tratamiento fueron 1.1 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR), 0.71 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR), 0.07 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR+UVR) y 1.51 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR+UVR) (Fig. 30). En *Php*, el ETR_{max} un valor mínimo de 0.36 y un máximo de 6.69 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ días evaluados durante el experimento. Al final de cada tratamiento se obtuvieron valores de 2.38 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR), 3.91 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR), 1.85 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR+UVR) y 0.43 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR+UVR) (Figs. 31 y 32).

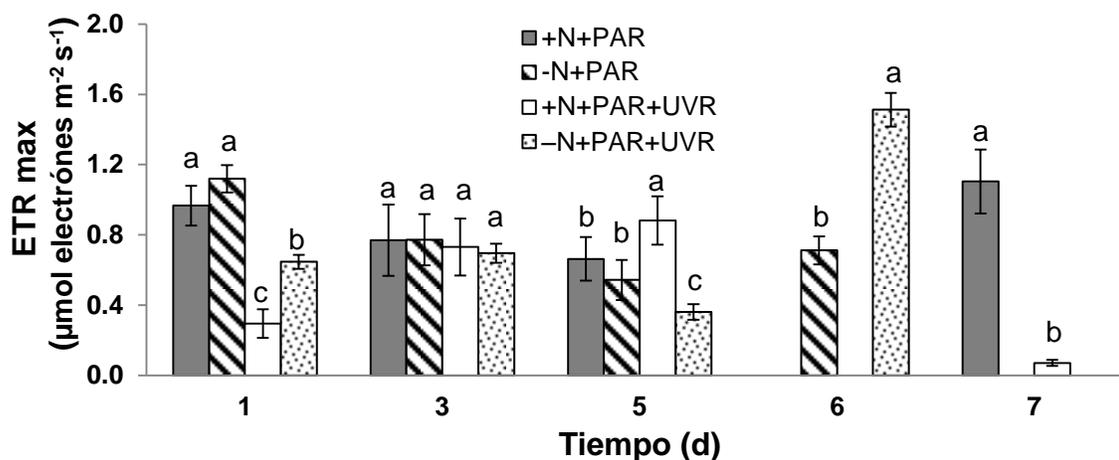


Figura 30. Tasa de transporte de electrones máximo (ETR_{max}) expresado en $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR), y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

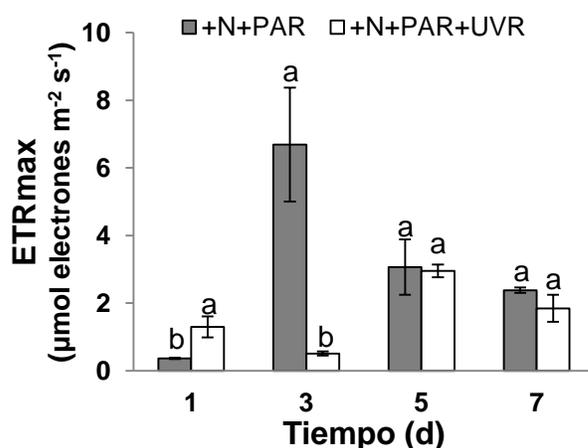
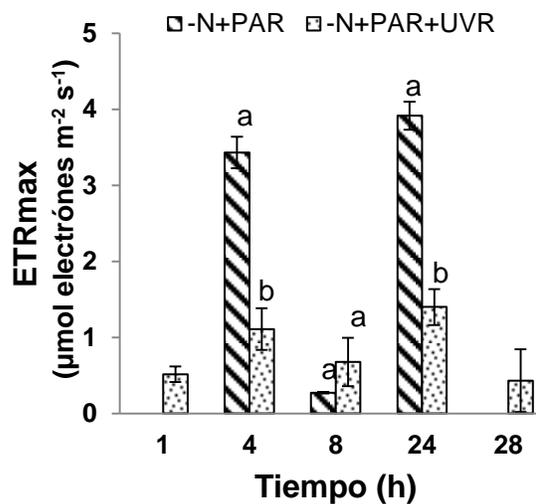


Figura 31. Tasa de transporte de electrones máximo (ETR_{max}) expresado en $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

Figura 32. Tasa de transporte de electrones máximo (ETR_{max}) expresado en $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).



8.3.4. Irradiancia de saturación (E_k)

En *Smax*, el E_k del día 1 al 5 osciló en un rango de 20 a 35 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En T5, -N+PAR+UVR mostró un pico con intensidad de 46.19 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Al final de cada tratamiento los valores obtenidos fueron 19.34 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR), 28.78 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR), 27.72 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR+UVR) y 47.01 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR+UVR) (Fig. 33). En *Php*, no se encontraron diferencias significativas entre +N+PAR y +N+PAR+UVR, los valores de E_k oscilaron entre 37 y 64 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 34). En -N+PAR y -N+PAR+UVR, aumentó de 26.7 a 43.78 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos analizados (T4, 8 y 24h). Los valores al final de cada tratamiento fueron 43.1 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR), 42.05 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR), 47.4 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR+UVR) y 42.56 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR+UVR) (Fig. 35).

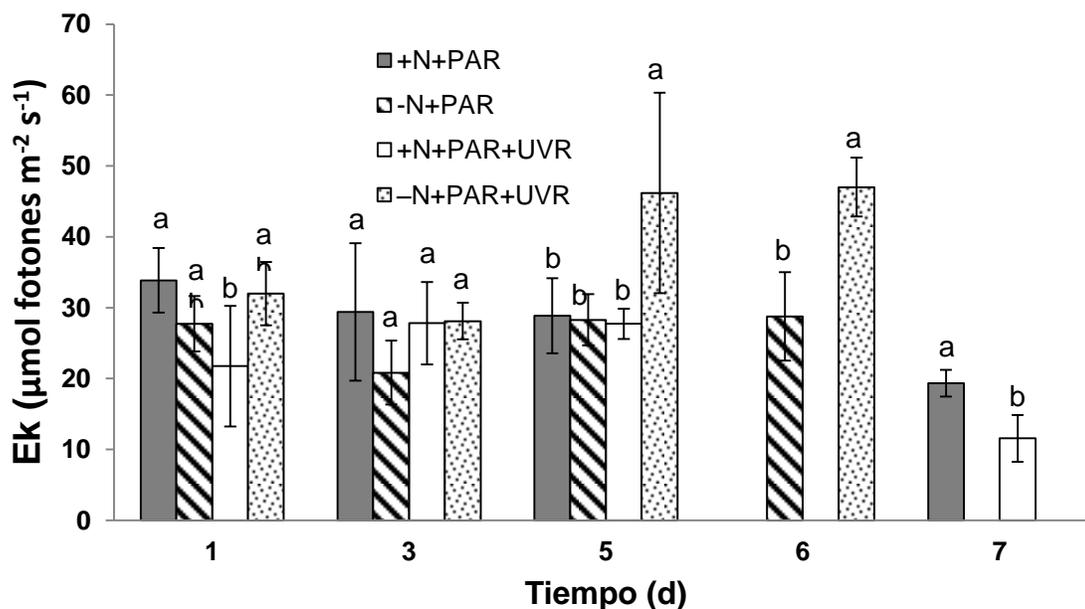


Figura 33. Irradiancia de saturación (E_k) expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

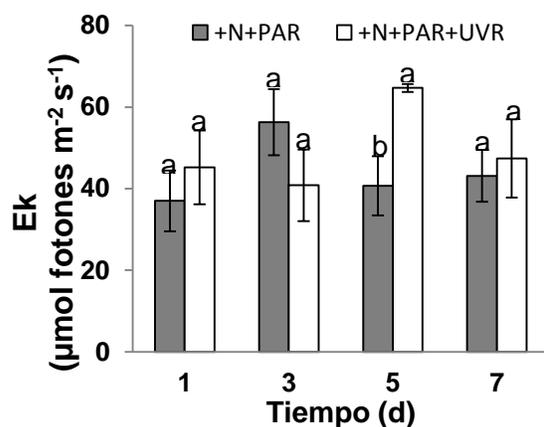


Figura 34. Irradiancia de saturación (E_k) expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

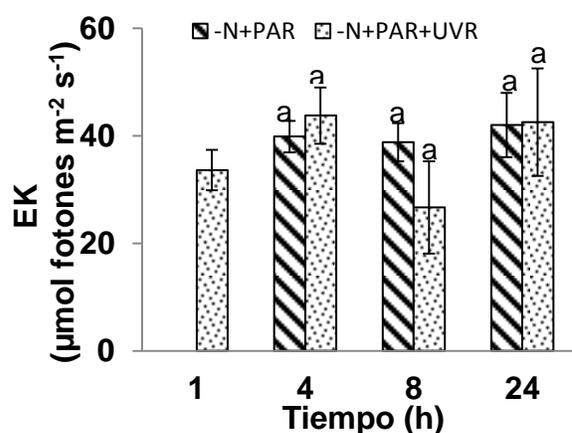


Figura 35. Irradiancia de saturación (E_k) expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

8.3.5. Irradiancia de fotoinhibición (E_{opt})

En *Smax*, la E_{opt} en los tratamientos evaluados varió entre 51.71 y 157.54 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante el tiempo del experimento. No se encontraron diferencias significativas en los tratamientos en los días T1, T3, T5 y T6. En T7 el +N+PAR+UVR fue significativamente mayor con respecto al control (+N+PAR) ($p=0.005$, Fig. 36). Los valores al final de cada tratamiento fueron 51.71 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR), 89.37 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR), 131.51 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+N+PAR+UVR) y 157.54 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-N+PAR+UVR). En *Php*, +N+PAR y -N+PAR variaron entre 89.6 y 141.9 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, +N+PAR+UVR y -N+PAR+UVR variaron entre 63.36 y 104.40 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con respecto al tiempo (Figs. 37 y 38).

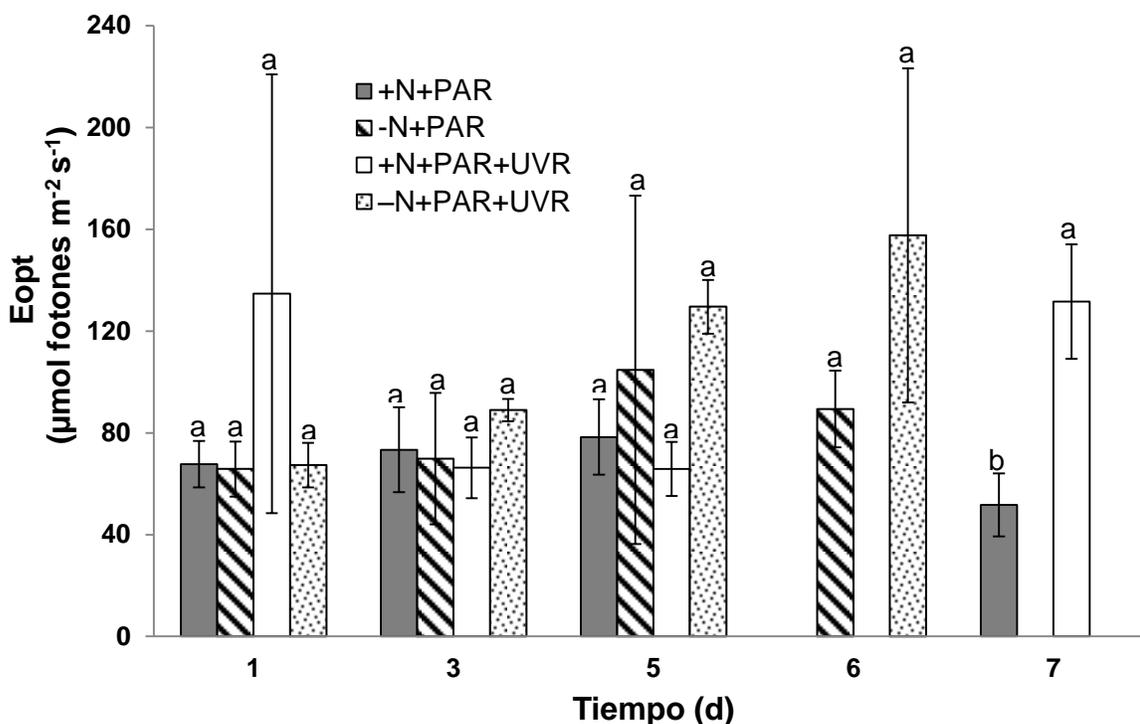


Figura 36. Irradiancia de fotoinhibición expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y IV) deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

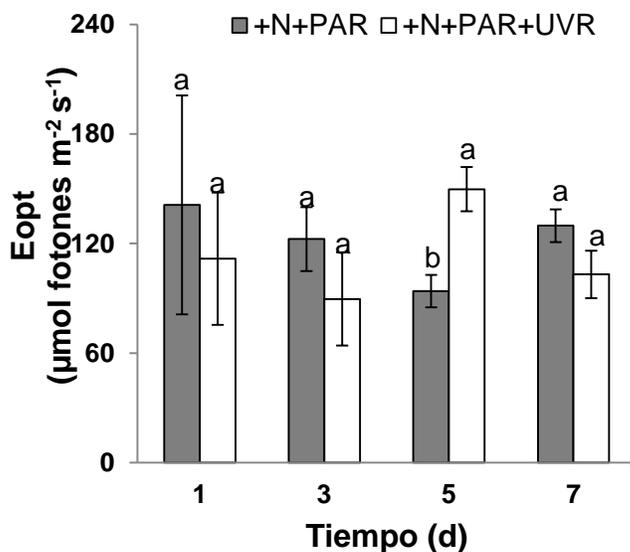


Figura 37. Irradiancia de fotoinhibición expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR) y nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

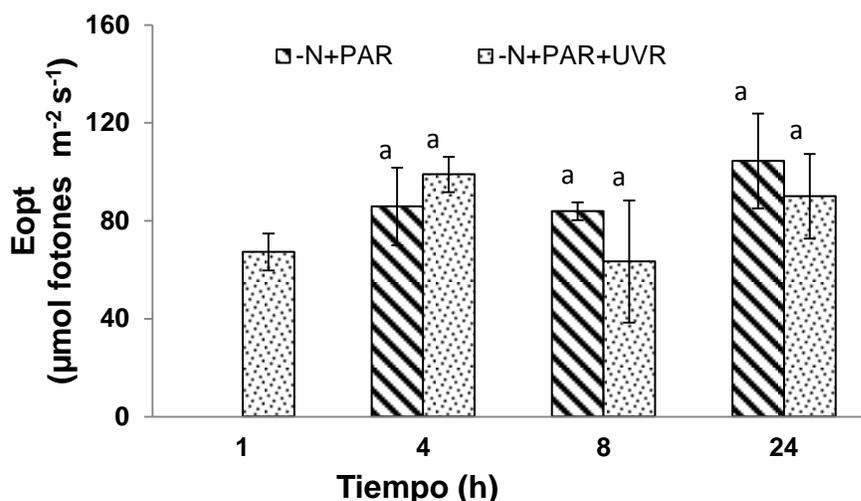


Figura 38. Irradiancia de fotoinhibición expresada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Phormidium persicinum*. Deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

8.4. Capacidad antioxidante total

En *Smax*, la mayor capacidad antioxidante total se observó en +N+PAR (370.45 μM). La deficiencia de nitrógeno y la radiación UV provocaron una disminución significativa del 15, 84.8 y 85.5% de la capacidad antioxidante total en los tratamientos 315.22 μM (-N+PAR), 56.34 μM (+N+PAR+UVR) y 52.76 μM (-N+PAR+UVR), respectivamente, con respecto al control ($p=0.0242$ y $p<0.0001$, Fig. 39). En *Php*, se observaron resultados similares, la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV disminuyeron significativamente la capacidad antioxidante total con respecto al control. Los valores obtenidos fueron 467.44 μM (+N+PAR), 417.63 μM (-N+PAR), 315.14 μM (+N+PAR+UVR) y 341.75 μM (-N+PAR+UVR) ($p=0.0028$ y $p<0.0001$, Fig. 40).

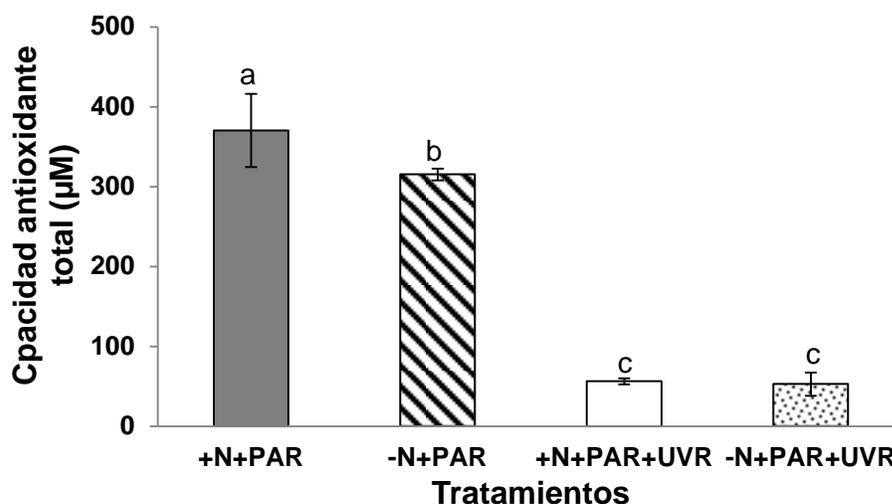


Figura 39. Capacidad antioxidante total expresada en μM de *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

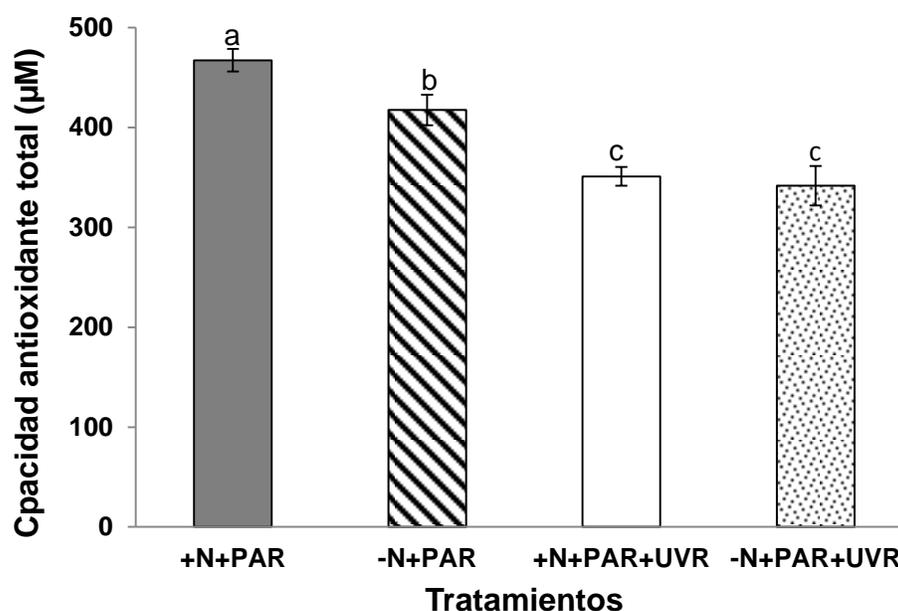


Figura 40. Capacidad antioxidante total expresada en μM de *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.5. Tasa de producción endógena de radical $O_2^{\bullet-}$

En *Smax* la tasa de producción endógena de $O_2^{\bullet-}$, disminuyó significativamente en el tratamiento $-N+PAR$ ($p<0.0001$) y en los tratamientos $+N+PAR+UVR$ y $-N+PAR+UVR$ ($p=0.007$ y $p=0.009$) con respecto al control. Los resultados para cada tratamiento fueron $0.050 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ($+N+PAR$), $0.014 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ($-N+PAR$), $0.015 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ($+N+PAR+UVR$) y $0.016 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ($-N+PAR+UVR$) (Fig. 41).

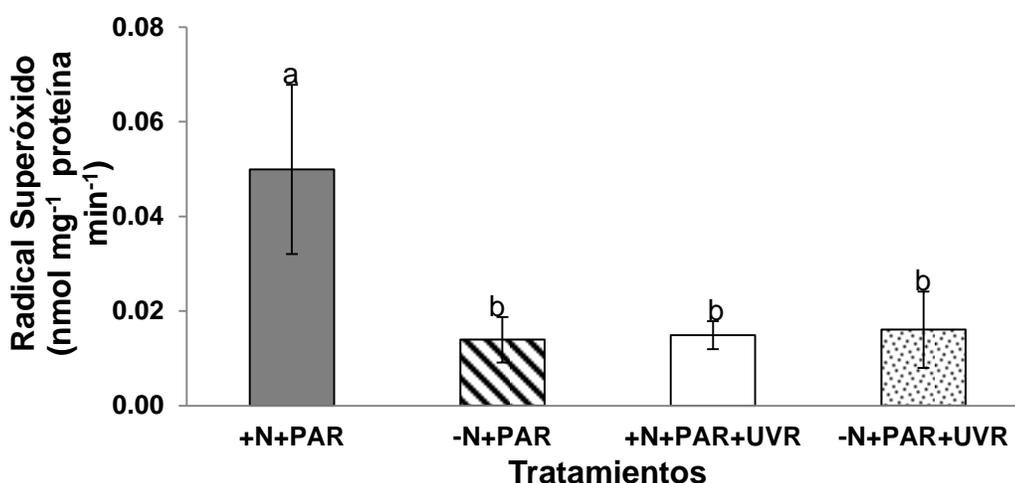


Figura 41. Tasa de producción endógena de radical superóxido en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores están expresados en $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$. Control ($+N+PAR$), deficiencia de nitrógeno ($-N+PAR$), nitrógeno con UV ($+N+PAR+UVR$) y deficiencia de nitrógeno con UV ($-N+PAR+UVR$). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha<0.05$ (F de Fisher).

En *Php*, la tasa de producción endógena de $O_2^{\bullet-}$ aumentó significativamente en el tratamiento $-N+PAR$ ($p=0.0001$), en $+N+PAR+UVR$ ($p=0.0148$) y en $-N+PAR+UVR$ ($p<0.0001$) con respecto al control. Los valores fueron $0.038 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ($+N+PAR$), $0.107 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ($-N+PAR$), $0.082 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ($+N+PAR+UVR$) y $0.164 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ($-N+PAR+UVR$) (Fig. 42).

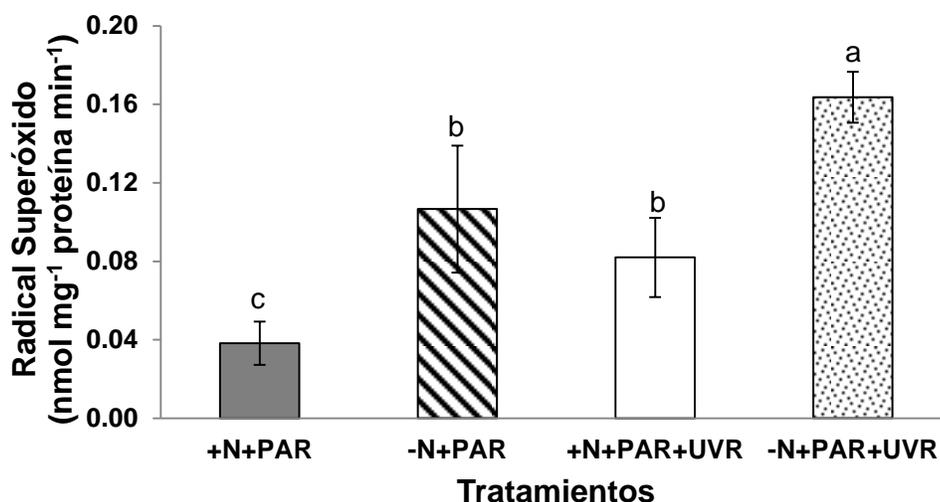


Figura 42. Tasa de producción endógena de radical superóxido en *Phormidium persicinum*. Los valores están expresados en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} . Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.6. Actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y POX)

8.6.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Para investigar el mecanismo de protección contra el estrés oxidativo causado por los tratamientos en las cianobacterias se evaluó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). En *Smax* la actividad de la SOD no se observó un aumento significativo en el tratamiento -N+PAR. En los tratamientos +N+PAR+UVR y -N+PAR+UVR hubo un aumento significativo de 2.6 y 7.8 veces con respecto al control ($p=0.0432$ y $p<0.0001$, Fig. 43). Los valores por tratamiento fueron 20.2 U mg^{-1} proteína (+N+PAR), 38 U mg^{-1} proteína (-N+PAR), 53.9 U mg^{-1} proteína (+N+PAR+UVR) y 158.5 U mg^{-1} proteína (-N+PAR+UVR). Los resultados anteriores coinciden con la disminución en la tasa de velocidad de producción de radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Fig. 41).

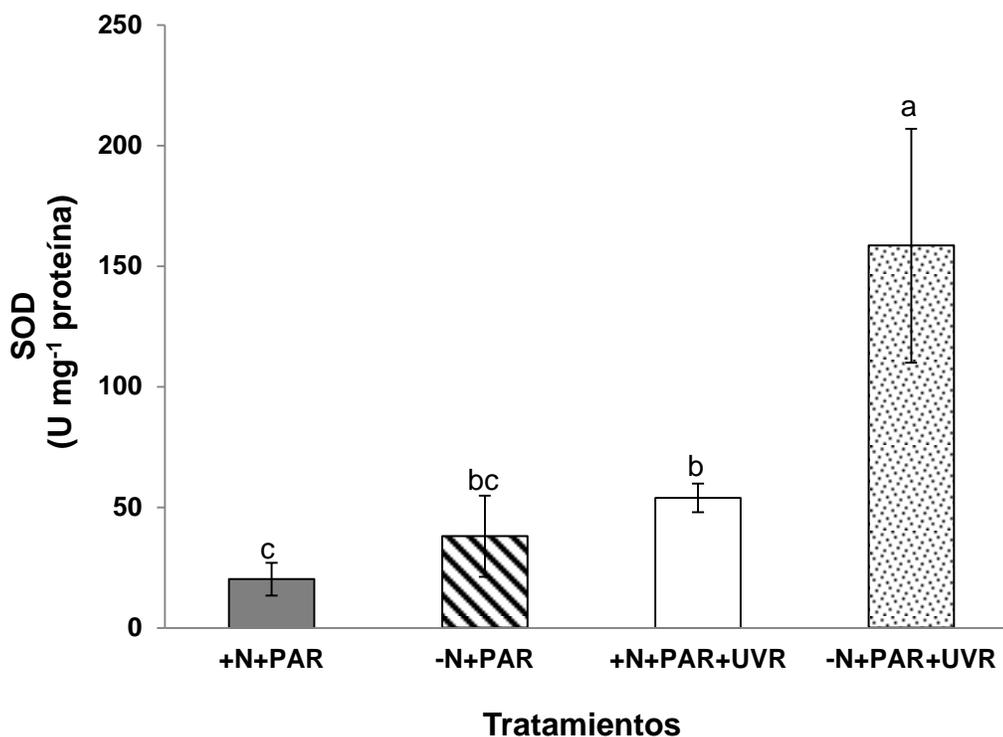


Figura 43. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores son expresados en unidades de SOD mg⁻¹ proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

En *Php*, se observó un aumento significativo ($p=0.0038$) de la actividad de SOD en el tratamiento -N+PAR de un 927% con respecto al control (+N+PAR). La actividad de SOD en los tratamientos con radiación UV no mostró diferencias significativas con respecto al control. Los valores obtenidos por tratamiento fueron 51.6 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR), 530.4 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR), 66.1 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR+UVR) y 102.5 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR+UVR) (Fig. 44). Estos resultados coinciden con el aumento en tasa de producción endógena de radical O₂^{•-} (Fig. 42).

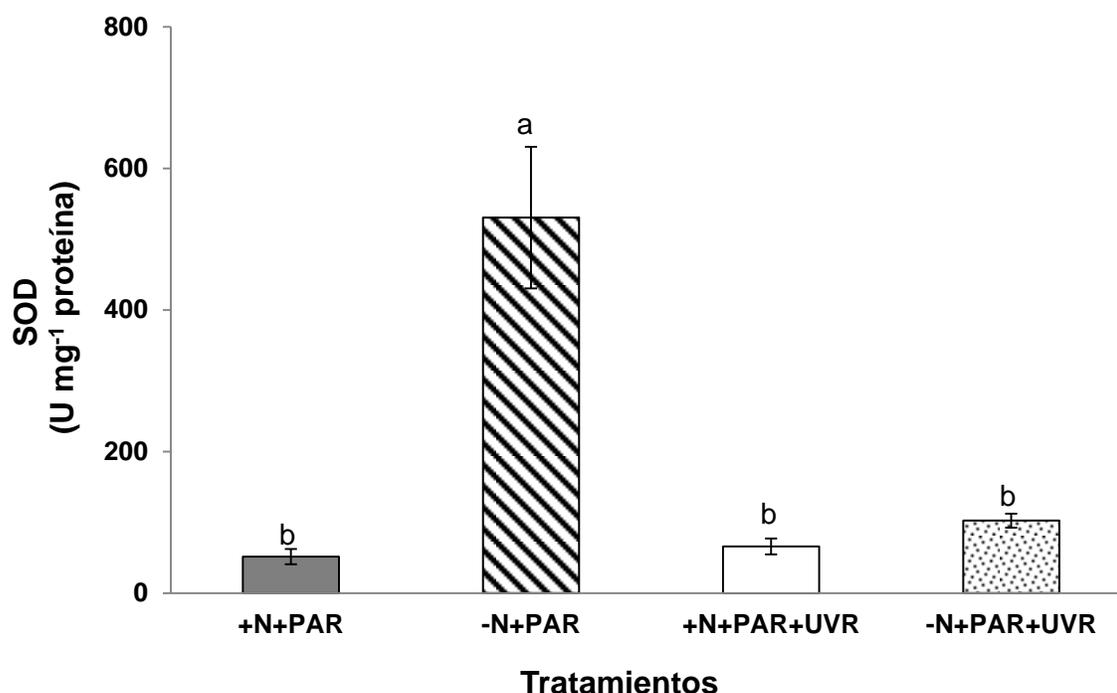


Figura 44. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en unidades de SOD mg⁻¹ proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.6.2. Catalasa (CAT)

En *Smax* no se observaron diferencias significativas en la actividad de CAT con la deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR (-N+PAR) respecto al control. La radiación UV provocó un aumento significativo de la actividad de CAT de 400 y 375% en los tratamientos +N+PAR+UVR ($p=0.0302$) y -N+PAR+UVR ($p=0.0061$) con respecto al control. Los valores para cada tratamiento fueron 7.1 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR), 12.4 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR), 35.6 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR+UVR) y 33.7 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR+UVR) (Fig. 45).

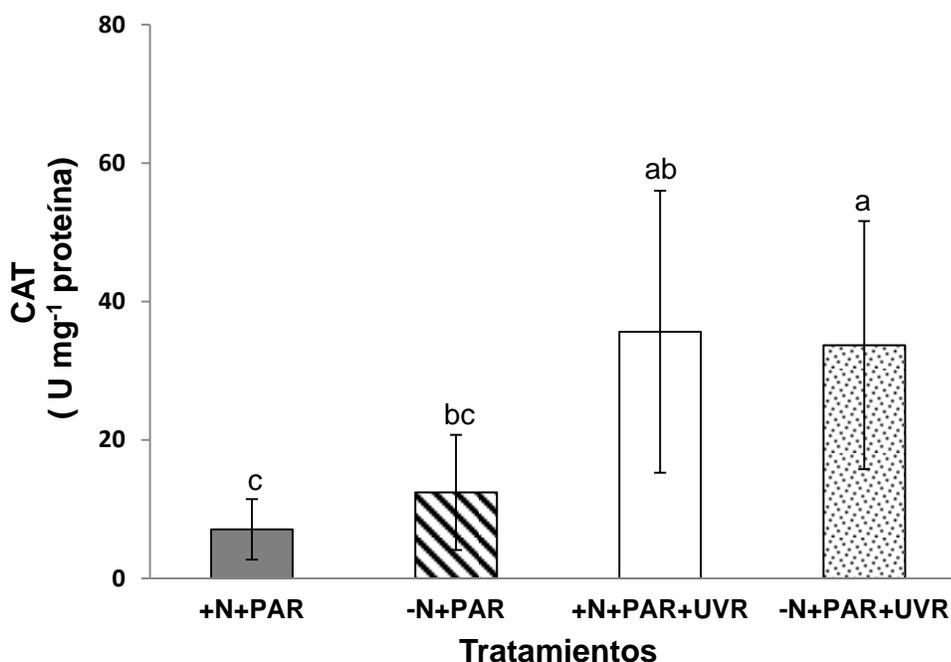


Figura 45. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores son expresados en unidades de CAT mg⁻¹ proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

En *Php* la actividad de CAT aumentó significativamente con la radiación UV independientemente de la presencia o deficiencia de nitrógeno, mostrando incrementos de 2.6 y 5 veces para los tratamientos +N+PAR+UVR ($p=0.0007$) y -N+PAR+UVR ($p < 0.0001$) con respecto al control. Bajo deficiencia de nitrógeno en radiación PAR no se observó un incremento significativo con respecto al control. Los valores para cada tratamiento fueron 10.8 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR), 12.1 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR), 28.8 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR+UVR) y 55 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR+UVR) (Fig. 46).

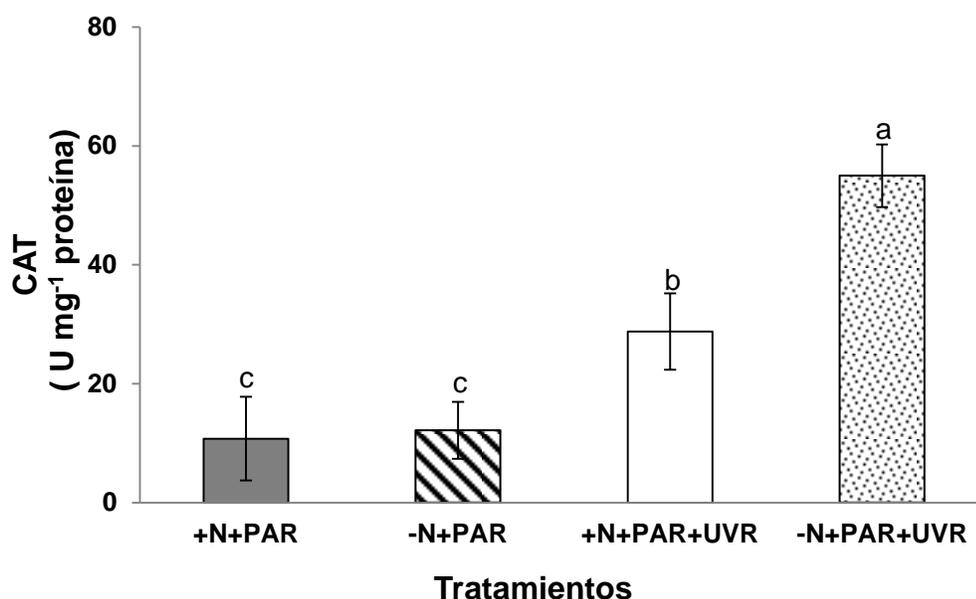


Figura 46. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en unidades de CAT mg⁻¹ proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.6.3. Peroxidasas totales (POX)

La actividad de las peroxidasas totales (POX) se determinó utilizando el H₂O₂ como agente oxidante. En *Smax* independiente de la presencia o deficiencia de nitrógeno, la radiación UV no mostró un aumento significativo de la actividad de las POX. La deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR provocó un aumento significativo ($p=0.0002$) de 4 veces con respecto al control. Los valores por tratamiento fueron 0.011 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR), 0.044 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR), 0.0057 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR+UVR) y 0.014 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR+UVR) (Fig. 47).

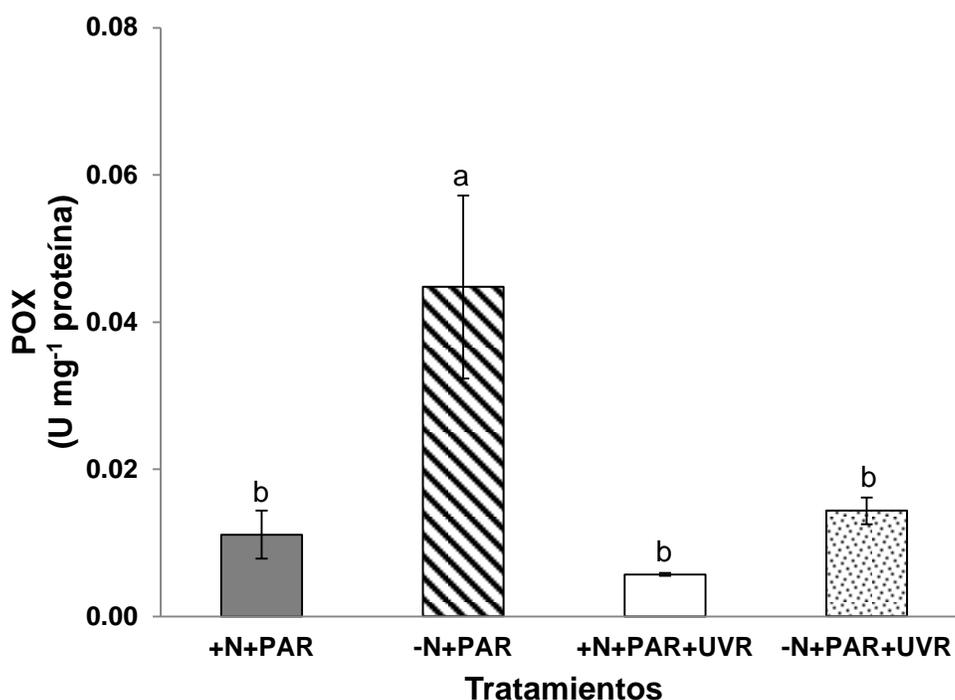


Figura 47. Actividad de las enzimas peroxidasas totales (POX) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores son expresados en unidades de POX mg⁻¹ proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

En *Php*, la deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR provocó un aumento significativo ($p < 0.0001$) de 2 veces la actividad de POX con respecto al control. La radiación UV independientemente de la presencia o deficiencia de nitrógeno, provocó una disminución significativa ($p < 0.0001$) de la actividad de POX con respecto al control. Los valores para cada tratamiento fueron 0.129 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR), 0.248 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR), 0.008 U mg⁻¹ proteína (+N+PAR+UVR) y 0.007 U mg⁻¹ proteína (-N+PAR+UVR) (Fig. 48).

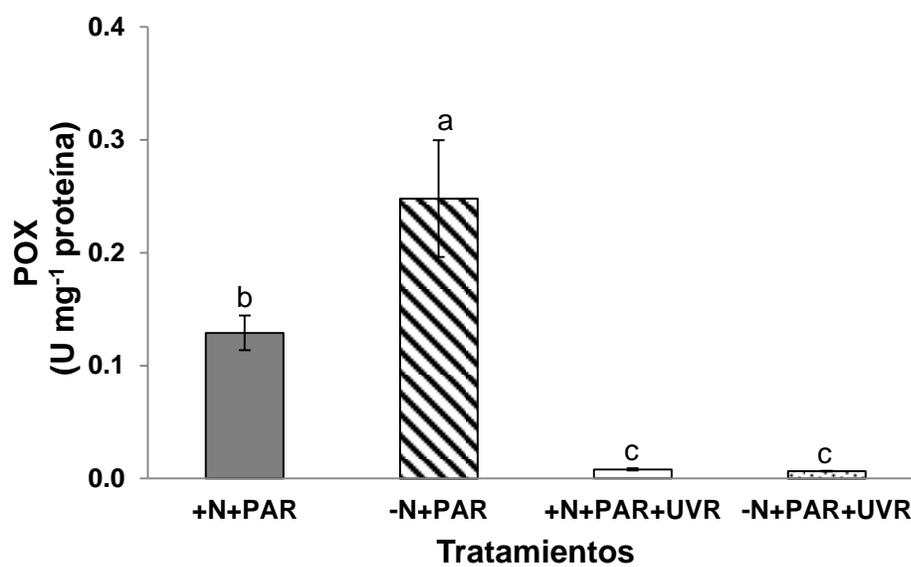


Figura 48. Actividad de las enzima peroxidadasas totales (POX) en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en unidades de POX mg⁻¹ proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UV). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.7. Actividad antioxidante no enzimática

8.7.1. Carotenoides

En *Smax*, el contenido de carotenoides disminuyó significativamente en -N+PAR ($p=0.0001$), +N+PAR+UVR ($p=0.0005$), -N+PAR+UVR ($p<0.0001$) con respecto al control. La concentración por tratamiento fue 3.83 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), 1.29 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), 1.18 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y 0.49 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 49). En *Php* los tratamientos -N+PAR y +N+PAR+UVR provocaron un aumento significativo ($p=0.0018$ y $p=0.0001$) de la concentración de los carotenoides con respecto al control. No se encontraron diferencias significativas en -N+PAR+UVR. Los valores por tratamiento fueron 0.47 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), 1.25 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), 1.63 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y 0.28 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 50).

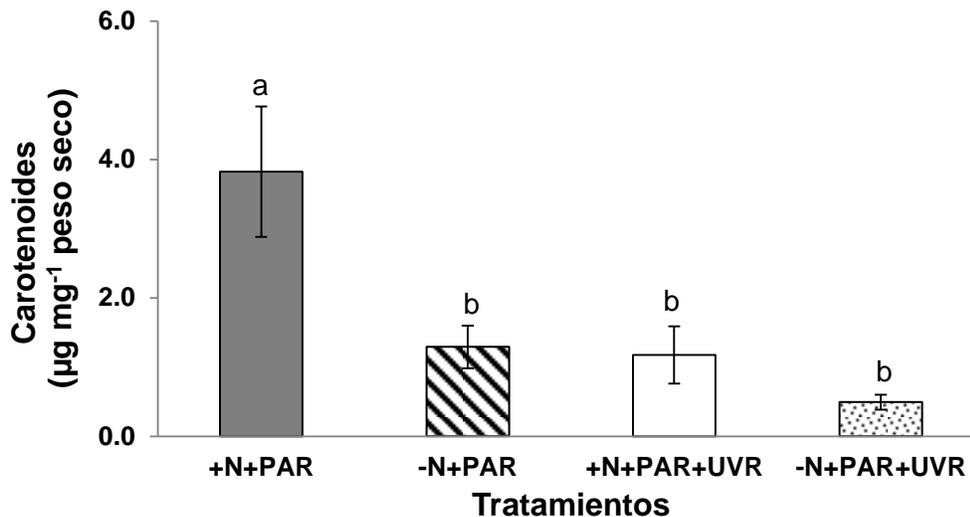


Figura 49. Contenido de carotenoides en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

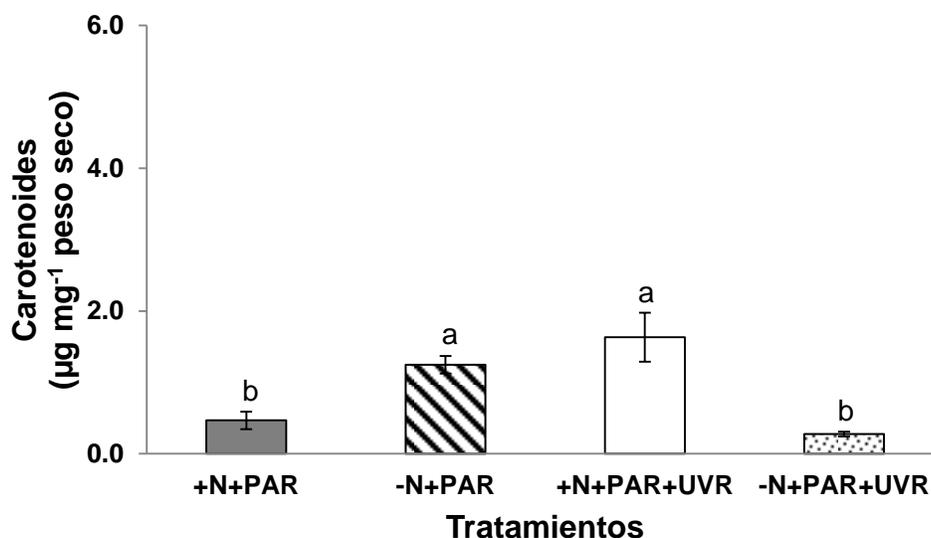


Figura 50. Contenido de carotenoides en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.7.2 Ficobiliproteínas

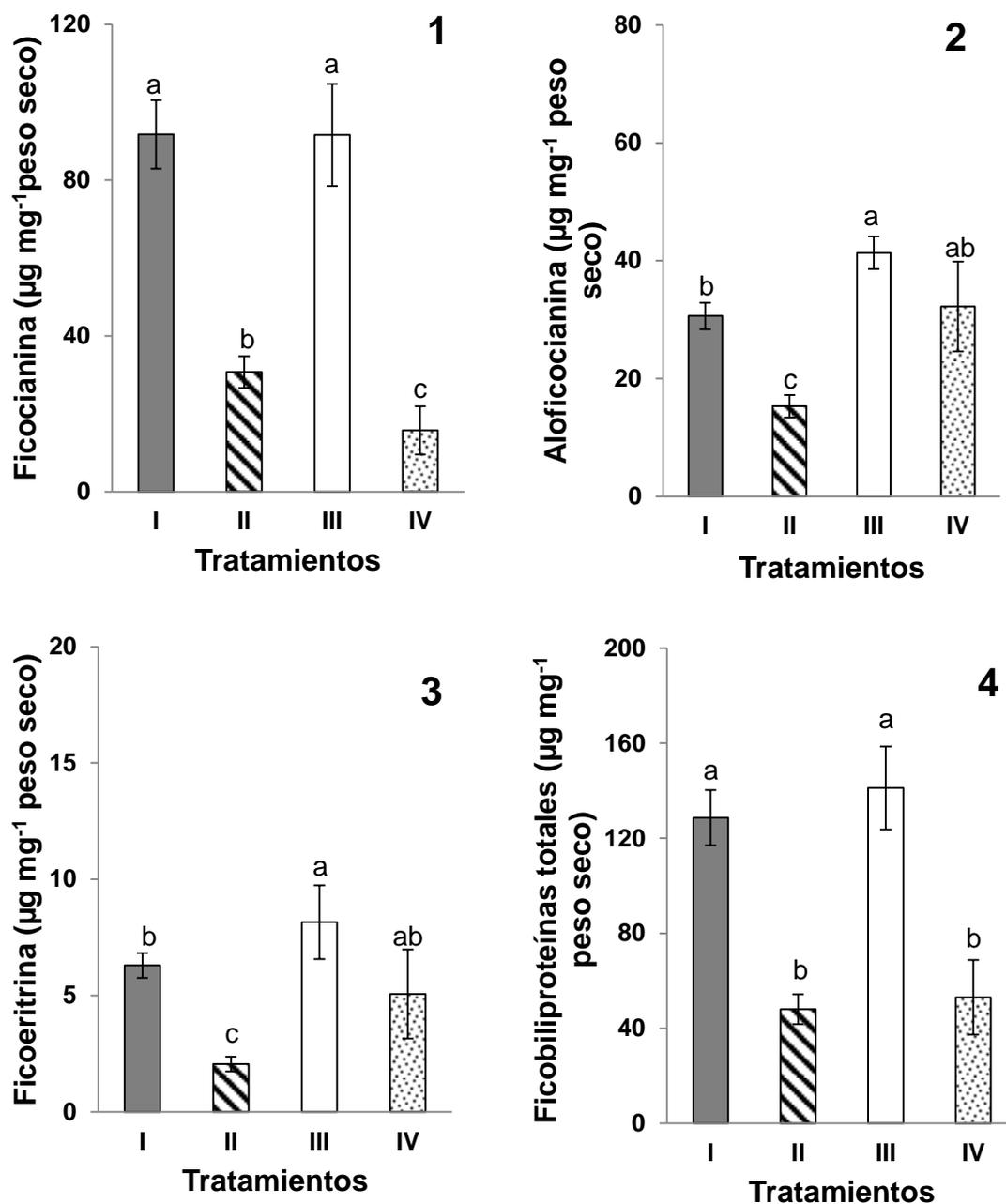


Figura 51. Contenido de 1) ficocianina, 2) alococianina, 3) ficoeritrina y 4) ficobiliproteínas totales en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. I) Control (+N+PAR), II) deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), III) nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y IV) deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

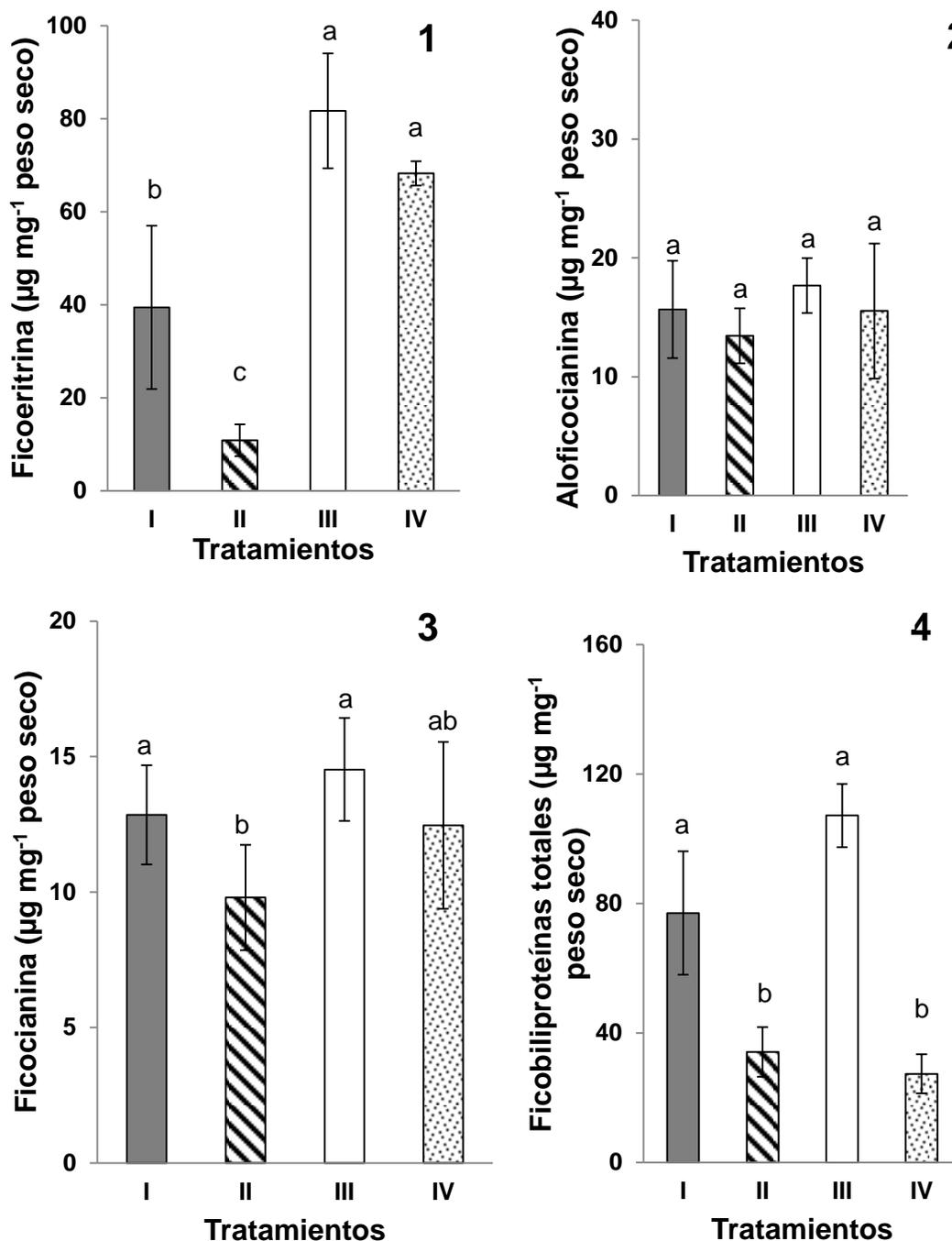


Figura 52. Contenido de 1) ficoeritrina, 2) alofococianina, 3) ficocianina y 4) ficobiliproteínas totales en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. I) Control (+N+PAR), II) deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), III) Control con UV (+N+PAR+UVR) y IV) deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

En *Smax*, el contenido de ficocianina, ficoeritrina y ficobiliproteínas totales fueron significativamente mayores en cultivos con nitrógeno independientemente del tipo de radiación ($p < 0.0001$, $p = 0.0023$ y $p = 0.0002$), las concentraciones de ficocianina fueron: $91.72 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $30.72 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $91.58 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $15.75 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 51-1). En la ficoeritrina $6.3 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $2.06 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $8.16 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $5.07 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 51-3). La concentración de las ficobiliproteínas totales para cada tratamiento fue $128.64 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $48.07 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $141.1 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $53.04 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 51-4). La concentración de aloficocianina fue significativamente mayor ($p = 0.0027$) en cultivos bajo radiación UV en presencia de nitrógeno con respecto al control. La deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR, provocó una disminución significativa ($p = 0.0062$) con respecto al control. Las concentraciones fueron $30.62 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $15.3 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $41.36 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $32.22 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 51-2).

Para *Php*, las mayores concentraciones de ficoeritrina se encontraron en los tratamientos con radiación UV independientemente de la presencia ($p = 0.0001$) o deficiencia de nitrógeno ($p = 0.0036$). Los valores fueron: $39.44 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $10.86 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $81.69 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $68.25 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 52-1). La concentración de aloficocianina no varió significativamente en los tratamientos probados, obteniéndose concentraciones de $15.63 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $13.43 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $17.67 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $15.23 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 52-2). La concentración de ficocianina disminuyó significativamente ($p = 0.013$) con deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR. Los tratamientos con radiación UV, independientemente de la presencia o deficiencia de nitrógeno, no mostraron diferencias significativas con

respecto al control. Los valores fueron $13.44 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $9.79 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $14.5 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $12.4 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UV) (Fig. 52-3). En el contenido de ficobiliproteínas totales los valores por tratamiento fueron $77.03 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $34.1 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $107.14 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $27.33 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 52-4).

8.7.3. Compuestos fenólicos totales

En *Smax*, la concentración de compuestos fenólicos totales disminuyó significativamente ($p < 0.0001$) en todos los tratamientos probados con respecto al control. Los valores para cada tratamiento fueron $4.31 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $1.55 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $0.76 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $0.55 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 53).

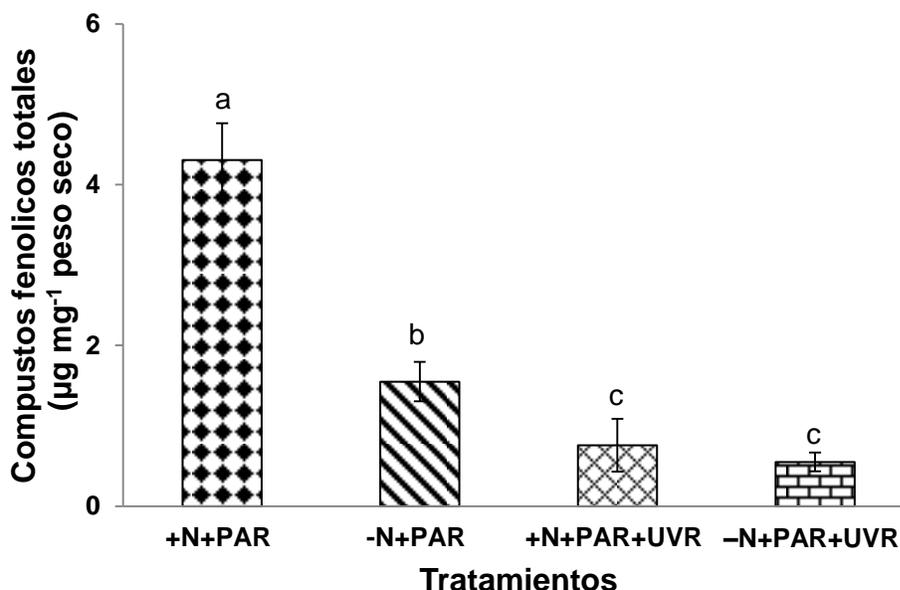


Figura 53. Contenido de compuestos fenólicos totales en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y IV) deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

En *Php*, se observaron resultados similares a los obtenidos para *Smax*. El contenido de compuestos fenólicos totales disminuyó significativamente ($p < 0.0001$) en todos los tratamientos probados con respecto al control. Los valores por tratamiento fueron $5.44 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $2.8 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $1.17 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $1.41 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 54).

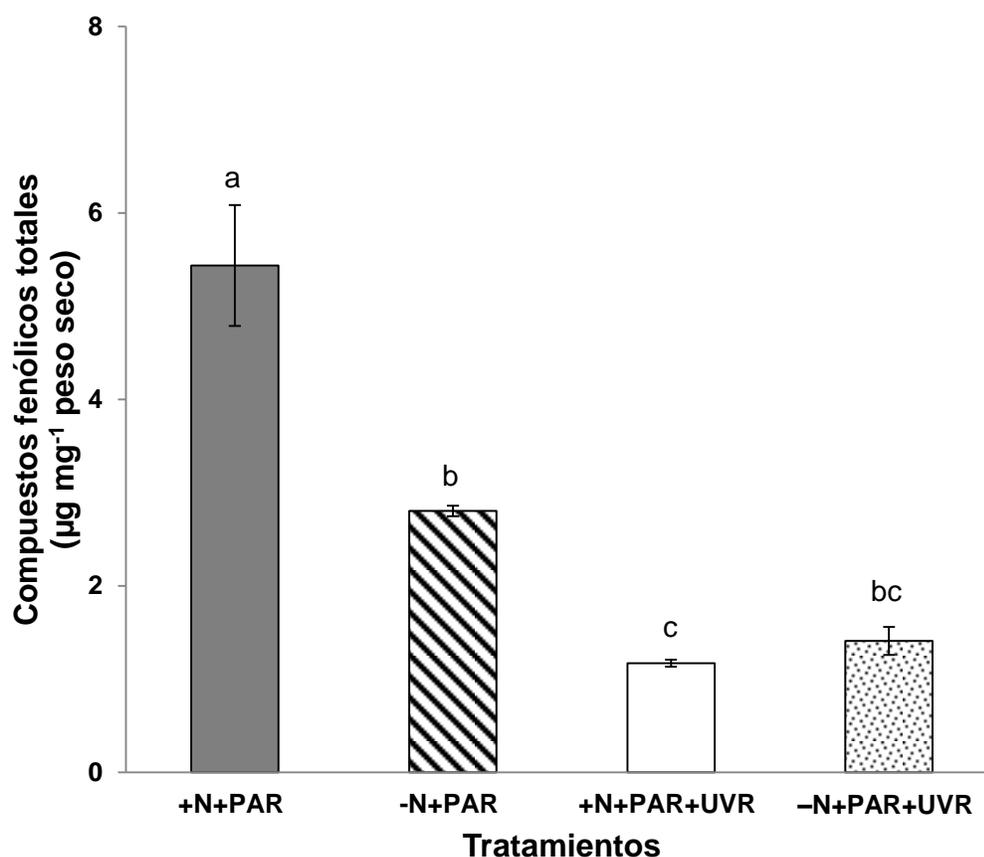


Figura 54. Contenido de compuestos fenólicos totales en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.7.4. Ácido ascórbico (Vitamina C)

En *Smax* el tratamiento -N+PAR no tuvo diferencias significativas con respecto al control. Las concentraciones de vitamina C fueron $0.008 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR) y $0.011 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR) (Fig. 55-1). En *Php*, el tratamiento -N+PAR provocó un aumento significativo ($p=0.0115$) con respecto al control. Las concentraciones fueron $0.005 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR) y $0.011 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR) (Fig. 55-2).

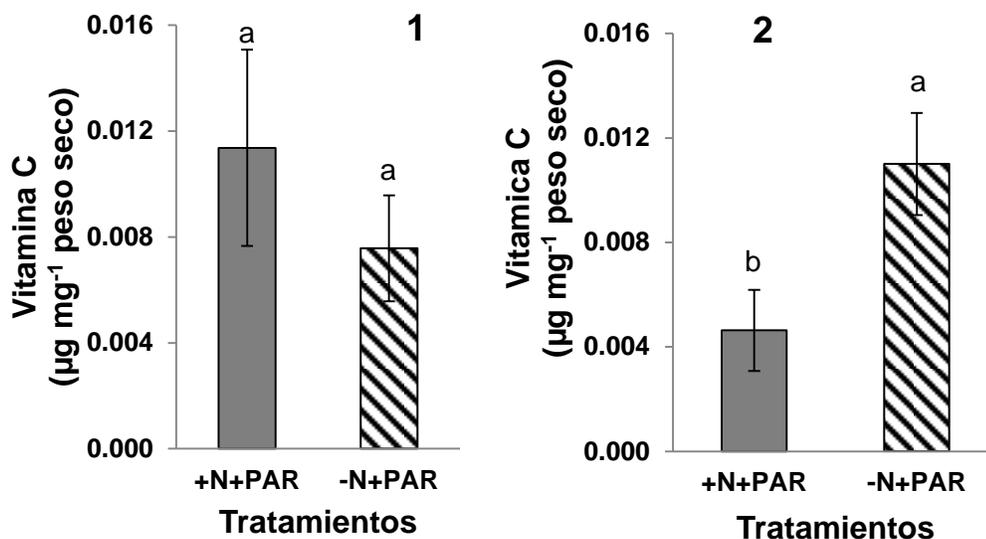


Figura 55. Contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en 1) *Spirulina (Arthrospira maxima)* y 2) *Phormidium persicinum*. Datos expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR) y deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

8.7.5. α -Tocoferol (Vitamina E)

En *Smax* no se observaron diferencias significativas en el en el tratamiento -N+PAR con respecto al control. Las concentraciones de vitamina E obtenidas fueron $0.012 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR) y $0.011 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR) (Fig. 56-1).

En *Php*, en condiciones control (+N+PAR) la concentración de α -tocoferol, estuvo por debajo del límite mínimo de detección del equipo (ND). El tratamiento con deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR (-N+PAR) mostró una concentración de $0.0005 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (Fig. 56-2).

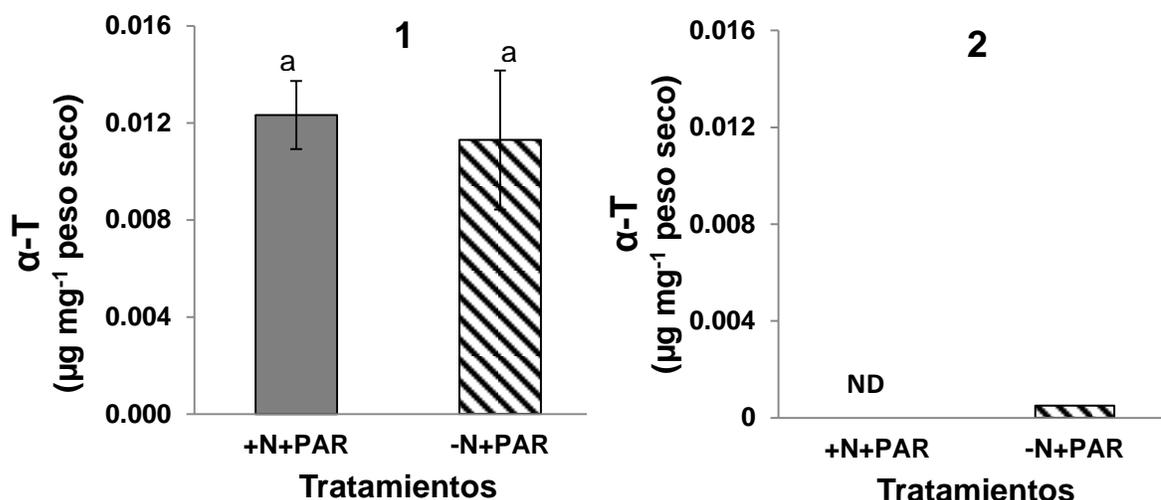


Figura 56. Contenido de α -tocoferol (vitamina E) en 1) *Spirulina* (*Arthrospira maxima*) y 2) *Phormidium persicinum*. Datos expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR) y deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). ND = por debajo del límite de detección). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (t de Student).

8.8. Determinación de las condiciones fisiológicas y bioquímicas

8.8.1. Clorofila a

El efecto de los tratamientos sobre el contenido de clorofila a, se evaluó en las dos cianobacterias. En *Smax*, la concentración de clorofila a fue significativamente mayor ($p < 0.0001$) en los tratamientos con nitrógeno en el medio de cultivo, independientemente del tipo de radiación (PAR o UV). Las concentraciones por tratamientos fueron $12.17 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $5.25 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $16.6 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $6.89 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 57).

Para *Php*, las mayores concentraciones significativas de clorofila *a*, fueron obtenidas en los tratamientos sometidos a radiación UV, independientemente de la presencia ($p < 0.0001$) o deficiencia de nitrógeno ($p = 0.0002$); la deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR no provocó diferencias significativas con respecto al control. Las concentraciones por tratamiento fueron $5.57 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $5.05 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $10.44 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $7.54 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 58).

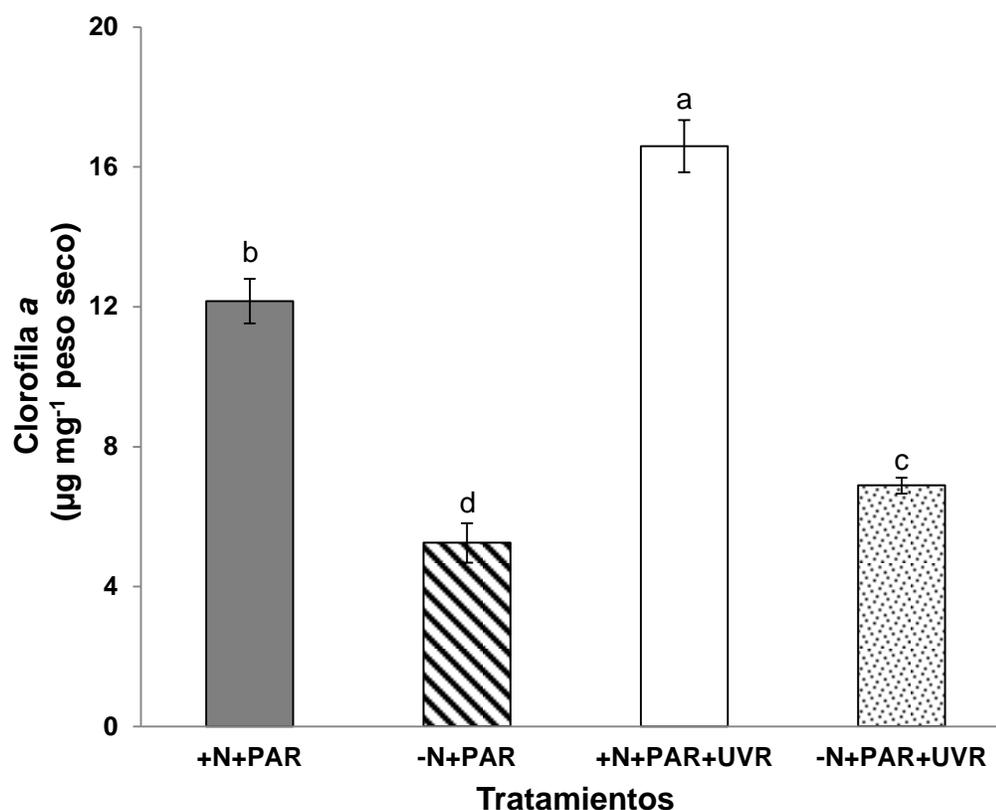


Figura 57. Contenido de clorofila *a* expresado en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

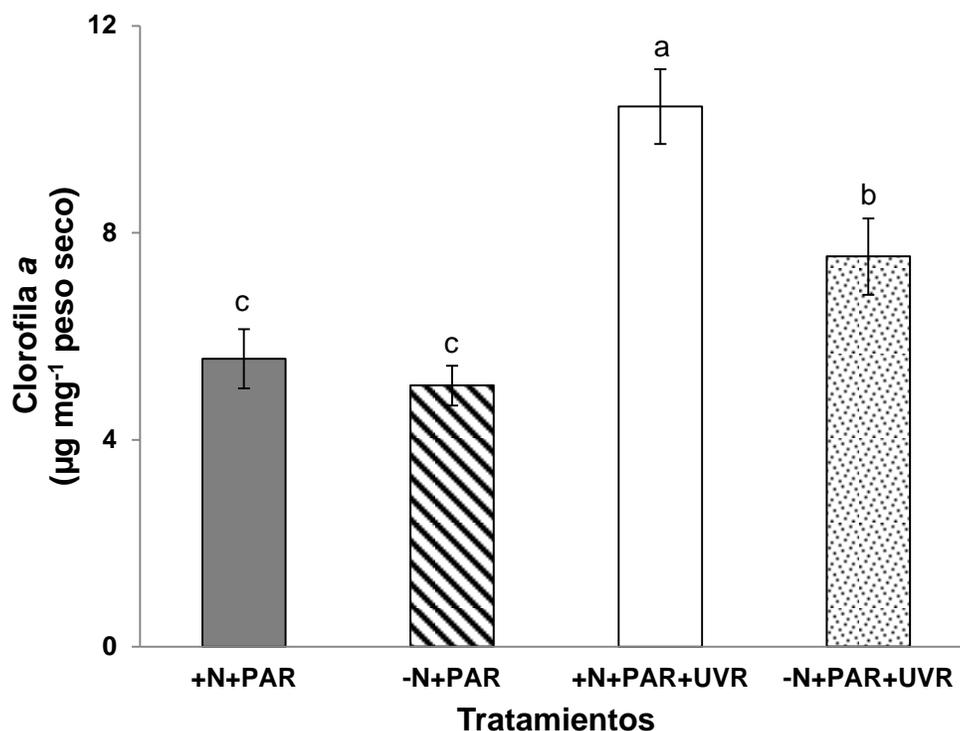


Figura 58. Contenido de clorofila *a* expresado en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco en *Phormidium persicinum*. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.8.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los niveles de lipoperoxidación se determinaron como la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en cada una de las cianobacterias. En *Smax*, la concentración de TBARS incrementó significativamente con la deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR ($p=0.0011$) y en los tratamientos con radiación UV ($p<0.0001$ y $p=0.0198$) con respecto al control. La concentración por tratamiento fue $0.44 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteína (+N+PAR), $1.028 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteína (-N+PAR), 1.8 nmol mg^{-1} proteína (+N+PAR+UVR) y 0.7 nmol mg^{-1} proteína (-N+PAR+UVR) (Fig. 59).

En *Php*, el tratamiento con deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR (-N+PAR) y radiación UV con nitrógeno (+N+PAR+UVR), mostraron una disminución significativa ($p < 0.0001$ y $p = 0.0011$) en los niveles de TBARS con respecto al control. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de TBARS entre el tratamiento -N+PAR+UVR y el control. Las concentraciones de TBARS obtenidas fueron $2.54 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteína (+N+PAR), $0.97 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteína (-N+PAR), $1.57 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteína (+N+PAR+UVR) y $2.43 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteína (-N+PAR+UVR) (Fig. 60).

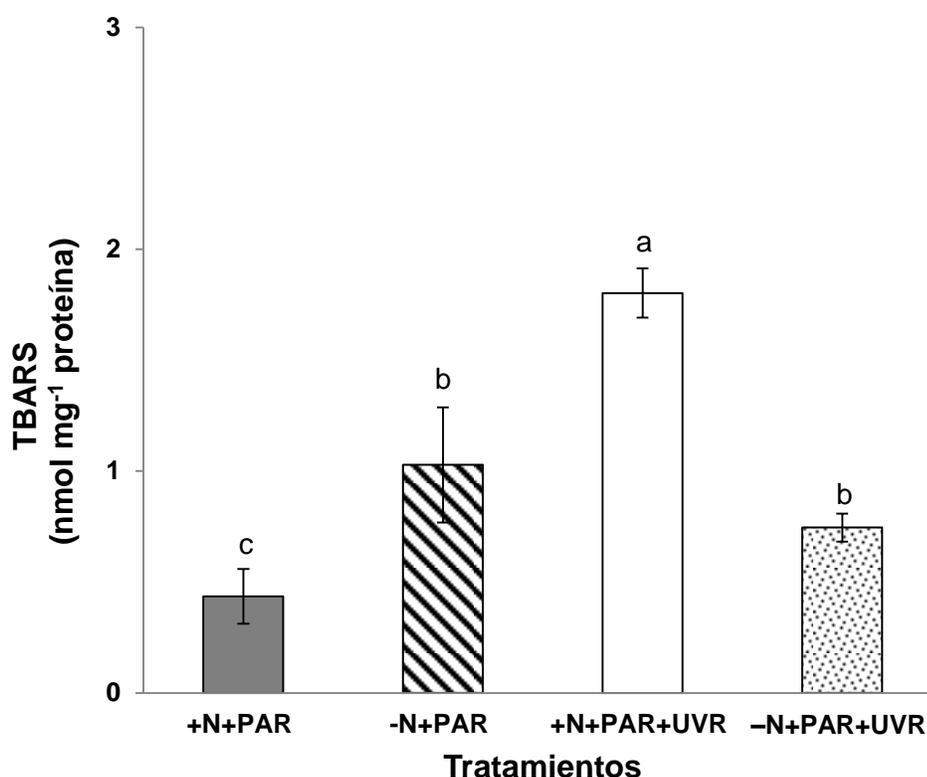


Figura 59. Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en nmol mg^{-1} proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

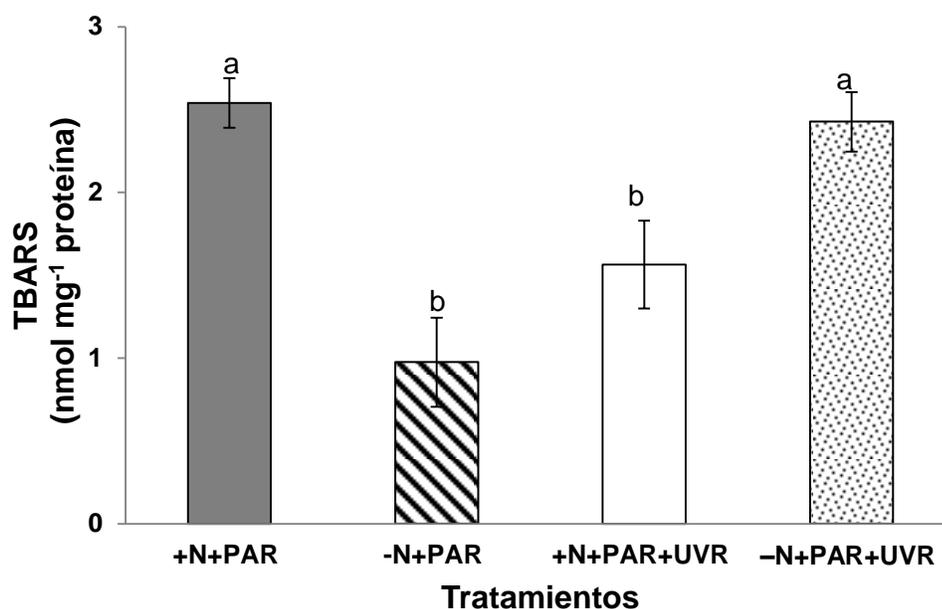


Figura 60. Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en nmol mg⁻¹ proteína. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.8.3. Lípidos totales

En *Smax*, el contenido de lípidos totales, disminuyó significativamente ($p < 0.0001$) en los tratamientos con deficiencia de nitrógeno independientemente del tipo de radiación (PAR o UV) con respecto al control. Las mayores concentraciones se encontraron en los tratamientos con nitrógeno en el medio de cultivo. Las concentraciones por tratamiento fueron 15.06% (+N+PAR), 6.88% (-N+PAR), 15.55% (+N+PAR+UVR) y 8.97% (-N+PAR+UVR) (Fig. 61). En *Php*, los lípidos aumentaron significativamente en los tratamientos expuestos bajo radiación UV ($p < 0.0001$ y $p = 0.0001$) con respecto al control. Las concentraciones fueron 6.6% (+N+PAR), 7% (-N+PAR), 12.04% (+N+PAR+UVR) y 10.18% (-N+PAR+UVR) (Fig. 62).

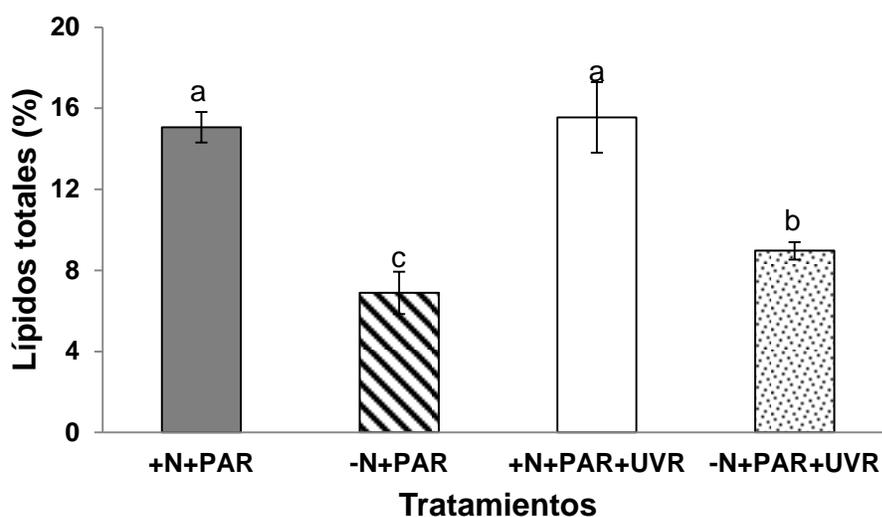


Figura 61. Contenido de lípidos totales en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Valores expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

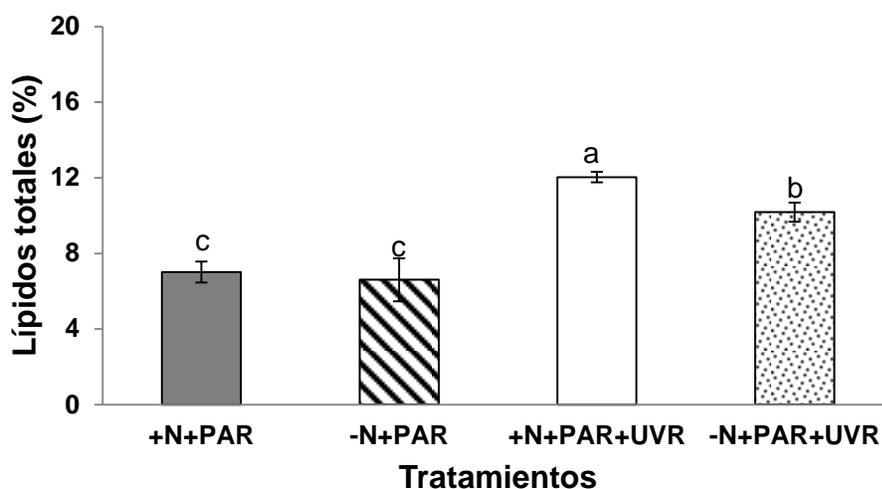


Figura 62. Contenido de lípidos totales en *Phormidium persicinum*. Valores expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.8.4. Ácidos grasos

Se realizó la transesterificación con extracción previa de lípidos totales, para conocer el perfil de ácidos grasos de las cepas y su variación en respuesta a los tratamientos. En *Smax*, se observó una mayor proporción de ácidos grasos saturados en relación a los demás grupos de ácidos grasos analizados (mono, bi y poliinsaturados). La concentración de todos los grupos de ácidos grasos (saturados, mono, bi y poliinsaturados) fue significativamente mayor ($p < 0.0001$) en los tratamientos con nitrógeno en el medio de cultivo, independientemente del tipo de radiación (PAR o UV). Se observó un aumento significativo ($p < 0.0001$) de la concentración de ácidos grasos mono, bi y poliinsaturados en los cultivos bajo radiación UV con respecto al control. Los cultivos bajo deficiencia de nitrógeno mostraron una disminución significativa ($p < 0.0001$) de todos los grupos de ácidos grasos con respecto al control (Fig. 63).

Las concentraciones obtenidas por grupo de ácido graso y por tratamiento se presentan en la tabla V y fueron, en el contenido de ácidos grasos saturados $18.33 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $8.44 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $20.09 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $11.28 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR); en el contenido de ácidos grasos monoinsaturados $2.78 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $1.47 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $4.17 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $1.92 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR); en el contenido de ácidos grasos biinsaturados $7.22 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $1.99 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $8.45 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $3.53 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) y finalmente en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados $6.87 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $4.6 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $9.14 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $4.94 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR).

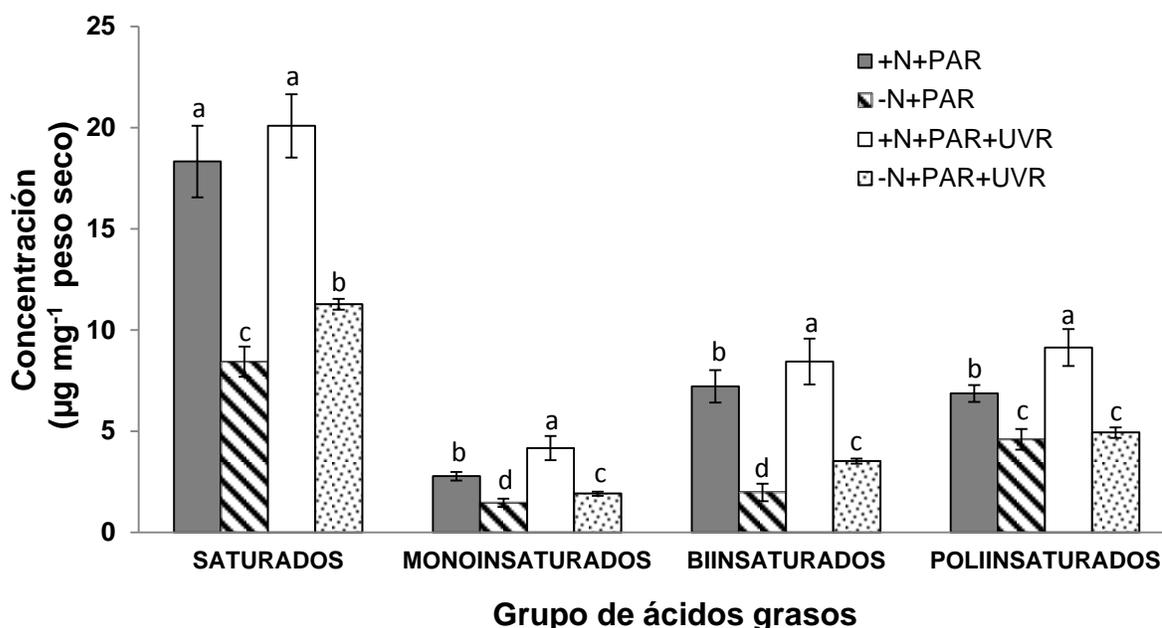


Figura 63. Grupo de ácidos grasos en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores son expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

En *Php*, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados estuvieron en mayor proporción en relación a los demás grupos de ácidos grasos (biinsaturados y poliinsaturados). En los ácidos grasos saturados, el tratamiento con nitrógeno bajo radiación UV, provocó un aumento significativo ($p < 0.0001$) de la concentración con respecto al control. La deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR resultó en una disminución significativa ($p < 0.0001$) con respecto al control. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno bajo radiación UV con respecto al control. La concentración por tratamiento fue: $7.7 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $5.51 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $10.11 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $8.5 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR). Los ácidos grasos mono y biinsaturados disminuyeron significativamente ($p = 0.0087$ y $p = 0.0161$) por la deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR con respecto al control. No se encontraron diferencias significativas

por efecto de la radiación UV independientemente de la presencia o deficiencia de nitrógeno con respecto al control. Las concentraciones de ácidos grasos monoinsaturados por tratamiento fueron $8.52 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $7.25 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $8.85 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $9.23 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR). Los ácidos grasos biinsaturados variaron en $1.99 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $1.29 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $2.22 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $1.85 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR). Finalmente, los ácidos grasos poliinsaturados aumentaron significativamente ($p < 0.0001$) con nitrógeno bajo radiación UV, la deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR provocó una disminución significativa ($p = 0.0016$) y no se encontraron diferencias significativas bajo deficiencia de nitrógeno con radiación UV con respecto al control. Las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados por tratamiento fueron $1.61 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR), $0.9 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR), $6.43 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (+N+PAR+UVR) y $1.79 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (-N+PAR+UVR) (Fig. 64). Las concentraciones obtenidas por grupo de ácido graso y por tratamiento se presentan en la tabla VI.

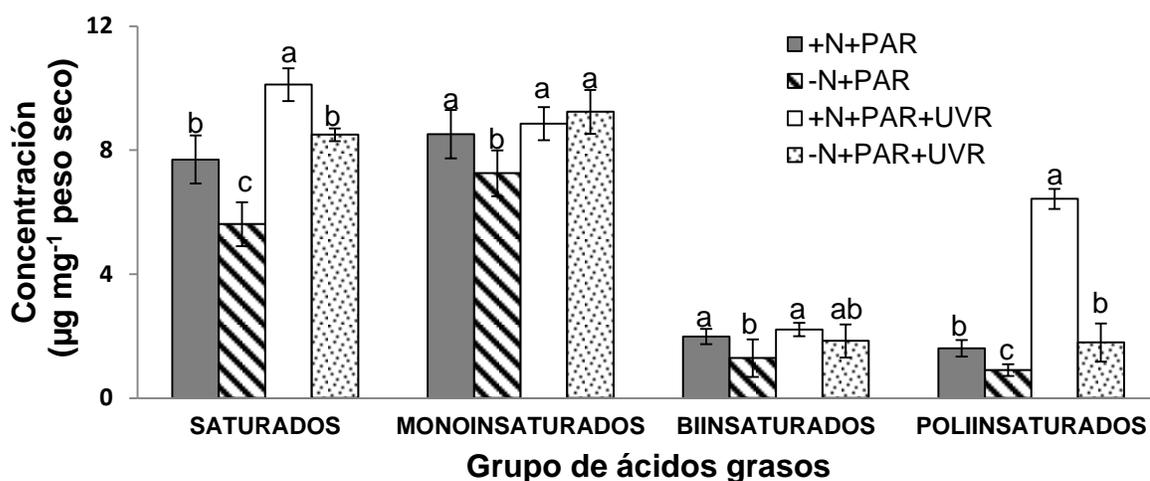


Figura 64. Grupo de ácidos grasos en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

Tabla V. Perfil de ácidos grasos de *Spirulina (Arthrospira) maxima*

<i>Spirulina (Arthrospira) maxima</i>					
Ácido graso		Tratamientos			
Nombre (IUPAC)	Nomenclatura	+N+PAR	-N+PAR	+N+PAR+UVR	-N+PAR+UVR
Saturados		$\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco			
Ácido tetradecanoico	C14:0	0.695±0.04	0.3±0.03	ND	ND
Ácido iso tetradecanoico	i14:0	0.2±0.05	0.12±0.01	ND	ND
Ácido pentadecanoico	C15:0	0.04±0.004	0.01±0.004	ND	ND
Ácido hexadecanoico	C16:0	16.81±1.57	7.66±0.68	19.65±1.51	11.03±0.22
Ácido heptadecanoico	C17:0	0.05±0.01	0.01±0.003	0.05±0.005	0.04±0.02
Ácido octadecanoico	C18:0	0.54±0.09	0.34±0.02	0.4±0.05	0.22±0.02
Monoinsaturados					
Ácido 5-hexadecaenoico	C16:1(ω 11)	0.59±0.03	0.29±0.04	0.73±0.09	0.31±0.03
Ácido 7-hexadecaenoico	C16:1(ω 9)	1.56±0.09	0.77±0.09	1.71±0.18	0.79±0.04
Ácido cis-11-octadecenoico	C18:1(ω 11)	0.55±0.08	0.3±0.05	1.64±0.32	0.71±0.02
Ácido <i>cis, trans</i> -9-octadecenoico	C18:1(ω 9c+t)	0.08±0.01	0.11±0.02	0.1±0.01	0.1±0.02
Biinsaturados					
Ácido 9,12-hexadecadienoico	C16:2(ω 4)	0.14±0.01	0.07±0.01	0.11±0.01	0.05±0.01
Ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico	C18:2(ω 6c)	7.08±0.79	1.91±0.42	8.34±1.12	3.48±0.12
Poliinsaturados					
Ácido 9,12-octadecadienoico	C18:3(ω 6)	6.71±0.40	4.5±0.47	8.94±0.89	4.82±0.25
Ácido 8,11,14-eicosatrienoico	C20:3(ω 6)	0.16±0.02	0.11±0.03	0.2±0.02	0.11±0.01

Los valores son el promedio de réplicas independientes \pm desviación estándar. ND=por debajo del límite de detección.

Tabla VI. Perfil de ácidos grasos de *Phormidium persicinum*

<i>Phormidium persicinum</i>					
Ácido graso		Grupo de experimentos			
Nombre (IUPAC)	Nomenclatura	+N+PAR	-N+PAR	+N+PAR+UVR	-N+PAR+UVR
Saturados		$\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco			
Ácido iso tetradecanoico	i14:0	0.16±0.02	0.13±0.05	0.3±0.04	0.18±0.01
Ácido pentadecanoico	C15:0	0.02±0.003	0.04±0.01	0.03±0.004	0.08±0.01
Ácido hexadecanoico	C16:0	6.83±0.7	5.04±0.59	9.5±0.45	7.61±0.06
Ácido heptadecanoico	C17:0	0.04±0.01	0.08±0.01	ND	0.6±0.01
Ácido octadecanoico	C18:0	0.65±0.1	0.33±0.06	0.3±0.03	0.55±0.11
Monoinsaturados					
Ácido 5-hexadecaenoico	C16:1(ω 11)	2.51±0.3	2.14±0.22	2.9±0.15	3.16±0.35
Ácido 7-hexadecaenoico	C16:1(ω 9)	1.53±0.3	1.67±0.17	4.9±0.33	2.88±0.22
Ácido 10-heptadecaenoico	C17:1(ω 7)	0.24±0.06	0.45±0.09	0.1±0.01	0.55±0.16
Ácido cis-7-octadecenoico	C18:1(ω 11)	2.93±0.3	2.28±0.36	0.5±0.08	1.54±0.12
Ácido cis, trans-9-octadecenoico	C18:1(ω 9c+t)	1.31±0.2	0.72±0.19	0.5±0.09	1.06±0.13
Biinsaturados					
Ácido 9,12-hexadecadienoico	C16:2(ω 6)	0.27±0.04	0.17±0.03	1.1±0.06	0.22±0.08
Ácido 10,13-hexadecadienoico	C16:2(ω 4)	ND	ND	0.3±0.003	ND
Ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico	C18:2(ω 6c)	1.72±0.2	1.12±0.58	0.8±0.15	1.63±0.46
Poliinsaturados					
Ácido 8,11,14-hexadecatrienoico	C16:3(ω 3)	ND	ND	0.6±0.07	ND
Ácido 7,10,13-hexadecatrienoico	C16:3(ω 4)	ND	ND	0.1±0.02	ND
Ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico	C18:3(ω 3)	1.61±0.3	0.9±0.19	5.7±0.24	1.79±0.62

Los valores son el promedio de réplicas independientes \pm desviación estándar. ND=por debajo del límite de detección.

8.8.5. Proteínas totales.

En *Smax*, el tratamiento de la deficiencia de nitrógeno independientemente del tipo de radiación (PAR o UV) provocó una disminución significativa ($p < 0.0001$) de la concentración de proteínas con respecto al control. El tratamiento con nitrógeno bajo radiación UV provocó un aumento significativo ($p < 0.0001$) de la concentración de proteínas con respecto al control. Las concentraciones por tratamiento fueron 53.35% (+N+PAR), 27.84% (-N+PAR), 72.8% (+N+PAR+UVR) y 23.46% (-N+PAR+UVR) (Fig. 65). En *Php*, los tratamientos con radiación UV provocaron un aumento significativo ($p < 0.0001$) de la concentración con respecto al control. La deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR, provocó una disminución significativa ($p = 0.014$) del contenido de proteínas con respecto al control. Las concentraciones por tratamiento fueron 25.75% (+N+PAR), 20.83% (-N+PAR), 47.81% (+N+PAR+UVR) y 38.25% (-N+PAR+UVR) (Fig. 66).

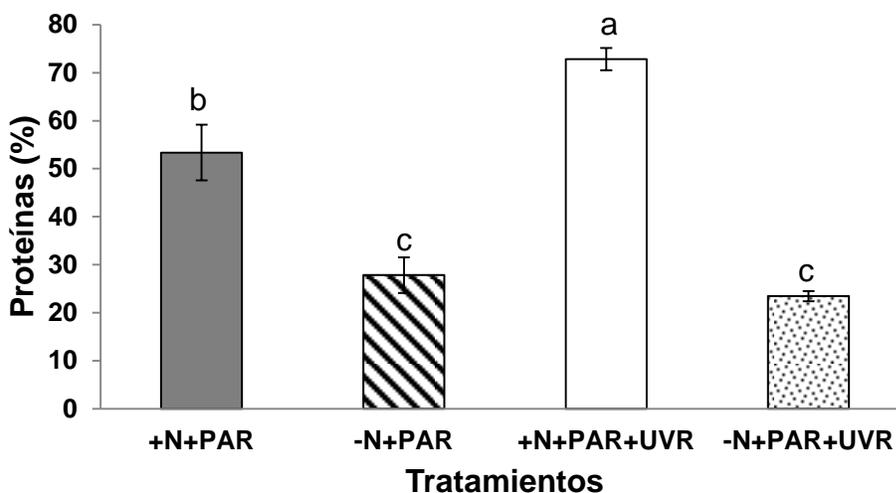


Figura 65. Contenido de proteínas totales en *Spirulina (Arthrospira) máxima*. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

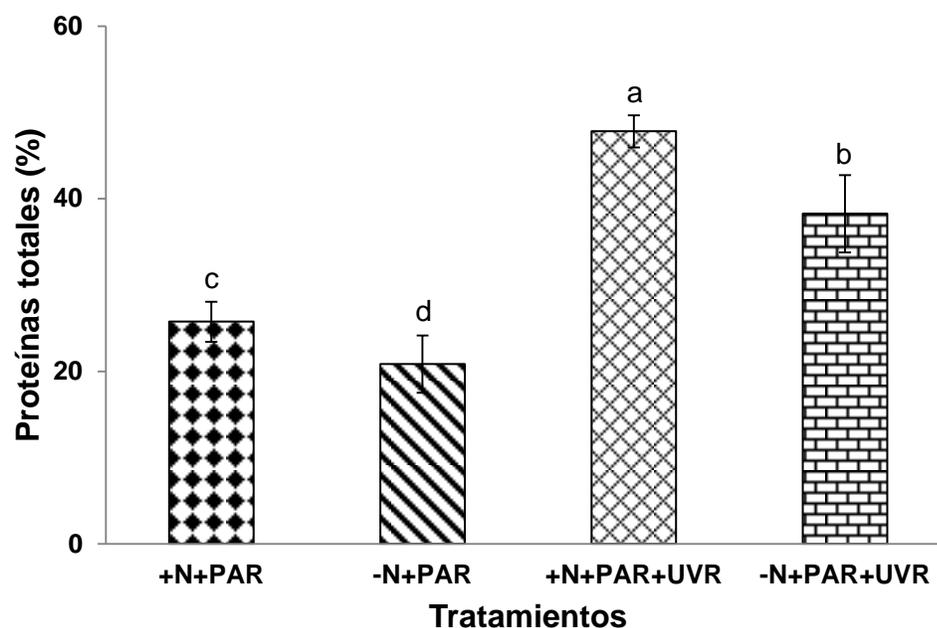


Figura 66. Contenido de proteínas totales en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.8.6. Carbohidratos totales

En *Smax*, la concentración aumentó significativamente ($p < 0.0001$) en los tratamientos con deficiencia de nitrógeno independientemente del tipo de radiación (PAR o UV) con respecto al control. No se encontraron diferencias significativas en el tratamiento con nitrógeno bajo radiación UV con respecto al control. Las concentraciones por tratamiento fueron 9.49% (+N+PAR), 65.1% (-N+PAR), 10.41% (+N+PAR+UVR) y 60.34% (-N+PAR+UVR) (Fig. 67). En *Php*, el contenido de carbohidratos disminuyó significativamente ($p < 0.0001$) en todos los tratamientos probados con respecto al control. Las concentraciones por tratamiento fueron 16.16% (+N+PAR), 4.85% (-N+PAR), 6.73% (+N+PAR+UVR) y 11.68% (-N+PAR+UVR) (Fig. 68).

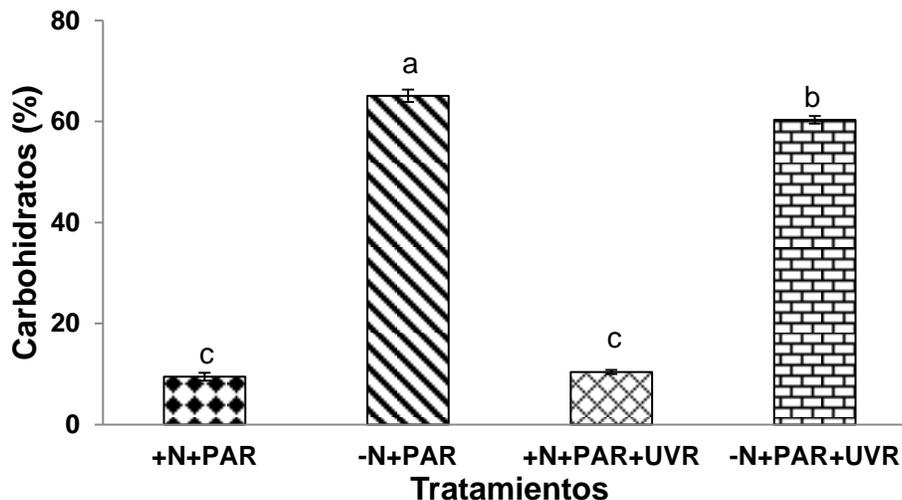


Figura 67. Contenido de carbohidratos totales en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR) y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

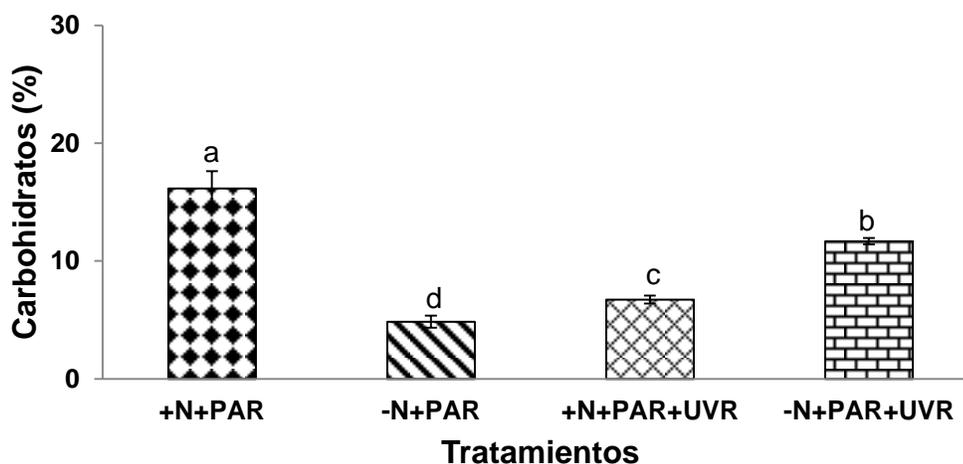


Figura 68. Contenido de carbohidratos totales en *Phormidium persicinum*. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). Control (+N+PAR), deficiencia de nitrógeno (-N+PAR), nitrógeno con UV (+N+PAR+UVR), y deficiencia de nitrógeno con UV (-N+PAR+UVR). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

Los resultados de las variables analizadas en los tratamientos probados en las cianobacterias *Smax* y *Php*, se resumen en las tablas VII y VIII.

Tabla VII. Resumen de resultados de las variables analizadas por tratamiento probado en *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Los valores más elevados se muestran en negritas.

Parámetros	+N+PAR	-N+PAR	+N+PAR+UVR	-N+PAR+UVR
Y(II)	0.272 ±0.014^a	0.225 ±0.010 ^b	0.242 ±0.031^a	0.193 ±0.06 ^c
α	0.058±0.012^a	0.025±0.004 ^b	0.006±0.0005 ^b	0.032±0.001^a
<i>ETR</i> max (μmol electrones m ⁻² s ⁻¹)	1.104±0.182 ^a	0.712±0.080 ^b	0.072±0.016 ^b	1.513±0.096^a
<i>Ek</i> (μmol fotones m ⁻² s ⁻¹)	19.34±1.9 ^a	28.78±6.24 ^b	11.57±3.3 ^b	47.01±4.16^a
<i>Eopt</i> (μmol fotones m ⁻² s ⁻¹)	51.71±12.39 ^b	89.37±15.06^a	131.51±22.5^a	157.54±65.65^a
<i>Fv/Fm</i>	0.334±0.029 ^b	0.598±0.041^a	0.353±0.41^a	0.356±0.016 ^b
Capacidad antioxidante total (μM)	370.45±45.83^a	315.22±7.27 ^b	56.34±3.75 ^c	52.76±14.63 ^c
Radical superóxido (nmol mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	0.05±0.018^a	0.014±0.05 ^b	0.016±0.05 ^b	0.014±0.008 ^b
SOD (U mg ⁻¹ proteína)	20.2±6.8 ^c	38±16.8 ^{bc}	53.9±5.9 ^b	158.5±48.5^a
Catalasa (U mg ⁻¹ proteína)	7.1±4.3 ^c	12.4±8.3 ^{bc}	35.6±20.3^{ab}	33.7±17.9^a
POX (U mg ⁻¹ proteína)	0.011±0.003 ^b	0.045±0.012^a	0.0006±0.0002 ^b	0.014±0.002 ^b
Chl a (μg mg ⁻¹ peso seco)	12.17±0.64 ^b	5.25±0.56 ^d	16.6±0.75^a	6.89±0.23 ^c
Carotenoides (μg mg ⁻¹ peso seco)	3.83±0.94^a	1.29±0.31 ^b	1.18±0.41 ^b	0.49±0.11 ^b
Ficocianina (μg mg ⁻¹ peso seco)	91.72±8.78^a	30.72±4.04 ^b	91.58±13.11^a	15.75±6.18 ^c
Aloficocianina (μg mg ⁻¹ peso seco)	30.62±2.27^b	15.30±1.90 ^c	41.36±2.77^a	32.22±7.64^{ab}
Ficoeritrina (μg mg ⁻¹ peso seco)	6.30±0.53^b	2.06±0.31 ^c	11.85±6.49^a	7.15±3.86^{ab}

Tabla VII. Continuación.

Parámetros	+N+PAR	-N+PAR	+N+PAR+UVR	-N+PAR+UVR
Compuestos fenólicos totales ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	4.31±0.46^a	1.55±0.24 ^b	0.76±0.33 ^c	0.55±0.12 ^c
TBARS (nmol mg^{-1} proteína)	0.44±0.12 ^c	1.03±0.26 ^b	1.8±0.11^a	0.75±0.06^b
Proteínas (% peso seco)	53.35±5.81^b	27.84±3.72 ^c	72.8±2.32^a	23.46±1.09 ^c
Carbohidratos (% peso seco)	9.49±0.79 ^c	65.1±1.23^a	10.41±0.43 ^c	60.34±0.76 ^b
Lípidos (% peso seco)	15.06±0.75^a	6.88±1.04 ^c	15.55±1.74^a	8.97±0.43 ^b
AG Saturados ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	18.33±1.76^a	8.44±0.74 ^c	20.09±1.57^a	11.28±0.27 ^b
AG Monoinsaturados ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	2.78±0.22 ^b	1.47±0.2 ^d	4.17±0.6^a	1.92±0.1 ^c
AG Biinsaturados ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	7.22±0.81 ^b	1.99±0.43 ^d	8.45±1.13^a	3.53±0.13 ^c
AG Poliinsaturados ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	6.87±0.41 ^b	4.60±0.51 ^c	9.14±0.91^a	4.94±0.26 ^c
Vitamina C ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	0.011±0.004 ^a	0.008±0.002 ^a	*	*
Vitamina E ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	0.012±0.001 ^a	0.011±0.003 ^a	*	*

Los valores son el promedio de réplicas independientes \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ *No se realizó la determinación por falta de muestra.

En la tabla VII se observa que en el tratamiento control (+N+PAR) se alcanzan valores más altos de Y_{II} , α y ETR_{max} al igual que la capacidad antioxidante total y radical superóxido y en relación con los compuestos antioxidantes, se alcanzan valores más altos de pigmentos accesorios (carotenoides, ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina) así como de compuestos fenólicos totales, proteínas totales y ácidos grasos saturados. Al incorporar la radiación UV, manteniendo los niveles de nitrógeno, (+N+PAR+UVR) se observa que se mantienen valores altos de Y_{II} y sube E_{opt} y F_v/F_m respecto a +N+PAR.

En relación con el potencial antioxidante en este mismo tratamiento, se alcanzan los valores más altos de catalasa, ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina así como de proteínas y lípidos totales como lo observado en +N+PAR pero en relación a los ácidos grasos los que aumentaron fueron los mono, bi y poliinsaturados; así como la concentración de TBARS y Chl *a*.

Al retirar el nitrógeno en presencia de radiación UV (-N+PAR+UVR) sube el ETR_{max} , la actividad de SOD y CAT y se mantienen valores altos de E_k y E_{opt} . Finalmente en el tratamiento -N+PAR hay valores altos de E_{opt} , F_v/F_m , POX y carbohidratos totales.

En resumen, en los tratamientos +N+PAR y +N+PAR+UVR se alcanzaron los valores más altos de ficobiliproteínas, proteínas y lípidos totales y coincide con valores altos de ciertas actividades antioxidantes. En cambio al limitar el nitrógeno en presencia sólo de PAR el metabolismo que se activa es el de carbono (incremento de carbohidratos totales). El tratamiento que más produce estrés metabólico al bajar todos los compuestos es el de limitación de nitrógeno y presencia de radiación UV (-N+PAR+UVR) y, además, induce aumentos en las actividades de enzimas antioxidantes (SOD y CAT).

Tabla VIII. Resumen de resultados de las variables analizadas por tratamiento probado en *Phormidium persicinum*. Los valores más elevados se muestran en negritas.

Parámetros	+N+PAR	-N+PAR	+N+PAR+UVR	-N+PAR+UVR
Y(II)	0.43 ±0.043 ^a	0.42 ±0.010 ^a	0.43 ±0.007 ^a	0.35 ±0.029 ^a
α	0.056±0.007 ^a	0.094±0.010 ^a	0.039±0.001 ^b	0.0120.011 ^b
<i>ETR</i> max (μmol electrones m ⁻² s ⁻¹)	2.38±008 ^a	3.92±0.19 ^a	1.85±0.4 ^a	0.43±0.41 ^b
<i>Ek</i> (μmol fotones m ⁻² s ⁻¹)	43.1±6.4 ^a	42.05±5.98 ^a	47.4±9.6 ^a	42.56±9.99 ^a
<i>E_{opt}</i> (μmol fotones m ⁻² s ⁻¹)	109.8±9 ^a	104.4±199.38 ^a	103.1±13 ^a	90.01±17.29 ^a
<i>Fv/Fm</i>	0.35±0.04 ^a	0.83±0.06 ^a	0.34±0.05 ^a	0.87±0.15 ^a
Capacidad antioxidante total (μM)	467.44±11.36 ^a	417.63±15.29 ^b	351.14±9.35 ^c	341.75±19.81 ^c
Radical superóxido (nmol mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	0.038±0.011 ^c	0.107±0.32 ^b	0.175±0.011 ^b	0.157±0.005 ^a
SOD (U mg ⁻¹ proteína)	51.6±10.6 ^b	530.4±100 ^a	66.1±11.1 ^b	102.5±9.9 ^b
Catalasa (U mg ⁻¹ proteína)	10.8±7 ^c	12.1±4.8 ^c	28.8±6.4 ^b	55±5.3 ^a
POX (U mg ⁻¹ proteína)	0.129±0.02 ^b	0.248±0.05 ^a	0.008±1E-3 ^c	0.007±4E-4 ^c
Chl a (μg mg ⁻¹ peso seco)	5.57±0.57 ^c	5.05±0.38 ^c	10.44±0.72 ^a	7.54±0.74 ^b
Carotenoides (μg mg ⁻¹ peso seco)	0.47±0.11 ^b	1.25±0.12 ^a	1.63±0.34 ^a	0.28±0.03 ^b
Ficocianina (μg mg ⁻¹ peso seco)	12.85±1.83 ^a	9.8±1.94 ^b	14.52±1.9 ^a	12.46±3.08 ^{ab}
Aloficocianina (μg mg ⁻¹ peso seco ⁻¹)	15.65±4.10 ^a	13.44±2.32 ^a	17.67±2.30 ^a	12.26±0.34 ^a
Ficoeritrina (μg mg ⁻¹ peso seco)	48.52±13.14 ^b	10.86±3.42 ^c	81.69±2.61 ^a	68.26±12.33 ^a

Tabla VIII. Continuación.

Parámetros	+N+PAR	-N+PAR	+N+PAR+UVR	-N+PAR+UVR
Compuestos fenólicos totales ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	5.44±0.65^a	2.8±0.06 ^b	1.17±0.04 ^c	1.41±0.15 ^{bc}
TBARS (nmol mg^{-1} proteína)	2.54±0.15^a	0.98±0.27 ^b	1.57±0.27 ^b	2.43±0.18^a
Proteínas (% peso seco)	25.75±2.33 ^c	20.83±3.32 ^d	47.81±1.85^a	38.25±4.49 ^b
Carbohidratos (% peso seco)	16.16±1.46^a	4.85±0.51 ^d	6.73±0.35 ^c	11.68±0.28 ^b
Lípidos (% peso seco)	7.02±0.56 ^c	6.6±1.14 ^c	12.04±0.28^a	10.18±0.5 ^b
AG Saturados ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	7.7±0.78 ^b	5.61±0.71 ^c	10.11±0.53^a	8.5±0.21 ^b
AG Monoinsaturados ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	8.5±1.09^a	7.25±1.02 ^b	8.85±0.66^a	9.23±0.98^a
AG Biinsaturados ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	1.99±0.25^a	1.29±0.60 ^b	2.22±0.22^a	1.85±0.53^{ab}
AG Poliinsaturados ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	1.61±0.26 ^b	0.9±0.19 ^c	6.43±0.32^a	1.79±0.62 ^b
Vitamina C ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	0.005±0.002 ^b	0.011±0.002 ^a	*	*
Vitamina E ($\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco)	ND	0.0005	*	*

Los valores son el promedio de réplicas independientes \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $\alpha < 0.05$ *No se realizó la determinación por falta de muestra. ND=Por debajo del límite de detección.

En la tabla VIII se observa que en el tratamiento control (+N+PAR) se alcanzan los valores más elevados de eficiencia (Y_{II} y α) así como de capacidad fotosintética (ETR_{max}) al tiempo que incrementa la EK y E_{opt} . Este patrón concuerda con una mayor capacidad antioxidante total y la concentración de TBARS; así como una mayor acumulación de ficocianina, aloficocianina, compuestos fenólicos totales, carbohidratos totales y ácidos grasos mono y biinsaturados.

Al incorporar la radiación UV manteniendo los niveles de nitrógeno (+N+PAR+UVR) se mantiene la alta eficiencia efectiva (Y_{II}), la capacidad fotosintética (ETR_{max}) y se observa incremento de la eficiencia máxima (F_v/F_m), de los niveles de todos los pigmentos fotosintéticos: clorofila *a*, carotenoides, ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina, así como de las proteínas, lípidos y todos los tipos de ácidos grasos. Además se observa disminución de la concentración de carbohidratos totales.

Al retirar el nitrógeno manteniendo la radiación UV (-N+PAR+UVR) se reduce la capacidad fotosintética pero se mantiene alto el F_v/F_m y la E_{opt} . En este tratamiento se alcanzan niveles altos, como era de esperar al ser el tratamiento que produce más estrés, de la tasa de producción de radical superóxido, actividad de CAT y concentración de TBARS teniendo niveles altos de ficobiliproteínas y de ácidos grasos mono y bi-insaturados.

Finalmente, en el tratamiento de deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR, se mantienen altas las eficiencias fotosintéticas (Y_{II} , F_v/F_m), la capacidad fotosintética (ETR_{max}) y la E_k y E_{opt} . Se alcanzan valores altos de la actividad de SOD, POX y de concentración de aloficocianina. Es decir al retirar el nitrógeno bajo radiación PAR, caen los niveles de los compuestos metabólicos cosa que no ocurre al retirar el nitrógeno en presencia de radiación UV en el cual se alcanzaban valores altos de todas las ficobiliproteínas y ácidos grasos.

8.9. Análisis de correlación de Pearson

En *Smax*, los indicadores de estrés oxidativo (producción de $O_2^{\bullet-}$, niveles de TBARS, y actividad de SOD, CAT y POX) no se correlacionaron con el contenido de carotenoides, compuestos fenólicos totales y proteínas en ningún tratamiento aplicado. Sin embargo, se observó correlación positiva entre la ficocianina y la capacidad antioxidante total en los tratamientos bajo radiación UV y también entre la concentración de aloficianina y de ficoeritrina en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno y en el control.

El contenido de carbohidratos y proteínas totales se relacionaron con los tratamientos de radiación UV y bajo deficiencia de nitrógeno. Los parámetros fotosintéticos y los ácidos grasos se correlacionaron en el tratamiento de radiación UV.

Las concentraciones de antioxidantes no enzimáticos se correlacionaron con el contenido de carbohidratos totales en el tratamiento de la deficiencia de nitrógeno y radiación UV y con los lípidos totales y ácidos grasos biinsaturados en el control. Se encontró correlación positiva entre los ácidos grasos saturados y monoinsaturados con el tratamiento con radiación UV.

Los ácidos grasos poliinsaturados se relacionaron en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno tanto en radiación PAR y como en la presencia de radiación UV. Correlación con los parámetros fotobiológicos se encontró en los tratamientos con radiación UV.

No se encontró correlación entre los parámetros fotobiológicos y la capacidad antioxidante total o enzimas antioxidantes. Finalmente los parámetros fotobiológicos se relacionaron con el contenido de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos grasos en todos los tratamientos aplicados. Los valores de correlación y la probabilidad de cada variable por tratamiento se presentan en los anexos 1-5.

En *Php*, los indicadores de estrés oxidativo (producción de $O_2^{\bullet-}$, niveles de TBARS, y actividad de SOD, CAT y POX) no se correlacionaron con los compuestos fenólicos totales en ningún tratamiento. Sin embargo, si se encontró correlación con la concentración de los carotenoides en el tratamiento de radiación UV y deficiencia de nitrógeno. Se encontró una correlación con la concentración de las ficobiliproteínas en el tratamiento con radiación UV. El contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos totales se correlacionó con el tratamiento bajo radiación PAR. La capacidad antioxidante total y los parámetros fotosintéticos presentaron correlación en los tratamientos bajo radiación UV.

Las concentraciones de los antioxidantes no enzimáticos y el contenido de lípidos totales, ácidos grasos mono y biinsaturados no se correlacionaron en los tratamientos aplicados. Las proteínas y ácidos grasos poliinsaturados se correlacionaron con el tratamiento de radiación PAR y deficiencia de nitrógeno. La concentración de carbohidratos se relacionó con los tratamientos de radiación PAR y con la radiación UV bajo deficiencia de nitrógeno.

Los niveles de antioxidantes no enzimáticos se relacionaron con los parámetros fotobiológicos en todos los tratamientos probados aplicados el tratamiento de radiación UV el que causó más interacciones entre ese grupo de variables.

El contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos totales, se correlacionaron con los parámetros fotobiológicos en los tratamientos con radiación PAR y en el tratamiento con radiación UV. Los valores de correlación y la probabilidad de cada variable por tratamiento se presentan en los anexos 6-10.

9. DISCUSIÓN

9.1. Actividad fotosintética

Las cianobacterias fueron los primeros organismos fotosintéticos oxigénicos en estar expuestos a grandes flujos de materia y energía. Para hacer frente a los efectos adversos de dichos factores ambientales, han desarrollado diversas estrategias de protección (Kerr y McElroy, 1993; McKeenzie *et al.*, 1999). Las estrategias incluyen mecanismos a corto (alteraciones en la actividad fotosintética), mediano (modificaciones en los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) y largo plazo (cambios a nivel de ADN), por lo que han sido consideradas como los mejores modelos para el estudio de tales condiciones.

Para determinar la actividad fotosintética un método fácil, rápido y no intrusivo es el uso de la fluorescencia de la clorofila *a* asociada al PSII. Diversos factores afectan directa o indirectamente la actividad del PSII causando cambios en las emisiones de fluorescencia, por lo tanto, éste puede utilizarse para revelar mecanismos de respuesta a un determinado estrés medioambiental así como en condiciones simuladas en laboratorio (Strasser *et al.*, 2000; Henley *et al.*, 1991; Schreiber *et al.*, 1995; Hanelt, 1996; Häder y Figueroa, 1997).

En el presente trabajo se utilizó la emisión de fluorescencia para determinar el rendimiento cuántico efectivo *in situ* $Y(II)$, la eficiencia fotosintética (α), la tasa de transferencia de electrones máxima (ETR_{max}), la irradiancia de saturación (E_k), la irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}) y el rendimiento cuántico óptimo o máximo (F_v/F_m) en cultivos de *Smax* y *Php* sometidas a condiciones de deficiencia de nitrógeno inorgánico y expuestas a radiación UV.

En ambas cianobacterias en las condiciones antes mencionadas, se observó que los valores de $Y(II)$ fueron menores que los obtenidos en F_v/F_m . Tal comportamiento está asociado al estado redox de los centros de reacción del PSII en las membranas tilacoidales de las cianobacterias. Cuando están expuestos a

radiación PAR (mediciones *in situ*), algunos centros de reacción están reducidos, por lo tanto, las emisiones de fluorescencia serán menores. Cuando se hace una incubación previa en oscuridad, toda la maquinaria fotosintética está libre para llevar a cabo la transferencia de electrones, haciendo que todos los centros de reacción estén abiertos (oxidados) y al darles el primer impulso de luz, darán un pico de máxima fluorescencia (mediciones de F_v/F_m). En nuestros datos se observó una disminución del $Y(II)$, del F_v/F_m , de α , del ETR_{max} y del peso de biomasa total.

Ya que en el medio ambiente existe de manera natural abundantes cianobacterias, éstas pueden llegar a agotar los nutrientes esenciales, causando un factor limitante para el crecimiento. Eso implica un proceso de adaptación a periodos de deficiencia de nutrientes, lo que genera un mecanismo de presión selectiva en diversos ambientes naturales (Schwarz y Forchhammer, 2005). La deficiencia de un nutriente en las cianobacterias, provoca cambios aparentes en el aparato fotosintético. Por ejemplo, el esquema de la clorosis es la degradación de pigmentos fotosintéticos, principalmente de las ficobiliproteínas, los cuales constituyen la mayor antena captadora de luz seguida de la clorofila *a* (Allen y Smith, 1969). Otra estrategia de adaptación es el bloqueo de rutas metabólicas y la movilización de componentes intracelulares (Lee *et al.*, 1999).

Durante la deficiencia de nitrógeno, los compuestos nitrogenados (proteína, ficobiliproteínas entre otros) sirven como nutrientes, los cuales primeramente son convertidos a amonio intracelular, después es asimilado por la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa por la incorporación al esqueleto carbonado de 2-oxoglutarato, resultando en la síntesis de glutamato (Lee *et al.*, 1999). A nivel de expresión genética se ha reportado una disminución en la tasa de síntesis de proteínas, aunque se ha demostrado que la síntesis de ciertas proteínas que se requieren para procesos de aclimatación está fuertemente inducida. (Roche y Sauer, 2001; Aldehni *et al.*, 2003).

Salomón *et al.* (2011) reportaron disminución de la actividad fotosintética, del transporte de electrones y desensamble del ficobilisoma en *Synechocystis* 6803 por la deficiencia de nitrógeno. En nuestros resultados observamos que *Smax* continuó su crecimiento después de 6 días de haber sido sometida a estrés por deficiencia de nitrógeno. Dicho comportamiento puede estar asociado al mecanismo de adaptación mencionado por Salomón *et al.* (2011) anteriormente.

En el presente trabajo, observamos cambio de coloración en los cultivos de ambas cianobacterias, el cuál está relacionado a procesos de clorosis debido a la deficiencia de nitrógeno y a la radiación UV, al que fueron sometidos en diferentes intervalos de tiempo. Este proceso de clorosis, se ha observado en otros organismos como plantas, algas y microalgas; y se ha reportado como una respuesta al efecto de la radiación UV-B. Las especies difieren con respecto a su tolerancia e incluso cepas cercanamente relacionadas muestran sensibilidad diferencial. Los distintos niveles de tolerancia están determinados por la eficiencia fotosintética, composición pigmentaria e historia evolutiva (He *et al.*, 2002).

En varias especies de microalgas y cianobacterias sometidas a radiación UV-B se observa una disminución de *Fv/Fm*, del rendimiento fotoquímico cuántico y del crecimiento celular (Fouqueray *et al.*, 2007; Marcoval *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008). Por ejemplo, *Oscillatoria priestleyi* presentó una inhibición total de crecimiento mientras que *Phormidium murrayi* sólo un 62% cuando ambas fueron expuestas a la misma intensidad de radiación UV (Quesada y Vincent, 1997). La fotoinhibición de la fotosíntesis en diversas microalgas por radiación UV determinada mediante fluorescencia *in vivo* de la clorofila a y por evolución de oxígeno ha sido relacionada con las propiedades bio-ópticas de las células (Figueroa *et al.*, 1997). Así las células pequeñas con una alta relación superficie/volumen (S/V) son más vulnerables a la radiación UV que las células más grandes y con baja relación S/V (Figueroa *et al.*, 1997). La morfología filamentosa da ciertas ventajas frente a formas esféricas en relación con la fotoprotección como es el caso de las cianobacterias de este estudio.

En este estudio los valores más altos tanto de rendimientos fotosintéticos ($Y(II, \alpha)$) como de capacidad fotosintética (ETR_{max}) se alcanzaron en el tratamiento control (+N+PAR) en ambas especies. La incorporación de radiación UV manteniendo la disponibilidad de nitrógeno, mantiene los valores de rendimientos y capacidad fotosintética altos y hace aumentar la irradiancia de fotoinhibición, es decir, las cianobacterias adquieren una fotoprotección mayor ya que resisten a irradiancias fotosintéticas más altas. La eliminación del nitrógeno produce una caída de los rendimientos y capacidad fotosintética especialmente en presencia de radiación UV (-N+PAR+UVR) en *Php*. En cambio en *Smax* la caída del ETR_{max} fue mayor en -N+PAR que en -N+PAR+UVR. Así en esta última especie la radiación UV aminora el efecto negativo de la disminución de nitrógeno lo que podría estar relacionado con el incremento de la actividad antioxidante (SOD y CAT) lo que favorece la fotoprotección.

En *Spirulina platensis* se encontró un 92% de disminución del crecimiento; además de ruptura de la espiral y efectos negativos en el desarrollo fotosintético al estar expuesta a radiación UV (Gao y Ma, 2008; Wu *et al.*, 2005b; Rajagopal *et al.*, 2000). Bhandari y Sharma (2011) reportaron una disminución del F_v/F_m en *Phormidium tenue* cuando se expuso a radiación UV-B y UV-B suplementada con baja intensidad de PAR. Zeeshan y Prasad (2009) reportaron una sensibilidad diferencial a la radiación UV-B en *Nostoc muscorum*, *Plectonema boryanum* y *Aphanothece* sp, provocando una inhibición del crecimiento del 32, 88 y 95% después de 10 días de exposición respectivamente. En cultivos de *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Navicula*, *Amphiprora* de origen antártico, tropical y templado respectivamente, al ser expuestas a radiación UV-B, hubo una inhibición del crecimiento en un 50%, pero a exposiciones de altas dosis de radiación UV-A no se presentó inhibición (Wong *et al.*, 2007). Al exponer a radiación UV-B la macroalga *Gracilaria conferta* se observó una disminución del $Y(II)$ (Figuroa *et al.*, 2010).

Otro efecto de la exposición a radiación UV-B en las cianobacterias es a nivel de degradación de los polipéptidos D-1 y D-2 del complejo antena de PSII. Un ejemplo es en *Synechocystis* sp. que mostró daño de la proteína D-1 y en consecuencia, inhibición de la actividad del PSII (Campbell *et al.*, 1998; Sass *et al.*, 1997). En general, el daño a los centros fotoquímicos del fotosistema genera ERO que provoca el blanqueo de los pigmentos, daño a la proteína D-1 y aumento de la oxidación de lípidos de membrana (Bischof *et al.*, 2002; He y Häder, 2002; Hideg *et al.*, 1994). En cuanto a la radiación UV-A se han descrito tanto efectos benéficos como dañinos. Por ejemplo, en microalgas de ambientes templados, reduce el crecimiento celular, la supervivencia, induce a la fotoinhibición y disminuye la fijación de carbono (Davidson *et al.*, 1994; Kim y Watanabe, 1993; Villafane *et al.*, 2004), mientras que en *Pseudo-nitzschia* la indujo (Mengelt y Prezelin, 2005). En *Palmaria palmata* reparó el daño al ADN causado por la radiación UV-B (Pakker *et al.*, 2000). Altas dosis (184.4 J cm^{-2}) de radiación UV-A no tuvo efectos negativos en el crecimiento de microalgas antárticas, tropicales y templadas. Las respuestas de crecimiento de las cianobacterias frente a la radiación UV muestran diferencias considerables debido al grado de daño causado al ADN, a las proteínas y al aparato fotosintético (Melis *et al.*, 1992; Friso *et al.*, 1994; Callaghan *et al.*, 2004).

En *Chroococcidiopsis* sp. y *Tolypothrix byssoides* la presencia de algunos pigmentos como citoneminas, protege de la radiación UV y de compuestos que la absorben como los aminoácidos tipo micosporinas (Castenholz, 1997; Adhikary y Sahu, 1998; Sinha y Häder, 2008). La concentración de estos compuestos en las células puede ser una de las razones de la sensibilidad diferencial; además, esta respuesta puede ser explicada con base a características morfológicas, a los sistemas antioxidantes y a los de reparación del ADN (He y Häder, 2002; Singh *et al.*, 2005; Sinha y Häder, 2008).

9.2. Capacidad antioxidante total

En organismos fotosintéticos las ERO son producidas por la cadena transportadora de electrones. La luz es esencial para la fotosíntesis, pero al mismo tiempo puede causar estrés. El oxígeno es el subproducto de la fotosíntesis lo que favorece a la formación ERO. En el FSII, el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) es producido por liberación de energía de la clorofila fotosensibilizada. (Fufezan *et al.*, 2007). En el FSI una reducción univalente de oxígeno usando electrones del FSII genera $\text{O}_2^{\bullet-}$. La producción de ERO se lleva a cabo de manera natural, pero al someter a las cianobacterias a un estrés, éstas incrementan su producción (Latifi *et al.*, 2009).

En el presente trabajo bajo, condiciones control, la capacidad antioxidante total en *Smax* fue de 370 μM , concentraciones similares a las de *Anabaena* sp. (350 a 480 μM) y *Nostoc humifusum* (380 μM); sin embargo, al comparar con *Nodularia* sp. (500 μM) *Nostoc* sp. (500 μM) y *Spirulina platensis* (524 μM) fue menor que en éstas (Mostafa *et al.*, 2014). En *Php* la capacidad antioxidante en condiciones control fue de 467 μM , valor similar al reportado en *Anabaena flos-aquae* (450 μM), *Nostoc linkia* (480 μM) y *Nostoc muscorum* (470 μM); y concentraciones menores en comparación con *Anabaena* sp (480 μM), *Nodularia* sp. (500 μM), *Spirulina platensis* (524 μM) y *Nostoc* sp. (500 μM) (Mostafa *et al.*, 2013).

La capacidad antioxidante total es atribuida a las propiedades específicas de los compuestos celulares como proteínas, polisacáridos, vitaminas, compuestos fenólicos, carotenoides, ficobiliproteínas y minerales (Singh *et al.*, 2005). El contenido de antioxidantes tiende a ser especie específica, por lo tanto, las variaciones de éstos, se verán reflejadas en dicha capacidad. Chopra y Bishnoi (2008) reportaron que en las cianobacterias del genero *Spirulina*, las propiedades antioxidantes están atribuidas a moléculas como la ficocianina, el β -caroteno, tocoferol, el ácido γ -linolénico y compuestos fenólicos. Piñero *et al.* (2001) observaron que el aumento en el contenido de ficocianina se relacionó con un

incremento en la capacidad antioxidante en diferentes fracciones de *Spirulina platensis*.

En el presente estudio, se observó una disminución de la capacidad antioxidante total en ambas cianobacterias por efecto de la deficiencia de nitrógeno y radiación UV. La disminución de la capacidad antioxidante total mostrada por *Smax* y *Php* fué debido a la disminución en la concentración de moléculas antioxidantes como compuestos fenólicos totales, carotenoides, vitaminas, ficobiliproteínas y alguna otra molécula con capacidad antioxidante no determinada en este estudio (aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) y escitoneminas).

9.3. Radical superóxido y enzimas antioxidantes

El radical $O_2^{\bullet-}$ es una de las ERO que se generan en la cadena transportadora de electrones durante el proceso fotosintético (Latifi *et al.*, 2009). En presencia de radiación UV-B, la formación de ERO es mayor que bajo radiación PAR (Stapleton, 1992).

En el presente trabajo, la tasa de producción de $O_2^{\bullet-}$ en *Smax* disminuyó y en *Php* aumentó por efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación. Rajesh *et al.* (2010) reportaron en *Anabaena variabilis* un aumento de las ERO al utilizar radiación UV-B en comparación con PAR o UV-A. En *Anabaena* sp., He y Hader (2002) reportaron un aumento del daño oxidativo a causa del aumento de la producción de ERO, además demostraron que moléculas con capacidad antioxidante como la vitamina C revirtieron el estrés oxidativo y además protegieron a las cianobacterias del blanqueo de clorofila y al daño al aparato fotosintético.

Una vez producidas las ERO, la primera barrera de defensa son las enzimas antioxidantes. La SOD dismuta el $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . El H_2O_2 producido por SOD es convertido por la CAT a agua. Aunque la tasa de conversión de H_2O_2 a agua es eficiente, CAT presenta baja afinidad por el H_2O_2 , la cual es compensada por las

peroxidasas (POX) (Mishra *et al.*, 2009). Como parte de los sistemas enzimáticos, en este trabajo se determinó la actividad de SOD, CAT y POX. Tanto en *Smax* como en *Php* dichas enzimas presentaron un aumento en su actividad cuando se sometieron a la deficiencia de nitrógeno y radiación UV.

Este comportamiento fue reportado por Rahman *et al.* (2015) en *Anabaena cylindrica* y *Synechocystis* PCC 6803 sometidas a radiación UV-B. En el presente trabajo se observó menor actividad de POX y mayor actividad de SOD y CAT se obtuvo en nuestros resultados con respecto a lo reportado por Rahman *et al.* 2015. Priya (1996) reportó para *Spirulina sp.* una actividad de SOD de 8.3 U mg⁻¹ proteína. Actividades mayores de SOD en condiciones control se obtuvieron en el presente trabajo con ambas cianobacterias 20.2 U mg⁻¹ proteína para *Smax* y 51.6 U mg⁻¹ proteína para *Php*.

Incrementos en la actividad de SOD, CAT y POX en *Nostoc muscorum*, *Plectonema boryanum* y *Aphanothece sp.* expuestas a radiación UV-B fueron reportados por Zeeshan y Prasad (2009). En el presente trabajo, encontramos una mayor actividad de SOD y CAT en *Smax* y *Php* en condiciones control y bajo radiación UV; sin embargo, la actividad de POX fue menor en *Smax* y *Php* en comparación con las tres cianobacterias reportadas por Zeeshan y Prasad (2009).

La actividad de SOD y CAT en todos los tratamientos probados en este trabajo en *Smax* y *Php* fue mayor en comparación a lo reportado por Mostafa *et al.* (2013) para cinco cianobacterias del género *Anabaena*, *Nodularia sp.*, *Nostoc sp.*, *Nostoc humifoeus*, *Nostoc linkia*, *Nostoc muscorum* y *Spirulina platensis*. La actividad de POX fue menor en comparación con todas las cianobacterias anteriormente mencionadas. Se observó mayor actividad de SOD y CAT en *Smax* y *Php* con respecto a *Spirulina platensis* reportada por Hanaa *et al.* (2008).

El incremento en la actividad de SOD y CAT en *Smax* y *Php* obtenidos en este trabajo, sugiere la mayor capacidad que tienen estas cianobacterias de sintetizar estas enzimas, como lo reportado para *Synechocystis PCC 6803* por Rahman *et*

al. (2015). El incremento de la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y POX puede ser consecuencia del aumento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ en las cianobacterias. Durante el estrés oxidativo, ERO particularmente H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ desencadenan la actividad de varias enzimas tales como SOD, CAT y POX. La alta actividad de estas enzimas antioxidantes en cianobacterias está ligada con la tolerancia al estrés (Zeeshan y Prasad, 2009).

El incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes confiere a las cianobacterias protección frente al daño oxidativo. Krause (1994) y Foyer *et al.* (1994) observaron que las enzimas antioxidantes juegan un papel importante en la detoxificación de ERO y en la regeneración a la forma reducida de los antioxidantes. En algas rojas el incremento en la tolerancia contra el estrés ambiental fue atribuido a la elevada actividad de las enzimas SOD, APX y GR (Lornmann *et al.*, 2004).

9.4. Antioxidantes no enzimáticos

9.4.1. Carotenoides

Junto con los sistemas antioxidantes enzimáticos, los no enzimáticos constituyen la segunda línea de defensa contra el estrés oxidativo. Los antioxidantes no enzimáticos comprenden moléculas como carotenoides, ficobiliproteínas, vitaminas, compuestos fenólicos totales entre otros.

El contenido de carotenoides en *Smax* en condiciones control fue de $3.83 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco que resultó mayor a la concentración obtenida por Mostafa *et al.* (2013) quienes reportaron $2.4 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco para *Spirulina platensis*, $0.77 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco para *Nostoc linkia*, $1.61 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco para *Anabaena* sp., $0.24 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco para *Nodularia* sp., y 0.19 para *Nostoc* sp. La concentración en *Php* fue de $0.47 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco similar a la concentración obtenida para *Nostoc linkia*, *Nodularia* sp., y *Nostoc* sp. (Mostafa *et al.*, 2013). La variación en el contenido de pigmentos puede ser relacionado a la historia genética (Stolte *et al.*,

2000) de las cianobacterias o a factores como irradiancia y nutrientes (Henriksen *et al.*, 2002).

En el presente trabajo, la concentración de carotenoides disminuyó en *Smax* por efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV; mientras que en *Php* aumentó. Canto de Loura *et al.* (1987) reportaron incremento de la concentración de carotenoides en *Pseudanabaena* sp. y *Oscillatoria splendida* bajo deficiencia de nitrógeno, efecto que se obtuvo en *Php* en el presente estudio.

El incremento en la concentración de carotenoides por efecto de la radiación UV se ha reportado para diversos organismos. Ehling-Schulz *et al.* (1997) reportaron para *Nostoc commune* además de incremento de carotenoides, la presencia de mixoxantofila y equinenona como moléculas fotoprotectoras externas unidas a la membrana, mismas que se inducen por la radiación UV-B como respuesta al estrés. Huang *et al.* 2002 encontraron por análisis del perfil de RNAm (RNA mensajero) en *Synechocystis* sp. PCC 6803 que las ERO actúan como moléculas de señalización incrementando los transcritos que codifican para moléculas fotoprotectoras, como carotenoides, GPX y SOD.

En *Arthrospira platensis* sometida a alta irradiancia PAR y UV se observó un aumento en el contenido de carotenoides, mientras las células se aclimataban a radiación solar lo que indica que éstos tienen un papel protector (Gao y Ma, 2008). Lauron y Roy (2009) reportaron el papel fotoprotector de los carotenoides por efecto de la radiación UV-B, concluyendo que el ciclo de las xantofilas en dinoflagelados y diatomeas es más importante que otros compuestos fotoprotectores como los aminoácidos tipo miscosporina (MAAs). Este mismo efecto ya había sido observado por Zudaire y Roy (2001) en la diatomea *Thalassiosira weissflogii* en la cual los carotenoides disiparon el exceso de energía vía el ciclo de las xantofilas, como una respuesta de aclimatación a exposición prolongada de radiación UV.

La presencia o ausencia de ciertos carotenoides proporciona información acerca de posibles respuestas de aclimatación o fotoprotección de los organismos. La presencia de carotenoides implicados en el ciclo de las xantofilas indica la posibilidad de que los organismos podrían utilizar a éste como respuesta fotoprotectora (Schubert *et al.*, 2006). Los carotenoides o sus derivados actúan como pigmentos fotosintéticos secundarios y como fotoprotectores contra ERO (Bennoun, 1998). La habilidad de fotoprotección contra daño foto-oxidativo se ha asociado a la capacidad de los carotenoides para disipar el exceso de luz, por lo que actúan como filtros (Ben-Amotz y Shaish, 1992; Bennoun, 1998).

El papel que desempeñan los carotenoides como protección contra daño oxidativo se puede llevar a cabo por cuatro vías: a) por reacción con productos de la peroxidación de lípidos para terminar la reacción en cadena; b) por la eliminación de oxígeno singulete y la disipación de energía como calor; c) por reacción con moléculas de clorofila o tripletes para prevenir la formación de oxígeno singulete, o por la disipación, o por el exceso de la energía de excitación a través del ciclo de las xantofilas (Salguero *et al.*, 2003; Osmond *et al.*, 1997).

9.4.2. Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas junto con los carotenoides, forman parte del sistema captador de luz y actúan como pigmentos accesorios en las cianobacterias. Nuestros resultados mostraron que en *Smax* el contenido de ficobiliproteínas totales en condiciones control fue de 128.64 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco concentración mayor a lo reportado en otras cianobacterias por (Hemlata y Fatma, 2009). En *Php* la concentración de ficobiliproteínas totales obtenida en condiciones control fue 77.03 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco similar a lo reportado para *Anabaena variabilis* NCCU-441, *Plectonema* NCCU-204 y *Westiellopsis prolífica* (Hemlata y Fatma, 2009). El contenido de ficobiliproteínas totales en *Smax* y *Php* fue cinco veces mayor que lo reportado en *Anabaena*, *Nodularia* sp., *Nostoc* sp., *Nostoc humifurus*, *Nostoc linkia*, y *Nostoc muscorum* (Mostafa *et al.*, 2013).

Sushanta *et al.* (2003) reportaron una disminución del 20% de ficocianina en *Oscillatoria willei* por deficiencia de nitrógeno, sin cambios en el contenido de aloficocianina. Canto de Loura *et al.* (1986) reportaron en *Pseudoanabaena* sp. y *Oscillatoria splendida* la degradación de ficocianina por efecto de la deficiencia de nitrógeno, pero sin cambios en el contenido de clorofila *a*. Zubia *et al.* (2014) reportaron una disminución del 21% en el contenido de ficoeritrina y del 23% de ficocianina en la macroalga *Gracilariopsis tenuifrons*. Collier y Grossman *et al.* (1992) reportaron en *Synechococcus* sp. PCC 7942 disminución drástica del contenido de ficobiliproteínas en respuesta rápida a deficiencia de nitrógeno, además de una disminución en los niveles de ARNm que codifican para polipéptidos de las ficobiliproteínas entre un 90 y 95%.

En el presente estudio obtuvimos una disminución del contenido de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina en *Smax* y de ficoeritrina y ficocianina en *Php* por efecto de la deficiencia de nitrógeno y radiación PAR. La radiación UV provocó una disminución del contenido de ficocianina y promovió el aumento de la concentración de aloficocianina y ficoeritrina en *Smax*, mientras que en *Php*, la radiación UV aumentó sólo el contenido de ficoeritrina. En ambas especies de cianobacterias los niveles de las tres ficobiliproteínas al introducir radiación UV se mantuvieron similares a los del control pero siempre que los niveles de nitrógeno se mantuvieran (+N+PAR+UVR). Así, en este tratamiento podrían ejercer un papel fotoprotector, como ya se ha sugerido en otras cianobacterias (Carreto y Carignan, 2011) y algas rojas (Korbee-Peinado *et al.*, 2004).

Rahman *et al.* (2015) reportaron la reducción del contenido de ficocianina de un 69 y 92% en *Anabaena cylindrica* y *Synechocystis* PCC 6803 por efecto de la radiación UV-B. En *Phormidium tenue* se observó que la disminución de los niveles de ficocianina era lineal al tiempo de exposición, disminuyendo del 13, 30 y 55% a 1, 3 y 6 h de exposición a UV-B (Bhandari y Sharma, 2011).

Aráoz y Häder (1999) reportaron una inducción en la síntesis de ficoeritrina por efecto de la radiación solar UV-B en *Nostoc* sp., concluyendo que la ficoeritrina juega un papel importante en el proceso de fotoadaptación de *Nostoc* sp. con respecto al fotodaño causado por la radiación UV-B. Además, reportaron que a alta intensidad de luz, aumentaron los niveles de ficoeritrina, en respuesta a la radiación UV-B.

La localización de ficobiliproteínas en la membrana tilacoidal las deja más expuestas al efecto del daño provocando su desprendimiento (Prasad *et al.*, 2005). La reducción de las concentraciones de ficobiliproteínas puede ser debido a la inhibición de la síntesis de pigmentos o degradación acelerada por las ERO en varios sitios de la cadena transportadora de electrones fotosintética (Hemlata y Fatma, 2009).

Las proteínas son blancos potenciales de la radiación UV-B. Los aminoácidos aromáticos como triptófano y tirosina absorben radiación UV-B hasta los 305 nm y pueden ser fotooxidados provocando la subsecuente ruptura de la cadena polipeptídica, así como cambios estructurales o inactivación de las enzimas (Fujimori, 1981; Kochevar, 1990, Wilson *et al.*, 1995). El nivel de proteínas se mantuvo como en el control al introducir la radiación UV siempre que se mantuviera la disponibilidad de nitrógeno. Así, en ambas especies la disminución en el contenido de proteínas se produce cuando se quita el nitrógeno y especialmente en presencia de radiación UV.

La disminución de los niveles de ficocianina se debe a la interacción directa con la radiación UV-B. La ficocianina absorbe directamente en la región de la radiación UV-B, ya que está localizada en la superficie externa de la membrana tilacoidal (Rahman *et al.*, 2015).

9.4.3. Compuestos fenólicos totales

Entre los antioxidantes presentes en las cianobacterias, están los compuestos fenólicos, moléculas de bajo peso molecular. Estos son productos del metabolismo secundario de los organismos fotosintéticos (Hernández-Ledezma *et al.*, 2013). Con la finalidad de conocer la respuesta de los compuestos fenólicos en *Smax* y *Php*, se evaluó la concentración en condiciones control y bajo estrés por deficiencia de nitrógeno y la radiación UV.

En condiciones control, la concentración de compuestos fenólicos totales en *Smax* fue de 4.31 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco y en *Php* de 5.44 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. En estudios realizados con diferentes concentraciones de nitrógeno en *Spirulina platensis*, se obtuvo un promedio de 3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (Colla *et al.*, 2007); mientras que Mostafa *et al.* (2013) reportaron 9.69 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Miranda *et al.* (1998) y Hanaa *et al.* (2008) mencionaron que los principales compuestos fenólicos encontrados en *Spirulina* son ácido salicílico, ácido trans-cinámico, ácido sináptico, ácido clorogénico y ácido caféico. Las diferencias en concentración de los compuestos fenólicos que se ha reportado en las cianobacterias, refleja una respuesta diferencial determinada por factores de crecimiento, tipo de cianobacteria, origen geográfico o área de cultivo y variaciones fisiológicas y ambientales (Marinho-Soriano *et al.*, 2006).

En el presente estudio, la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en *Smax* y *Php* provocaron una disminución del contenido de compuestos fenólicos totales con respecto al cultivo control. El-Baz *et al.* (2010) reportaron que existe una relación entre la actividad antioxidante total y la cantidad de compuestos fenólicos en extractos crudos de cianobacterias. En la macroalga *Ulva rigida* la concentración de compuestos fenólicos estuvo relacionada con la concentración de nitrógeno disponible; al incrementar de 0 a 50 μM de nitrógeno, éstos incrementaron en un 60%. Así mismo, observaron que la radiación UV no provocó un efecto aparente (Cabello-Pasini *et al.*, 2011).

Copia *et al.* (2012) reportaron un aumento del contenido de compuestos fenólicos totales en la microalga *Chlorella* sp. debido al efecto de la radiación UV-B. Duval *et al.* (1999) reportaron un incremento del 5 al 12% en los compuestos fenólicos totales de *Chlamydomonas nivalis* después de ser sometida 5 días a radiación UV-B, y del 12 al 24% después de 7 días de exposición a radiación UV-C.

El nitrógeno desempeña un papel importante en el metabolismo de aminoácidos, por lo que es esencial para la biosíntesis del aminoácido aromático fenilalanina. Dicho aminoácido es precursor de los compuestos fenólicos, además es clave en la interface entre el metabolismo primario y secundario. La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) es la responsable de dirigir el flujo hacia el metabolismo secundario y, al mismo tiempo, libera amonio el cual es re-asimilado (Lea *et al.*, 2007). Esta enzima está altamente regulada por varios factores ambientales, como fue descrito por Weaver y Herrmann (1997).

9.4.4. Vitamina C y E

Las vitaminas C, E, y A, actúan interrumpiendo la reacción en cadena en la formación de radicales libres, ya que son atrapados y susceptibles a óxido-reducción en las membranas celulares (Galaris y Evangelou, 2002). El-Baky *et al.* (2009) reportaron concentraciones de 3.8 y 0.962 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco en el contenido de vitamina C y E, respectivamente en *Spirulina platensis*. En el presente estudio se obtuvieron concentraciones menores de 0.011 y 0.012 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco de vitamina C y E para *Smax*. En *Php* se obtuvieron concentraciones de 0.005 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco de vitamina C; la concentración de vitamina E estuvo por debajo del límite de detección.

Mendiola *et al.* (2008) encontraron una concentración de 29.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco de vitamina E en *Spirulina platensis* utilizando la técnica de fluidos supercríticos. Shukla *et al.* (2009) reportaron para *Spirulina* sp. una concentración de 0.1 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco de vitamina E, el contenido de vitamina C estuvo por debajo del límite de detección.

En microalgas, Fabregas y Herrero (1990) obtuvieron un contenido de vitamina C en *Tetraselmis suecica* de $0.191 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco, *Isochrysis galbana* de $0.119 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco, *Dunaliella tertiolecta* de $0.163 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco y en *Chlorella stigmatophora* $0.1 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Para vitamina E reportaron 0.421, 0.058, 0.116 y $0.669 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco para cada cepa, respectivamente.

En el presente estudio, la deficiencia de nitrógeno en *Smax* no provocó cambio significativo en el contenido de vitamina C y E; mientras que en *Php* se observó un aumento de contenido de ambas vitaminas. Contrario a nuestros datos, Carballo-Cárdenas *et al.* (2003) reportaron una disminución del 60% en el contenido de vitamina E en la microalga *Tetraselmis suecica* por la deficiencia de nitrógeno.

De acuerdo a lo obtenido en nuestros resultados en el contenido de vitamina E en *Php*, El-Baky *et al.* (2003) mediante un gradiente de concentración de NaNO_3 reportaron que la deficiencia de nitrógeno provocó en *Spirulina maxima* y en *Spirulina platensis* un aumento del contenido de vitamina E y que la mayor concentración fue obtenida en el medio libre de nitrógeno (0% NaNO_3) y el mínimo en la mayor concentración de NaNO_3 utilizada (410 ppm). Lo que estaría confirmando que la deficiencia de nitrógeno en las cianobacterias promueve la utilización del metabolismo secundario, así como de compuestos fenólicos totales para la síntesis de vitamina E (Lea *et al.*, 2007).

En organismos fotosintéticos, la deficiencia de nitrógeno promueve la fotorespiración; este proceso genera ERO y éstas pueden llevar a un estrés oxidativo (Tichy y Vermaas, 1999). En plantas, el cloroplasto es uno de los más poderosos generadores intracelulares de ERO, particularmente de $^1\text{O}_2$ (Asada, 2006). Por lo tanto, se asume que el enriquecimiento de α -tocoferol en las membranas del cloroplasto puede estar relacionado con la capacidad de los tocoferoles de interactuar con el $^1\text{O}_2$ y radicales peroxilo lipídicos, proteger el aparato fotosintético de la toxicidad del oxígeno y la peroxidación lipídica (Munné-Bosch, 2007).

La biosíntesis de tocoferoles se desarrolla principalmente en los plástidos de las plantas a partir de precursores derivados de dos vías metabólicas: ácido homogentísico, un intermedio de la degradación de los aminoácidos aromáticos, y fitildifosfato, que surge de vía del metileritritol fosfato. La regulación de la biosíntesis se produce, en el nivel de enzimas clave como *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, homogentisato fitiltransferasa, tocoferol ciclasa y dos metiltransferasas (Lushchak y Semchuk, 2012; Almeida *et al.*, 2011; Chaudhary y Khurana, 2009; Méne-Saffane y DellaPenna, 2010). La biosíntesis de tocoferoles cambia durante el desarrollo vegetal y en respuesta a diferentes condiciones ambientales, como alta intensidad lumínica, sequía, alta salinidad, metales pesados, congelamiento y deficiencia de nutrientes (Tang *et al.*, 2011; Cela *et al.*, 2011; Yusuf *et al.*, 2010; Ellouzi *et al.*, 2011; Then *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2009).

9.5. Clorofila a

La clorofila a junto con los carotenoides y las ficobiliproteínas, constituyen los pigmentos responsables de la captación de luz durante la fotosíntesis. De acuerdo con los tratamientos a los que fueron sometidas las dos cepas con las que se trabajó, encontramos que en condiciones control, la concentración de clorofila a en *Smax* fue $12.17 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco y en *Php* de $5.57 \mu\text{g mg}^{-1}$. En *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivada en medio Zarrouk se ha reportado una concentración de $6.2 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco (Gao y Ma, 2008). Mostafa *et al.* (2013) obtuvieron concentraciones de $10.6 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco en *Spirulina platensis* cultivada en medio Zarrouk, *Anabaena sp.* $5.972 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco, *Anabaena flos-aquate* $5.82 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco, *Nodularia sp.* $2.232 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco, *Nostoc sp.* $2.752 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco, *Nostoc humiforus* $52 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco, *Nostoc linkia* $6.62 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco y *Nostoc muscorum* $52 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco cultivadas en medio BG11.

Pandey y Tiwari (2010) reportaron para *Spirulina maxima* $13.1 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Rafiqul *et al.* (2003) reportaron en *Spirulina fussiformis* una concentración de 14.2

$\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. Danesi *et al.* (2004) reportaron para *Spirulina platensis* una concentración de $13.4 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. La variación en el contenido de pigmentos en las cianobacterias puede estar relacionado con la diferencia en la composición de medio de cultivo, evolución genética (Stolte *et al.*, 2000) o factores ambientales como temperatura, intensidad luminosa y nutrientes (Henriksen *et al.*, 2002).

La radiación UV no produjo disminución en los niveles de clorofila *a* en presencia de nitrógeno; así, la disponibilidad de nitrógeno promueve la síntesis de clorofila *a* y la radiación UV no causó daño. En cuanto a la deficiencia de nitrógeno, en los tratamientos con PAR y UV se observó una disminución del contenido de clorofila *a* en *Smax* de 5.25 y $6.89 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco respectivamente; mientras que con nitrógeno y radiación UV se obtuvo $16.6 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. En *Php* la deficiencia de nitrógeno con radiación PAR no mostró un efecto significativo en el contenido de clorofila obteniéndose $5.05 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. La radiación UV en cultivos sin nitrógeno disminuyó la concentración de clorofila *a* obteniéndose $7.54 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco y mientras que con nitrógeno se obtuvo $10.44 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco.

Loreto *et al.* (2003) reportaron en *Anabaena* que la concentración de clorofila es afectada por la deficiencia de nitrógeno y que hay una relación lineal entre el contenido de clorofila y la concentración de nitrógeno. Miller *et al.* (2002) reportaron una degradación de clorofila *a*, ficobiliproteínas y carotenoides en *Synechococcus* sp. Yang *et al.* (1997) reportaron que la deficiencia de nitrógeno provoca una reducción del contenido de clorofila celular, reducción de la eficiencia y la capacidad fotosintética.

En *Pseudonabaena* sp. y *Oscillatoria splendida* la deficiencia de nitrógeno no afectó el contenido celular de clorofila *a* pero causa una pérdida de ficobiliproteínas así como un aumento en los niveles de carotenoides (Canto de Loura *et al.*, 1987). Bajo deficiencia de nitrógeno, las cianobacterias diazotróficas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Por el contrario, las cepas no

diazotróficas responden ante la deficiencia de nitrógeno bloqueando el metabolismo anabólico, por lo que la clorosis se hace presente (Herrero *et al.*, 2004; Forchhammer, 2004). En estas circunstancias, se lleva a cabo la movilización de nitrógeno a partir de compuestos nitrogenados como las ficobiliproteínas, lo que concuerda con la disminución de éstas observada en ambas cepas en el tratamiento en mención.

El efecto de la radiación UV sobre el contenido de clorofila *a* ha sido reportado con anterioridad. Después de 72h de exposición a UV-B se obtuvo una disminución de los niveles de ficobiliproteínas y carotenoides en *Anabaena cylindrica* y *Synechocystis* sp. del 38 y 48%, respectivamente (Rahman *et al.*, 2015). En *Phormidium tenue* hubo una disminución de clorofila *a* del 74% después de 6h de exposición a radiación UV-B y un 88% cuando fue sometida a UV-B suplementada con PAR de baja intensidad (Bhandari y Sharma, 2011). En cambio, en este estudio la radiación UV no afectó los niveles de ficobiliproteínas y clorofila *a* siempre que el suplemento de nitrógeno no disminuya.

He y Häder (2002) reportaron blanqueamiento de clorofila *a* en *Anabaena* sp., después de exposición a radiación UV-B suplementada con PAR. Ehling-Schulz *et al.* (1997) reportaron en *Nostoc commune* que la radiación UV-B no afectó la producción de clorofila *a*. Figueroa *et al.* (2003) reportaron disminución de clorofila en las macroalgas *Ulva olivascens* y *Ulva rotundata* por efecto de la radiación UV. Por el contrario, Zubia *et al.* (2014) reportaron un incremento en el contenido de clorofila *a* en la macroalga *Gracilariopsis tenuifrons* después de ser expuesta a radiación UV-B. Globe y Murphy (1998) reportaron que la síntesis de clorofila *a* y carotenoides no fueron inhibidas por la radiación UV-B en *Ulva expansa*. Altamirano *et al.* (2000) reportaron mayor contenido de clorofila *a* y *b* en *Ulva rigida* por efecto de la radiación UV-B.

Estos efectos de la radiación UV pueden ser interpretados de la siguiente manera: durante la evolución, las cianobacterias desarrollaron varias estrategias de

protección ante los efectos de la radiación UV-B, los cuales incluyen prevención del estrés por mitigación, defensa al estrés por inducción de moléculas que absorben radiación UV, así como antioxidantes, mecanismos de reparación a nivel de ADN (Blakefield y Harris, 1994) y síntesis de *novo* de proteínas sensibles a radiación UV como son los casos de las D1 y D2, que son proteínas clave del PSII (Vass *et al.*, 1999; Vass *et al.*, 2000).

Los efectos dañinos de la radiación UV-B que se observan en los pigmentos fotosintéticos se deben al fotoblanqueamiento o al proceso de peroxidación mediada por ERO (Carreto *et al.*, 2001; Sharma, 2002). Los compuestos cromofénicos como clorofila, ficobiliproteínas y quinonas absorben radiación UV-B y fotosensibilizan la generación de ERO, provocando la pérdida de pigmentación por el blanqueo (Xue *et al.*, 2007).

En cuanto a la radiación UV-A, ésta es utilizada para reparar los daños en las proteínas (Kemink *et al.*, 1988) mientras que la radiación PAR es utilizada para proveer la energía requerida durante el proceso de reparación y síntesis de *novo* de proteínas y lípidos. Mackerness *et al.* (1996; 1998) reportaron que la radiación PAR puede aminorar los efectos dañinos de la radiación UV-B.

Se cree que hay un tipo de mecanismo fotoprotector que indica la capacidad de las microalgas a la aclimatación a la radiación UV-B. En experimentos de corto tiempo, sea ha encontrado que existe una síntesis de clorofila *a* como una respuesta a radiación UV y una futura aclimatación a cambios de irradiación (Bischof *et al.*, 2002; Poppe *et al.*, 2002; Roleda *et al.*, 2005).

9.6. Lipoperoxidación (TBARS)

El daño a lípidos se determinó con relación a los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos resultantes de la peroxidación de la membrana celular. En el presente trabajo, en condiciones control en *Smax* y *Php* se obtuvo una concentración de 0.44 y 2.54 nmol mg⁻¹ proteína respectivamente. Hanna *et al.* (2008) reportaron

una concentración de $1.55 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteína en *Spirulina platensis* cultivada en medio Zarrouk.

El aumento de lipoperoxidación ha sido observado en diferentes especies de microalgas como resultado de factores como la radiación PAR, radiación UV y estrés oxidativo (Yamasaki y Grace 1998; El-Baky *et al.*, 2004). En nuestros resultados, en *Smax*, la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV promovieron la lipoperoxidación. En *Php* sólo la radiación UV con deficiencia de nitrógeno provocó aumento de lipoperoxidación.

Hanaa *et al.* (2008) reportaron un aumento en el contenido de lipoperóxidos por efecto del H_2O_2 en *Spirulina platensis*. Rahman *et al.* (2015) reportaron un aumento del 50% de lipoperóxidos en *Anabaena cylindrica* y *Synechocystis* sp. después de 72h de exposición a radiación UV-B. He y Hader (2002) reportaron que la radiación UV-A no produjo un incremento en el contenido de lipoperóxidos; sin embargo, al someterlas a radiación UV-B, la lipoperoxidación se incrementó. Zeeshan y Prasad (2009) reportaron un incremento en la lipoperoxidación de *Nostoc muscorum*, *Plectonema boryanum* y *Aphanothece* sp. por efecto de la radiación UV-B. Wang *et al.* (2009) reportaron aumento de lipoperoxidación por efecto de la radiación UV-B en la microalga *Chlamydomonas* sp.

La deficiencia de nitrógeno promueve la fotorespiración, generando ERO que pueden llevar a estrés oxidativo (Tichy y Vermaas, 1999). En nuestros resultados, el aumento de la lipoperoxidación observada por la deficiencia de nitrógeno, indica que hubo un aumento de ERO, y una disminución de compuestos con capacidad antioxidante, tales como las ficobiliproteínas, compuestos fenólicos totales y carotenoides, como se ha mencionado anteriormente, forman parte del mecanismo de defensa de las cianobacterias frente a las ERO, y evitan las reacciones en cadena en las membranas celulares. Sin embargo, cuando la capacidad protectora y de reparación es excedida, las biomoléculas como proteínas, pigmentos y lípidos sufren daño oxidativo (Barros *et al.*, 2003).

En las cianobacterias, los lípidos presentes en los tilacoides, contienen un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y éstos son susceptibles a la peroxidación (Halliwell, 1999). El nivel de ERO se incrementa por efecto de la radiación UV-B y da lugar a una peroxidación lipídica significativamente mayor, como se observó en los niveles de TBARS en el presente estudio. El daño a los lípidos, especialmente en las membranas tilacoides de cianobacterias, indica un efecto negativo en la actividad fotosintética (Havaux, 1999). Lo anterior se confirmó durante la evaluación de los parámetros fotosintéticos en ambas cepas, expuesto anteriormente.

9.7. Lípidos totales

Los lípidos son la fuente más efectiva de almacén de energía y tienen un papel importante como constituyente estructural en la mayoría de las membranas celulares. En el presente trabajo se obtuvieron concentraciones en *Smax* de 15.06% y en *Php* 6.6% cultivadas en condiciones control. Los niveles de lípidos fueron más altos en los tratamientos con adición de nitrógeno independiente de la presencia o no de radiación UV.

Mexica y Bernal (2011) reportaron para *Arthrospira maxima* cultivada en el medio Zarrouk una concentración entre 10 y 16%. En *Spirulina platensis* cultivada en medio Zarrouk se ha reportado una concentración de 13.79% Leema *et al.* (2010) de 9.5% Licett *et al.* (2014) y 13.66% Uslu *et al.* (2011). El contenido de lípidos varía de acuerdo con la interacción de los diversos factores ambientales involucrados como temperatura, salinidad, nutrientes, irradiancia (Danesi *et al.*, 2002; Vázquez-Duhalt y Arredondo-Vega, 1991).

En el caso de deficiencia de nitrógeno, *Smax*, disminuyó el contenido de lípidos totales a 6.88 y 8.96%, tanto con radiación PAR y UV respectivamente. En *Php*, la radiación UV indujo la síntesis de lípidos en los cultivos con o en deficiencia de nitrógeno a 12.04 y 10.18%, con respecto a los tratamiento en PAR.

En las cianobacterias *Pseudanabaena* sp. y *Oscillatoria splendida* la deficiencia de nitrógeno provocó disminución del contenido de monogalactosil diglicéridos, digalactosil diglicéridos y aumento de lípidos neutros (Canto de Loura *et al.*, 1987). En *Spirulina platensis* la deficiencia total de nitrógeno provocó un aumento de lípidos totales a 25% (Uslu *et al.*, 2011). Sushanta *et al.* (2003) reportaron una disminución del 26% del contenido de lípidos en *Oscillatoria willei* por la deficiencia de nitrógeno. La deficiencia de nitrógeno provocó la catálisis de lípidos y ácidos grasos resultando en su reducción tanto en *Spirulina platensis* como en *Anacystis nidulans* (Piorreck *et al.*, 1984). Chen y Johns (1991) sugieren que la disminución en el contenido de lípidos totales indica una reducción del mecanismo de almacenamiento de carbono y conduce a la disponibilidad de esqueletos de carbono para la síntesis de proteínas o enzimas necesarias para mecanismos de defensa.

Cuando las cianobacterias son expuestas a deficiencia de nitrógeno, la respuesta inmediata es la detención de la división celular, seguida por el bloqueo de las rutas metabólicas, reduciendo notablemente el flujo de carbono hacia compuestos celulares nitrogenados como la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. El flujo de carbono es dirigido a la síntesis preferencialmente de carbohidratos o lípidos que se acumulan en su interior (Sukenik, 1992). En los cloroplastos, la disminución de galactolípidos por efecto de la deficiencia de nitrógeno provoca disminución en la membrana tilacoidal, disminución del flujo de carbono que se desvía a la producción de triglicéridos (Harwood, 1984).

En *Phormidium tenue* expuesta a radiación UV-B, se observó una disminución del 55% en el contenido de glicolípidos y un 64% de los fosfolípidos (Rupali y Sharma, 2011). Otros trabajos sobre el efecto de la radiación UV en microalgas de climas tropicales, templados y antárticos, grupos taxonómicos similares, y no se encontraron efectos aparentes de la radiación UV-A, con excepción de la cepa antártica *Chlorella* que reportaron contenidos más bajos. La radiación UV-B disminuyó el contenido de lípidos en microalgas antárticas y templadas pero no en

tropicales (Wong *et al.*, 2007). Guihéneuf *et al.* (2010) reportaron disminución del contenido de glicolípidos y fosfolípidos en las microalgas marinas *Pavlova lutheri* y *Odontella aurita* por efecto de la radiación UV. Así mismo observaron que los lípidos neutros aumentaron.

Los cambios en el contenido de lípidos totales son debidos principalmente a cambios en la composición de ácidos grasos (glicolípidos o fosfolípidos) (Wang y Chai, 1994). Los lípidos junto con complejos pigmento-proteína son un blanco de oxidación, por lo que son atacados por ERO que se generan por la radiación UV, y la peroxidación lipídica se produce sobre todo en sitios ricos en altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (Kochevar, 1990).

En los ambientes acuáticos, principalmente en la superficie del agua de mar, la radiación UV puede provocar estrés severo en los microorganismos. El alto poder oxidante de la radiación UV lleva a la formación de compuestos oxidantes potentes, tales como peróxidos y oxiradicales intracelulares (Hessen *et al.*, 1997). Estos elementos inducen la peroxidación de los ácidos grasos, que constituye uno de los principales tipos de daño causado a las células por la radiación UV.

9.8. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son componentes importantes en todas las membranas celulares. Es sabido que gracias a las insaturaciones que pueden tener a lo largo de la cadena hidrocarbonada, proporciona fluidéz a la membrana, la cuál se puede ver modificada por diversos factores. En el presente estudio, en condiciones control, en *Smax* el contenido de ácidos grasos saturados, mono, bi y poliinsaturados fue de 18.33, 2.78, 7.22 y 6.87 $\mu\text{g}\cdot\text{mg peso seco}^{-1}$, respectivamente, mientras que en *Php* fue 7.7, 8.52, 1.99 y 1.61 $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco. El contenido en ácidos grasos fue mayor en los tratamientos con adición de nitrógeno independientemente de la presencia de radiación UV pero el tipo de ácidos grasos si se vio afectado por la radiación UV. En *Smax*, en el control

(+N+PAR), aumentaron los ácidos grasos saturados mientras que en +N+PAR+UVR aumentaron los monoinsaturados, biinsaturados y poliinsaturados. En *Php*, en +N+PAR dominaron los mono y biinsaturados y en +N+PAR+UVR además de los anteriores también subieron los poliinsaturados.

El ácido graso saturado en mayor proporción en ambas cianobacterias fue el ácido palmítico (16:0). En el caso de los ácidos grasos monoinsaturados, en *Smax* fue el ácido 7-hexadecaenoico (16:1 ω 9), y en *Php*, se detectó la presencia tanto del ácido 5-hexadecaenoico (16:1 ω 11) y el ácido cis-7-octadecenoico (18:1 ω 11). En los ácidos grasos biinsaturados en ambas cepas, fue el ácido 9,12-hexadecadienoico (18:2 ω 6), y el caso de los ácidos grasos poliinsaturados en *Smax* fue el ácido 9,12-octadecadienoico (18:3 ω 6) y en *Php* el ácido 9,12,15-octadecatrienoico (18:3 ω 3).

En el trabajo de Muhling *et al.* (2005), se reportó la composición de los ácidos grasos en diferentes cepas: *Arthrospira maxima*, *Arthrospira fusiformis*, *Arthrospira indica*, *Arthrospira platensis*, *Spirulina platensis* y *Spirulina maxima*, siendo el ácido palmítico (16:0) el de mayor abundancia, seguido por los ácidos palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linolénico (18:2) y γ -linolenico (γ -18:3). Posteriormente Gupta *et al.* (2008) reportaron en *Spirulina platensis* que el 46.6% estuvo representado por los ácidos grasos saturados, y en 53.3% por los mono y poliinsaturados. Colla *et al.* (2004) encontraron los ácidos grasos palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoléico (18:2), ácido γ -linolenico (γ -18:3) en *Spirulina platensis*. La composición de ácidos grasos y su concentración en *Arthrospira* está influenciada por la fase de crecimiento y por condiciones medioambientales (Cohen *et al.*, 1986, 1993; Olguín *et al.*, 2001).

Por otro lado, cuando las cepas de *Smax* y *Php* se sometieron a deficiencia de nitrógeno bajo radiación PAR se obtuvo una disminución de los ácidos saturados, mono, bi y poliinsaturados. Sushanta *et al.* (2003) encontraron en un estudio con

Oscillatoria willei que la deficiencia de nitrógeno provocó la disminución del contenido de los ácidos grasos: laurico (12:0), mirístico (14:0), pentadecanoico (15:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), heptadecanoico (17:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), γ -linoleico (γ -18:3), eicosapentanoico (20:5) y behénico (22:0) y aumento de eicosenoico (20:1).

Tedesco y Duerr (1989) reportaron una disminución del 35% del contenido de ácidos grasos totales y un aumento de la relación ácidos grasos insaturados/saturados por efecto de la deficiencia de nitrógeno en *Spirulina platensis*. Breuer *et al.* (2012) en un experimento bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, demostraron que las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris oleoabundans* y *Scenedesmus obliquus* acumulan más del 35% de su peso seco como triacilglicéridos, donde los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1) fueron los mayormente producidos.

La relación entre la concentración de nitrógeno y la del contenido de ácidos grasos de *Spirulina* ha sido estudiados Rijn y Shilo (1986), donde demostraron que los compuestos de reserva se acumulan durante la deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, Piorreck *et al.* (1984) reportaron que la acumulación de tales compuestos de reserva se produce principalmente en el metabolismo de algas verdes, mientras que los ácidos grasos de la fracción de lípidos polares de *Spirulina* permanecen constantes. La disminución del contenido de lípidos y ácidos grasos a causa de la deficiencia de nitrógeno, se ha reportado en *Spirulina* y *Anacystis nidulans* por Piorreck *et al.* (1984) y confirmado en la cianobacteria *Oscillatoria willei* Sushanta *et al.* (2003).

En *Smax*, la radiación UV produjo acumulación de ácidos grasos mono, bi y poliinsaturados, sin efecto significativo en los ácidos grasos saturados. La interacción de la radiación UV y la deficiencia de nitrógeno provocaron disminución significativa de todos los grupos de ácidos grasos. En *Php* la radiación UV provocó acumulación de ácidos grasos saturados y poliinsaturados, mientras que en mono

y biinsaturados no provocó efecto significativo. La interacción de la radiación UV y la deficiencia de nitrógeno no provocaron efecto significativo en ningún grupo de ácidos grasos.

Gupta *et al.* (2008) reportaron la composición de ácidos grasos en *Spirulina platensis* en respuesta a la radiación UV-B encontrando una disminución del 21% de ácidos grasos saturados con respecto a células no expuestas. La proporción resultó en 23.5% de ácidos grasos saturados y 76.4% de monoinsaturados y poliinsaturados.

Wong *et al.* (2007) en un estudio con microalgas de clima tropical, templado y antártico encontraron que en las especies tropicales *Chlamydomonas augustae*, *Chlorella vulgaris*, *Amphiprora* y en las especies de clima templado *Chlamydomonas augustae*, *Chlorella vulgaris* y *Navicula incerta* el contenido de ácidos grasos saturados aumentó y el de poliinsaturados disminuyó. En especies de clima antártico el contenido de saturados aumentó en *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Navicula* los poliinsaturados no disminuyeron en *Chlorella*. La composición de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en *Phaeodactylum tricornutum* y *Chaetoceros muelleri* exhibió poca variación por efecto de la radiación UV y la fuente de nitrógeno. Por otro lado, el impacto de la radiación UV resultó en un incremento de ácidos grasos poliinsaturados y una reducción de ácidos grasos saturados tanto en *Phaeodactylum tricornutum* y *Chaetoceros muelleri* bajo todas las fuentes de nitrógeno (Liang *et al.*, 2006).

Los ácidos grasos sufren cambios cuando se someten a procesos fisiológicos bajo estrés (Ehling y Scherer, 1999). Ejemplos de los cambios son la insaturación de lípidos de membrana que aumenta como tolerancia a la radiación UV (Gombos *et al.*, 1997). Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados proporcionan la energía necesaria para la reconstrucción del aparato fotosintético, además de que los ácidos grasos poliinsaturados con importantes a nivel de membrana ya que regulan la fluidez de membrana (Skerratt *et al.*, 1998).

La producción de ácidos grasos poliinsaturados en las microalgas se puede ver afectada por la radiación UV. Las ERO intracelulares que se producen por efecto de la radiación UV-B, genera especies químicas que son capaces de oxidar a los lípidos (Hessen *et al.*, 1997), así como a los ácidos grasos poliinsaturados, dada la presencia de dobles enlaces en su estructura (Gosgrove *et al.*, 1987). Otro efecto que causa la radiación UV-B es a nivel de la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados, ya que además que provoca una reducción de ATP en células microalgales (Vosjan *et al.*, 1990), también afecta el metabolismo de fosfato Hessen *et al.* (1995).

La disminución de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares de fitoplancton puede reducir la permeabilidad y la habilidad de asimilar nutrientes como nitrógeno, fosforo. Como resultado, el crecimiento disminuye y la composición bioquímica cambia (Goes *et al.*, 1997; Khozin-Goldberg y Cohen, 2006; De Castro Araújo y Tavano Garcia, 2005). Como se observó en los resultados obtenidos en este trabajo de peso de la biomasa total y composición bioquímica.

9.9. Proteínas totales

El componente cuantitativamente más importante de la biomasa orgánica de la mayoría de las microalgas y cianobacterias, son las proteínas, las cuales pueden representar hasta más del 50% del peso seco total. Se han descrito varios métodos para la determinación de la concentración de proteínas (Bergmeyer y Grabl, 1983) pero aunque éstas tienen varias propiedades comunes, difieren en otras, como secuencia y perfil de aminoácidos y peso molecular, lo cual explica las discrepancias que se pueden encontrar en la literatura cuando se compara la composición de la biomasa microalgal y/o de cianobacterias, determinada con metodologías diferentes (Harrison y Thomas, 1988). En el presente trabajo, la cuantificación de proteínas totales se realizó por el método de Vonshak (1997) acoplado al método de Lowry *et al.* (1951).

En condiciones control, en *Smax* y en *Php* se obtuvieron concentraciones de 54 y 26% con respecto al peso seco, cuando las cepas fueron cultivadas en el medio Jourdan (2006) y medio F/2 de Guillard y Ryther (1962) respectivamente. Los niveles más altos de proteínas se alcanzaron como era de esperar en los tratamientos con adición de nitrógeno independientemente de la presencia o no de la radiación UV.

En *Spirulina platensis* cultivada en el medio Zarrouk (1966) con 3g/L de NaNO₃ se ha reportado una concentración del 71.1% con respecto al peso seco (Leema *et al.*, 2010); mientras que con 2.5g/L de NaNO₃ fue de 57.5% (Licett *et al.*, 2014). Uslu *et al.* (2011) utilizando medio *Spirulina* con 5 g·L⁻¹ de NaNO₃, obtuvieron una concentración de 67.4% en *Spirulina platensis*. Otros trabajos con una cepa de *Spirulina* sp., y el medio Zarrouk a diferentes concentraciones de nitrógeno (0.625, 1.25, 1.875 y 2.5 g·L⁻¹) obtuvieron 59.76, 57.36, 60.82 y 57.61% de proteínas.

En el presente estudio, evaluamos el efecto de la deficiencia de nitrógeno en *Smax* y en *Php*, tanto con radiación PAR como con UV, observando una disminución del contenido de proteínas totales (28 y 21%) en presencia de radiación PAR, y del 24 y 38.25% en radiación UV, respectivamente. La radiación UV con nitrógeno provocó un incremento en el contenido resultando en 73 y 48% para cada cepa.

Los organismos fotosintéticos sometidos a la deficiencia de nitrógeno utilizan fuentes intracelulares por ejemplo ficobiliproteínas de membranas tilacoidales como mecanismos de adaptación, la cual varía dependiendo de la cepa a ser considerada (Moore *et al.*, 2002). Lo anterior se vio reflejado en nuestro trabajo, en la disminución del contenido de proteínas, ficobiliproteínas, lípidos y ácidos grasos en ambas cepas.

Como se mencionó anteriormente, la deficiencia de nitrógeno incrementa la fotorespiración y ésta puede inducir al estrés oxidativo mediante la producción de ERO, que pueden interaccionar con los grupo sulfidril de las enzimas y causar su

oxidación (Burke *et al.*, 1985). Como resultado de la deficiencia de nitrógeno, algunos organismos fotosintéticos bloquean el anabolismo de compuestos nitrogenados y estimulan la síntesis de todas las fracciones de carbohidratos (intracelulares, capsulares y solubles). Este mecanismo ha sido comprobado en cianobacterias como *Phormidium laminosum* y *Cyanothece* sp. (Fresnedo y Sierra, 1992; De Philippis *et al.*, 1993).

La disminución del contenido de proteínas después de la exposición a radiación UV-B ha sido reportado por Ranman *et al.* (2015) en *Anabaena cylindrica* y *Synechocystis* sp. Esta disminución se debe al daño a proteínas, y a que pocas son sintetizadas *de novo* durante la exposición a la radiación UV-B a largo o corto plazo (Gao *et al.*, 2008). Las proteínas son consideradas blancos fáciles ante la radiación UV-B, esto debido a la presencia de aminoácidos aromáticos como el triptófano y la tirosina que absorben la radiación UV- B hasta 305 nm. Esto provoca que se foto oxiden lo que conduce a entrecruzamientos inter e intra molecular y como consecuencia, a una posterior ruptura de la cadena polipeptídica, así como a cambios estructurales o inactivación de la enzima (Wilson *et al.*, 1995). El número de aminoácidos aromáticos en la cadena polipeptídica puede limitar el grado de foto oxidación y daño a la proteína.

En general, la radiación UV-B induce la pérdida de polipéptidos localizados en el PSII tales las proteína D1, D2, CP47, CP43 y de enzimas del ciclo de Calvin (Barbato *et al.*, 2002). En este sentido, el principal efecto de la radiación UV-B sobre el PSII se produce específicamente en la proteína D1 (Vass *et al.*, 1996), donde la energía de los fotones de la radiación UV-B rompe esta proteína, a nivel del segundo segmento transmembranal, dando origen a fragmentos C-terminal de 20 kDa y N-terminal de 10 kDa (Bergo *et al.*, 2003). El aumento de la degradación de la proteína D1 bajo radiación UV-B puede ser explicado como consecuencia de dos mecanismos independientes: a) daño directo al cluster de manganeso implicado en la oxidación del agua, lo que provoca el rompimiento de la proteína D1 (Booij-James *et al.*, 2002), y b) inducción de la defosforilación de proteínas

del PSII que ocurre por la interrupción del transporte lineal de electrones y que afecta la producción de ATP y NADPH (Baena-González y Aro, 2002).

9.10. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos de las microalgas y cianobacterias puede variar ampliamente dependiendo de las condiciones del cultivo, entre el 10 y el 50% de la biomasa seca, cuando el crecimiento no está limitado. Estos porcentajes tienden a aumentar en condiciones de limitación de nutrientes o como resultado de un cambio en la tasa de crecimiento, con un incremento de lípidos y carbohidratos en relación con las proteínas, por ejemplo cuando el crecimiento cambia de la fase exponencial al estacionario (Granum *et al.*, 2002). Los carbohidratos se dividen en estructurales y de reserva, los primeros se encuentran como componentes principales de las paredes celulares, y los segundos, se acumulan principalmente en los cloroplastos, con tasas de acumulación mayores en condiciones de limitación por nutrientes o de saturación de luz (Geider y La Roche, 2002). Los carbohidratos junto con el oxígeno, son el producto final de las reacciones de la fotosíntesis y es el punto de partida para la síntesis de otros compuestos.

En condiciones control, en *Smax* y *Php* se obtuvo 9.49 y 16.16% de carbohidratos totales. Los niveles más altos en *Smax* se alcanzaron en el tratamiento con deficiencia de nitrógeno sin radiación UV (-N+PAR) mientras en *Php* se alcanzó en el control (+N+PAR). En *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivada en el medio Zarrouk (1966) se ha reportado 15% (Leema *et al.*, 2010), 20.9% (Licett *et al.*, 2014). Olguin *et al.* (2001) utilizando el medio Zarrouk y suplementando con agua de desechos de cerdos, obtuvo unas concentraciones de 28.41 y 6.1% en una cepa de *Spirulina* sp., mientras que Oliveira *et al.* (1999) reportaron para *Spirulina maxima* y para *Spirulina platensis* una concentración de 11.68 y 12.65%.

Lo anterior demuestra que el contenido de carbohidratos al igual que una gran variedad de compuesto producido por las cianobacterias está influenciado por el medio de cultivo, las condiciones y la especie analizada entre otros factores.

Numerosas investigaciones han demostrado que la concentración de carbohidratos en cianobacterias está estrechamente relacionada con factores ambientales como salinidad, temperatura, pH, radiación PAR o UV y concentración de un macronutrientes como nitrógeno o fósforo (Bhandari y Sharma, 2006; Ehling-Schulz *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2012).

En el presente estudio, en condiciones de deficiencia de nitrógeno y radiación PAR y UV, se observó que en *Smax* produjo un aumento del contenido de carbohidratos de 65 y 60%, respectivamente. En *Php*, la deficiencia de nitrógeno en radiación PAR y UV provocó una disminución del contenido de carbohidratos obteniéndose 4.85 y 11.63% respectivamente; mientras que en radiación UV con nitrógeno se obtuvo 6.73%.

Markou *et al.* (2012) en cultivos batch y semicontinuos de *Arthrospira (Spirulina) platensis*, la limitación de fósforo causó un incremento en el contenido de carbohidratos hasta un 63%. Yang *et al.* (2012), reportó que en *Microcystis aeruginosa* la disminución de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo provocó un aumento de los polisacáridos solubles extracelulares. De Philippis *et al.* (1993) evaluaron la deficiencia de nitrógeno en *Cyanothece* sp., encontrando una estimulación en la biosíntesis de las fracciones de carbohidratos intracelular, capsular y soluble. Fresnero y Sierra (1992) reportaron que la deficiencia de nitrógeno en cultivos de *Phormidium laminosum* promovía la aparición de una banda de mucílago extracelular que rápidamente aumentaba con respecto al tiempo.

Las cianobacterias pueden emplear diferentes formas de fijación de carbono en tasas que pueden variar con el estado nutricional celular. La fijación fotosintética de carbono por la enzima RUBISCO es el principal modo de asimilación durante la fotosíntesis y el crecimiento (Tabita, 1994). Por otro lado, el carbono también puede fijarse no fotosintéticamente para satisfacer las necesidades anapleróticas. Por ejemplo, en la cianobacteria *Coccochloris peniocyctis*, la actividad de la

enzima fosfoenol piruvato (PEP) carboxilasa, que cataliza la β -carboxilación de PEP a oxalacetato, se ha reportado que representa el 20% del carbono fijado (Coleman y Colman, 1980). El oxaloacetato es un producto intermedio del ciclo del Krebs en cianobacterias, éste proporciona el esqueleto de carbono para varios aminoácidos, incluyendo el aspartato. El carbono inorgánico también puede ser asimilado por la enzima carbamoil fosfato sintetasa (Chen *et al.*, 1987), que une el metabolismo del nitrógeno y del carbono mediante la combinación de aniones bicarbonato con un grupo amino donado por la glutamina para formar carbamoil fosfato, un precursor de la pirimidina y componente de la ruta biosintética de la arginina. Cuando se presenta deficiencia de nitrógeno, las células estresadas no biosintetizan compuestos nitrogenados y los productos de asimilación de carbono son más abundantes (Weathers y Allen, 1978).

El efecto de la radiación UV en el contenido de carbohidratos, también ha sido reportado previamente por Ehling-Schulz *et al.* (1997) en cultivos de *Nostoc comune*, los cuales fueron sometidos a radiación UV-B; observando un incremento de compuestos que absorbían radiación UV asociados a la síntesis extracelular de glicanos. En cultivos de *Microcoleus vaginatus*, Lan-Zhou *et al.* (2006) evaluaron el efecto de la radiación UV-B, encontrando una disminución en el contenido de carbohidratos totales, exopolisacáridos y de sacarosa.

9.11. Análisis de correlación entre variables

Se encontraron correlaciones positivas en todas las variables analizadas, en todos los tratamientos probados en *Smax* y *Php*. Lo anterior sugiere que los indicadores de estrés oxidativo, las biomoléculas y los parámetros fotobiológicos están interconectados y que un cambio en algún grupo modificará el comportamiento de otro.

En *Smax* se encontraron 24 correlaciones para +N+PAR, 13 para -N+PAR, 25 para +N+PAR+UVR y 17 para -N+PAR+UVR. En los tratamientos con nitrógeno en el medio de cultivo fueron donde se presentó mayor correlación entre variables.

Por otro lado, la deficiencia de nitrógeno independientemente del tipo de radiación (PAR y UV), disminuyó el número de correlaciones, probablemente debido a la disminución de las concentraciones de compuestos nitrogenados, como carotenoides, ficobiliproteínas, compuestos fenólicos, ácidos grasos poliinsaturados y a la disminución de los parámetros fotosintéticos.

Bajo condiciones control, las concentraciones de los antioxidantes no enzimáticos como carotenoides y ficobiliproteínas fueron mayores; además, estuvieron correlacionados con la actividad de las enzimas como CAT. Cano-Europa *et al.* (2009) han reportado que los tetrapirroles lineales de las ficobiliproteínas tienen efectos similares a los de la CAT. *Smax* es conocida por su alto contenido de proteínas, el cual se vió correlacionado con el contenido de carbohidratos y lípidos. Las tres biomoléculas son los productos de mayor almacenamiento en las células; la proporción entre especies puede verse modificada por la derivación de rutas anabólicas por la deficiencia de nitrógeno (Weathers y Allen, 1978).

En el tratamiento -N+PAR, se observó que las ficobiliproteínas fueron las mayormente correlacionadas con la producción de radical $O_2^{\bullet-}$. Los tetrapirroles lineales de las ficobiliproteínas pueden actuar como potentes nucleófilos pudiendo neutralizar a las ERO evitando daño oxidativo (Bermejo-Bescos *et al.*, 2008; Sathyaikumar *et al.*, 2007).

En el tratamiento +N+PAR+UVR, se observó correlación entre los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. La capacidad antioxidante bajo este tratamiento estuvo relacionada con la actividad de las enzimas SOD y CAT y con la concentración de compuestos no enzimáticos como ficobiliproteínas, compuestos fenólicos totales y ácidos grasos poliinsaturados, siendo la ficocianina la que se observó a mayor concentración. El incremento de la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y POX puede ser consecuencia de la producción de $O_2^{\bullet-}$ en las cianobacterias (Rahman *et al.*, 2015).

En el tratamiento con mayor estrés $-N+PAR+UVR$, la mayor capacidad antioxidante total podría deberse a la mayor actividad de las enzimas SOD y CAT y al elevado contenido de carbohidratos. La concentración de los antioxidantes no enzimáticos como ficobiliproteínas, compuestos fenólicos totales, carotenoides fue afectada por la deficiencia de nitrógeno, afectando la cantidad de proteínas y los parámetros fotosintéticos. La disminución de los parámetros fotobiológicos es reflejo de problemas en la maquinaria fotosintética. Como resultado del daño a los centros fotoquímicos del fotosistema, se genera ERO, las cuales provocan el blanqueo de pigmentos, y daños a la proteína D-1 (Sharma, 2002; Bischof *et al.*, 2002; He y Häder, 2002; Hideg *et al.*, 1994a).

En *Php*, se observó un patrón diferente en comparación con *Smax*. Se encontraron 20 correlaciones en el tratamiento $+N+PAR$, 20 para $-N+PAR$, 20 para $+N+PAR+UVR$ y 17 para $-N+PAR+UVR$. En el control, la capacidad antioxidante total podría deberse a la mayor actividad de CAT, mayores concentraciones de compuestos fenólicos, vitamina C y ficobiliproteínas, siendo la ficoeritrina la que presentó mayor concentración. En el tratamiento $-N+PAR$, la capacidad antioxidante total podría deberse a la mayor actividad de las enzimas SOD, CAT y al mayor nivel de carotenoides. La actividad de SOD estuvo correlacionada con la producción de radical $O_2^{\bullet-}$. Además, las actividades de SOD, CAT y la concentración de los carotenoides estuvieron correlacionadas con la eficiencia fotosintética y rendimiento cuántico efectivo *in situ*. Los carotenoides o sus derivados actúan como pigmentos fotosintéticos secundarios y como fotoprotectores contra ERO (Bennoun, 1998).

Durante eventos de estrés oxidativo, las ERO particularmente H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ desencadenan la actividad de varias enzimas tales como SOD y CAT. La alta actividad de estas enzimas antioxidantes en cianobacterias está ligada con la tolerancia al estrés (Zeeshan y Prasad, 2009).

En el tratamiento +N+PAR+UVR, la capacidad antioxidante total podría explicarse por la actividad de CAT, la concentración de carotenoides, fenólicos totales y ficobiliproteínas, de las cuales la que se encontró en mayor concentración fue la ficoeritrina. La eficiencia fotosintética estuvo correlacionada con la captación de energía por parte de las ficobiliproteínas y los carotenoides, mostrando correlación con la tasa de transferencia de electrones y la irradiancia de saturación. Los carotenoides, juegan un papel importante en el ensamblaje de los complejos captadores de luz y tienen una función indispensable, ya que protegen al aparato fotosintético del daño fotooxidativo (Grill y Tuteja, 2010). Los compuestos fenólicos evitan la formación de ERO y de hidroxiperóxidos orgánicos (Escamilla-Jiménez *et al.*, 2009). Y además, en el caso de la ficoeritrina, se espera un mecanismo de disipación de energía ya que su biosíntesis por parte de la célula requiere un alto costo energético que es parte de la respuesta frente a radiación UV-B. (Aráoz y Häder, 1999). Finalmente, en el tratamiento -N+PAR+UVR, la capacidad antioxidante total estuvo correlacionada con la actividad de POX, la concentración de carotenoides, ficobiliproteínas y ácidos grasos poliinsaturados. Los parámetros fotosintéticos estuvieron correlacionados con la actividad de CAT, las concentraciones de ficoeritrina y ácidos grasos poliinsaturados. La actividad de las enzimas está ligada a la producción de ERO por la radiación UV, la ficoeritrina como mecanismo de disipación de energía, como se mencionó anteriormente, y los ácidos grasos poliinsaturados como mecanismo de regulación de la fluidez de las membranas (Skerratt *et al.*, 1998).

10. CONCLUSIONES

1. El efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV provocaron respuesta diferencial en las cianobacterias evaluadas. En un experimento de largo plazo en *Smax* se encontró disminución en la eficiencia fotosintética, en el crecimiento celular, contenido de clorofila *a*, producción endógena de radical superóxido, capacidad antioxidante total, concentraciones de ficobiliproteínas, carotenoides totales, compuestos fenólicos totales, proteínas, lípidos totales y ácidos grasos (saturados, monoinsaturados, biinsaturados y poliinsaturados). Así mismo se observó un aumento en la lipoperoxidación, actividad enzimática (SOD, CAT y POX) y contenido de carbohidratos. En cuanto a la concentración de vitaminas C y E, no se observó un efecto significativo.
2. En un experimento de corto plazo en *Php* se encontró una disminución en la eficiencia fotosintética, en el crecimiento celular, en la capacidad antioxidante total, niveles de ficobiliproteínas totales, compuestos fenólicos totales y ácidos grasos biinsaturados. Además un aumento de la concentración de TBARS, producción endógena de radical superóxido, actividad enzimática (SOD, CAT y POX), contenido de vitaminas (C y E), carotenoides totales, lípidos totales, ácidos grasos saturados y poliinsaturados. No se observó efecto en el contenido de la clorofila *a*, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos monoinsaturados.
3. Con base a los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que el efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV disminuyen la capacidad antioxidante total y la actividad fotosintética de las cianobacterias *Smax* y *Php*, provocando cambios en el metabolismo primario y secundario, lo que se ve reflejado en los cambios de concentración de los metabolitos analizados.

4. La radiación UV induce respuestas antioxidantes de forma diferente en las especies estudiadas. Mientras que en *Smax* en presencia de nitrógeno se estimula la actividad de CAT, en ausencia de nitrógeno además se induce la actividad de la SOD. En cambio, en *Php* sólo en presencia de UV y ausencia de nitrógeno se induce la actividad de la CAT.
5. En *Smax*, la presencia de nitrógeno favorece tanto la eficiencia como la capacidad fotosintética, así como la acumulación de ficobiliproteínas, proteínas, lípidos y ácidos grasos independientemente de la presencia o no de la radiación UV. Así, el nitrógeno favorece el metabolismo de compuestos nitrogenados como aquellos a base de carbono (lípidos). En cambio, en *Php* los metabolismos de compuestos nitrogenados y de carbono (lípidos) sólo se vieron inducidos en presencia y en ausencia de radiación UV (+N+PAR) lo que se favorece es el metabolismo de carbono (carbohidratos).

11. LITERATURA CITADA

- Abdollahi, M., A. Ranjar, S. Shadnia, S. Nikfar y A. Rezaie. 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit.* 10(6):141-147.
- Adhikary, S.P. y J.K. Sahu. 1998. UV protecting pigment of the terrestrial cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea*. *J Plant Physiol.* 153:770-773.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *In*: L. Packer (Ed.). *Methods in Enzymology, oxygen radicals in biological systems.* Academic Press, Inc. EUA. 105:121-126.
- Ahmad, P. 2010. Growth and antioxidant responses in mustard (*Brassica juncea* L.) plants subjected to combined effect of gibberellic acid and salinity. *Arch Agron Soil Sci.* 56:575-588.
- Alava, V.R., A. Kanazawa, S. Teshima y S. Koshio. 1993. Effects of dietary vitamins A, E and C on the ovarian development of *Penaeus Japonicus*. *Nippon Suisan Gakk.* 59:235-242.
- Aldehni, M.F., J. Sauer, C. Spielhaupter, R. Schmid y K. Forchhammer. 2003. Signal transduction protein PII is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J Bacteriol.* 185:2582-2591.
- Allen, J.F. 1997. Superoxide and photosynthetic reduction of oxygen. *In*: Michelson A.M. *et al.*, (Eds.). *Superoxide and superoxide dismutases.* Academic Press, New York. 417-436.
- Allen, M.M. y A.J. Smith. 1969. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch Microbiol.* 2: 114-120.

- Almeida, J., L. Quadrana, R. Asís, N. Setta, F. De Godoy, L. Bermúdez, S.N. Otaiza, J.V.C. Da Silva, A.R. Fernie, F. Carrari y M. Rossi. 2011. Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato. *J Exp Bot.* 62:3781-3798.
- Altamirano, M., A. Flores-Moya y F.L. Figueroa. 2000. Long-term effects of natural sunlight under various ultraviolet radiation conditions on growth and photosynthesis of intertidal *Ulva rigida* (Chlorophyceae) cultivated *in situ*. *Bot Mar.*43:119-126.
- Antia, N.J., B.R. Berland, D.J. Bonin y S.Y. Maestrini. 1975. Comparative evaluation of certain organic and inorganic nitrogen source for phototrophic growth of marine microalgae. *J Mar Biol Ass.* 55:519-539.
- Aqil, F., I. Ahmad y Z. Mehmood. 2006. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medical plants. *Turk J Biol.* 30:177-183.
- Aráoz, R. y D.P. Häder. 1999. Phycoerythrin synthesis is induced by solar UV-B in the cyanobacterium *Nostoc*. *Plant Physiol Biochem.* 37(3):223-229.
- Arredondo-Vega, B.O. y D. Voltolina. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Talleres gráficos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (1). La Paz, Baja California Sur, México. 97p.
- Asada, K., M. Urano y M. Takehashi. 1973. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Eur L Biochem.* 36:257-66.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their function. *Plant Physiol.* 141:391-396.
- Asada, K. y M. Takahashi. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *In: D.J. Kyle, C.B. Osmond and C.J. Arntzen(Eds.). Photoinhibition. Science, Amsterdam.* 89-109.

- Baena-González, E. y E.M. Aro. 2002. Biogenesis, assembly and turnover of photosystem II units. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357(1426):1451-1460.
- Ballester, M. 1996. Antioxidants, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach. *Med Clin.*107:509-515.
- Balloni, W., L. Tomaselli, L. Giovannetti. y M.C. Margheri. 1980. Biología fundamental del género *Spirulina*. In: C. Cantarelli, O. Ciferri, G. Kapsiotis, G. Materassi, R. and U. Treccani (Eds.). Proyecto finalizado "Ricerca di nuove fonti proteiche e di nuove formulazioni alimentaria". Atti del Convegno: Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Firenze-Academia dei Georgofili, CNR, Tipografía Coppini. 49-82.
- Barbato, R., E. Bergo, F. Dalla Vecchia y G.M. Giacometti. 2000. Ultraviolet B exposure of whole leaves of barley affects structure and functional organization of photosystem II. *J Biol Chem.* 275(15):10976-10982.
- Barros, P.M., M. Granbom, P. Colepicolo y M. Pedersen. 2003. Temporal mismatch between induction of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase correlates with high H₂O₂ concentration in seawater from clofibrate-treated red algae *Kappaphycus alvarezii*. *Arch Biochem Biophys.* 420:161-168.
- Básaca-Loya, G.A., M.A. Valdez, E.A. Enríquez-Guevara, L.E. Gutiérrez-Millán y M.G. Burboa. 2009. Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodospirillum rubrum*. *Cienc Mar.* 35(4):359-368.
- Bauernfeind, J.C. 1972. Carotenoid of vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *J Agric Food Chem.* (20):456-73.

- Beckman, J.S., M. Carson, C.D. Smith y W.H. Koppenol. 1993. ALS, SOD, and peroxynitrite. *Nature*. 364(6438):584.
- Beem, K.M., W.E. Rich y K.V. Rajagopalan. 1974. Determination and Analysis of the 2a structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 249:7298-7305.
- Begoña, O.A., F.L. Granado y I.N. Blanco. 2001. *Carotenoides y Salud Humana*. Madrid: Editorial Fundación Española de la Nutrición.13-63.
- Belay, A. 2002. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J Ame Nutra Assoc*. 5(2):27-29.
- Ben-Amotz, A. y J. Shaish. 1992. *In: A. Ben-Amotz and M. Averno (Eds.). Dunaliella: physiology, biochemistry and biotechnology*. CRC, USA: 135-64.
- Bennoun, P. 1998. *In: J.D. Rochais, M. Goldschmidt and S. Merchant (Eds.). The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer, Dordrecht, 675-83.
- Bergmeyer, J. y M. Grabl. 1983. *Methods in Enzymatic Analysis (3rd edition) Volume I. Fundamentals*. Verlag Chemie, Weheim, 84-99p.
- Bergo, E., A. Segalla, G.M. Giacometti, D. Tarantino, C. Soave, F. Andreucci y R. Barbato. 2003. Role of visible light in the recovery of photosystem II structure and function from ultraviolet-B stress in higher plants. *J Exp Bot*. 54(388):1665-1673.
- Bermejo, R., F.G. Ación, M.J. Ibáñez y J.M. Fernández. 2003. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *J Chromatogr. B* 790:317-325.

- Bermejo-Bescos, P., E. Pinero-Estrada y A.M. Villar del Fresno. 2008. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicol In Vitro*. 22:1496-1502.
- Bhandari, R. y P.K. Sharma. 2006. High-light-induced changes on photosynthesis, pigments, sugars, lipids and antioxidant enzymes in freshwater (*Nostoc spongiaeforme*) and marine (*Phormidium corium*) cyanobacteria. *Photochem Photobiol*. 82:702-710.
- Bhandari, R.R. y P.K. Sharma. 2011. Photosynthetic and biochemical characterization of pigments and UV-absorbing compounds in *Phormidium tenue* due to UV-B radiation. *J Appl Phycol*. 23:283-292.
- Bischof, K., G. Kräbs, C. Wiencke y D. Hanelt. 2002. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophylls cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta*. 215:502-509.
- Blakefield, M.K. y D.O. Harris. 1994. Delay of cell differentiation in *Anabaena aequalis* caused by UV-B radiation and the role of photoreactivation and excision repair. *Photochem Photobiol*. 59:204-208.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 37(8):911-917.
- Boix, E. y A.M. Pico. 2000. "Funciones endocrinas y envejecimiento". *Endocr Nutr*. 47:113-121.
- Booij-James, I.S., S.K. Dube, M. Jansen, M. Edelman y A.K. Mattoo. 2000. Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism. *Plant Physiol*. 124(3):1275-1283.

- Borowitzka, M.A. 2005. Carotenoid production using microorganisms. *In*: Z. Cohen and C. Ratledge (Eds.) *Single Cell Oils*. AOCS Press. Champaign. Illinois. 124-137.
- Borowitzka, M.A. y L.J. Borowitzka. 1988b. Fats, oils and hydrocarbons. *In*: *Microalgal Biotechnology* (Ed.). Cambridge University Press. Cambridge 257-287.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berst. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 28:25-30.
- Bray, E.A., J. Bailey-Serres y E. Eretilnyk. 2000. Responses to abiotic stress. *In*: B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Waldorf, 1158-1203.
- Breuer, G., P.P. Lamers, D.E. Martens, R.B. Draaisma y R.H. Wijffels. 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour Technol.*124:217-226.
- Brocks, J.J., G.A. Logan, R. Buick y R.E. Summons. 1999. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science.* 285:1033-1036.
- Burke, J.J., P.E. Gamble, J.L. Hatøeld y J.E. Quisenberry. 1985. Plant morphological and biochemical responses to field water deficits. Responses of glutathione reductase activity and paraquat sensitivity. *Plant Physiol.* 79:415-419.
- Cabello-Pasini, A., V. Macías-Carranza, R. Abdala, N. Korbee y F.L. Figueroa. 2011. Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J Appl Phycol.* 23(3):363-369.

- Callaghan, T.V., L.O. Björn, Y. Chemov, T. Chapin, T.R. Christensen, B. Huntley, R.A. Ims, M. Johansson, D. Jolly, S. Jonasson, N. Matveyeva, N. Panikov, W. Oechel, G. Shaver, J. Elster, I.S. Jonsdóttir, K. Laine, K. Taulavuori, E. Taulavuori y C. Zockler. 2004. Responses to projected changes in climate and UV-B at the species level. *Ambio*. 33:418-435.
- Campbell, D., M.J. Ericksson, G. Oquist, P. Gustafsson y A.K. Clarke. 1998. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 95:364-369.
- Cano-Europa, E., R. Ortiz-Butrón, C.A. Gallardo-Casas, V. BlasValdivia, M. Pineda-Reynoso, R. Olvera-Ramirez y M. Franco-Colin. 2009. Phycobiliproteins from *Pseudanabaena tenuis* rich in c-phycoerythrin protect against HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. *J Appl Phycol*. 22:495-50.
- Canto De Loura, I., J.P. Dubacq y J.C. Thomas. 1987. The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria. *Plant Physiol*. 83:838-843.
- Carballo-Cárdenas, E.C., P.M. Tuan, M. Janssen y R.H. Wijffels. 2003. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol Eng*. 20:139-147.
- Carletti, P., A. Masi, A. Wonisch, D. Grill, M. Tausz. y M. Ferretti. 2003. Changes in antioxidants and pigment pool dimensions in UV-B irradiated maize seedlings. *Environ Exp Bot*. 50:149-157.
- Carreto, J.I. y M.O. Carignan. 2011. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Mar Drugs*. 9:387-446.

- Carreto, J.I., M.O. Carignan y N.G. Montoya. 2001. Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *catenella* and *A. minutum*. *Mar Ecol Prog Ser.* 223:49-60.
- Carvajal, M., M.R. Martínez, F. Martínez-Sánchez y C.F. Alcaraz. 1997. Effect of ascorbic acid addition to peppers on paprika quality. *J Sci Food Agric.* 75:442-446.
- Castenholz, R.W. y J.B. Waterbury. 1989. Oxygenic photosynthetic bacteria. Section 19. *In:* J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, 1710-1806.
- Castenholz, R.W. 1997. Multiple strategies for UV tolerance in cyanobacteria. *Spectrum.*10:10-16.
- Cela, J., C. Chang y S. Munné-Bosch. 2011. Accumulation of α - rather than γ -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52:1389-1400.
- Chao, J.C., M.D. Yuen, P.Y. Chen y S.W. Chien. 2002. Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients. *J Nut Biochem.* 13(11):653-63.
- Chaudhary, N. y P. Khurana. 2009. Vitamin E biosynthesis genes in rice: molecular characterization, expression profiling and comparative phylogenetic analysis. *Plant Sci.* 177:479-491.
- Chelikani, P., I. Fita y P. Loewen. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 61(2):192-208.

- Chen, C., C.V. Baalen, F.R. Tabita. 1987. DL-7-azatryptophan and citrulline metabolism in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 1F. *J Bacteriol.* 169:1114-1119.
- Chen, F. y R. Johns. 1991. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *J Appl Phycol.* 3:203-209.
- Chopra, K. y M. Bishnoi. 2008. Antioxidant profile of *Spirulina*: a blue-green microalga. *In Spirulina in Human Nutrition and Health*. Edited by Gershwin ME, Belay A. Boca Raton: CRC Press, 101-118.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol Rev.* 47:551-578.
- Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. *In: Handbook of Microalgal Mass Culture* (Ed.). Richmond. CRC Press, Boca Raton, USA. 421-454.
- Cohen, Z. y A. Vonshak. 1991. Fatty acid composition of *Spirulina* and *Spirulina*-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. *Phytochem.* 30(1): 205-206.
- Cohen, Z. y I. Khozin-Goldberg. 2005. Searching for PUFA-rich microalgae. *In: Z. Cohen and C. Ratledge* (Eds.). *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign IL. 53-72.
- Coleman, J.R. y B. Colman. 1980. Demonstration of C₃ -photosynthesis in the blue green alga, *Coccochloris peniocyctis*. *Plant.* 149:318-320.
- Colla, L.M., C. Oliveira, C. Reichert y J.A. Vieira. 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour Technol.* 98:1489-1493.
- Collier, J.L. y R.A. Grossman. 1992. Chlorosis Induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942: Not all bleaching is the same. *J Bacteriol.* 174(14):4718-26.

- Constantinescu, A., D. Han y L. Packer. 1993. Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. *J Biol Chem.* 268:10906-10913.
- Copia, J., H. Gaete, G. Zúñiga, M. Hidalgo y E. Cabrera. 2012. Effect of ultraviolet B radiation on the production of polyphenols in the marine microalga *Chlorella* sp. *Lat Am J Aquat Res.* 40(1):113-123.
- Cresswell, R.C. y P.J. Syrett. 1981. Uptake of nitrate by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot.* 32:19-25.
- Danesi, E., C. Rangel, J. Carvalho y S. Sato. 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biom Bioenerg.* 23:261-269.
- Danesi, E.D.G., C.O. Rangel-Yagui, J.C.M. Carvalho y S. Sato. 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg.* 26(4):329-335.
- Davidson, A.T., D. Bramich, H.J. Marchant y A. McMinn. 1994. Effects of UV-B irradiation on growth and survival of Antarctic marine diatoms. *Mar Biol.* 119:507-515.
- De Castro Araújo, S. y V.M. Tavano Garcia. 2005. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* bright well under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquacult.* 246(1-4):405-412.
- De Philippis, R., M. Margheri, E. Pelosi y S. Ventura. 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *J Appl Phycol.* 5:387-394.
- Dietrich, L.E., M.M. Tice y D.K. Newman. 2006. The co-evolution of life and earth. *Curr Biol.* 16: 395-400.

- Dinkova-Kostova, A.T. 2008. Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanism. *Plant Med.* 74:1548-1559.
- Doucette, G.J. y P.J. Harrison. 1991. Aspects of iron and nitrogen nutrition in the red tide dinoflagellate *Gymnodinium sanguineum*. *Mar Biol.* 110:165-173.
- Drossos, G., A. Lazou, P. Panagopoulos y S. Westaby. 1995. Deforexamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann Thorac Surg.* 59:169-172.
- Durand-Chastel, H. 1980. Production and use of *Spirulina* in México. *In: G. Shelef and C.J. Soeder (Eds.). Algae Biomass.* Amsterdam: Elsevier, North Holland Biomedical Press. 39p.
- Duval, B., K. Shetty y W.H. Thomas. 2000. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J App Phycol.* 11(6):559-566.
- Ehling-Schulz, M. y S. Scherer. 1999. UV protection in cyanobacteria. *Eur J Phycol.* 34:329-338.
- Ehling-Schulz, M., W. Bilger y S. Scherer. 1997. UV-B-Induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Bacteriol.* 194:1940-1945.
- Eilers, P.H.C. y J.C.H. Peeters. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol Model.* 42:199-215.
- El-Baky, H.H.A., F.K. El-Baz, y G.S. El-Baroty. 2003. *Spirulina* Species as a Source of carotenoids and α -Tocopherol and its Anticarcinoma Factors. *Biotechnol.* 2(3):222-240.
- El-Baky, H.H.A., F.K. El-Baz y G.S. El-Baroty. 2004. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *Int J Agric Biol.* 6:49-57.

- El-Baky, H.H.A., F.K. El-Baz y G.S. El-Baroty. 2009. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *Afr J Biotechnol.* 8(24):7059-7067.
- El-Baz, F.K., A.A. Mohamed y S.I. Alil. 2010. Callus formation, phenolics content and related antioxidant activities in tissue culture of a medicinal plant colocynth (*Citrullus Colocynthis*). *Nova Biotech.* 10:79-94.
- Ellouzi, H., K.B. Hamed, J. Cela, S. Munné-Bosch y C. Abdelly. 2011. Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritime* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). *Physiol Plant.* 142:128-143.
- Elstner, E.F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann Rev Plant Physiol.* 33:73-96
- Escamilla-Jiménez, C.I., E.Y. Cuevas-Martínez y J. Guevara-Fonseca. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM.* 52:73-75.
- Fábregas, J. y C. Herrero. 1990. Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. *J Ind Microbiol.* 5(4):259-263.
- Figuerola, F.L., A. Israel, A. Neori, B. Martínez, E.J. Malta, A. Put, S. Inken, R. Marquardt, R. Abdala y N. Korbee. 2010. Effect of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation to short-term stress (UV radiation) in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Mar Pollut Bull.* 60:1768-1778.
- Figuerola, F.L., C. Nygård, N. Ekelund y I. Gómez. 2003. Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. *J Photochem Photobiol. B.* 72:35-44.
- Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *JCB.* 194(1):7-15.

- Finkel, T. y N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408(6809):239-47.
- Fisher, N.S y R.A. Cowdell. 1982. Growth of marine planktonic diatoms on inorganic and organic nitrogen. *Mar Biol*. 72:147-155.
- Forchhammer, K. 2004. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol Rev*. 28:319-333.
- Foss P., S. Trond, A. Erland y L. Synnove. 1987. Carotenoids in diets for salmonids: V. Pigmentation of rainbow trout and sea trout with astaxanthin and astaxanthin dipalmitate in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture*. 65(3-4):293-305.
- Fouqueray, M., J.L. Mouget, A. Morant-Manceau y G. Tremblin. 2007. Dynamics of short-term acclimation to UV radiation in marine diatoms. *J Photochem Photobiol B. Biol*. 89:1-8.
- Foyer, C.H., P. Descourvieres y K.J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ*. 17:507-523.
- Fresnedo, O. y J.L. Serra. 1992. Efect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *J Phycol*. 28:786-793.
- Friso, G., C. Spetea, G.M. Giacometti, I. Vass y R. Barbato. 1994. Degradation of photosystem II reaction center D1 protein induced by UV-B radiation in isolated thylakoids: identification and characterization of C and N terminal break down products. *BBA*. 1184:78-84.
- Fronhmayer, H. y D. Staiger. 2003. Ultraviolet-B radiation –mediated responses in plants balancing damage and protection. *Plant Physiol*. 133:1420-1428.
- Fufezan, C., C.M. Gross, M. Sjodin, A.W. Rutherford, A. Krieger-Liszkay y D. Kirilovsky. 2007. Influence of the redox potential of the primary quinone

electron acceptor on photoinhibition in photosystem II. *J Biol Chem.* 282: 12492-12502.

Fujimori, E. 1981. Blue fluorescence and cross-linking of photooxidized proteins, *FEBS Lett.* 135:257-260.

Galaris, D. y A. Evangelou. 2002. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Critical Rev Oncol.* 42(1):93-103.

Gantt, E. y C.A. Lipschultz. 1974. Phycobilisome of *Porphyridium cruentum*: Pigment analysis. *Biochem.*13: 2960-2966.

Gao, K. y Z. Ma. 2008. Photosynthesis and growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyta) in response to solar UV radiation, with special reference to its minor variant. *Environ Exp Bot.* 63:123-129.

Gao, K., H. Yu y M.T. Brown. 2007. Solar PAR and UV radiation affects the physiology and morphology of the cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Photochem Photobiol B Biol.* 89:117-124.

García-Bacallao, L., L.V. García-Gómez, D.M. Rojo-Dominguez y E. Sanchez-García. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed.* 20(3):231-5.

Geider, R.J. y J. La Roche. 2002. Redfield revisited: variability of C: N: P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur J Phycol.* 37:1-17.

Gil-Jerez, C. 2015. Photosynthetic performance and biomass composition of *Chlorella fusca* (Chlorophyta) in thin-layer cascades: possible biotechnological applications. Universidad de Málaga, España. 273p.

Gill, S.S. y N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 48:909-930.

- Giorgio, M., M. Trinei, E. Migliaccio y P.G. Pelicci. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:722-728.
- Glazer, A.N. 1981. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. *In: E.E. Conn and P.K. Stumpf (Eds.). The Biochemistry of Plants. Vol.8. Academic Press, New York, 51-96.*
- Goes, J.I., N. Handa, K. Suzuki, S. Taguchi, T. Hama. 1997. Ultraviolet radiation induced changes in the production of organic compounds in Antarctic marine phytoplankton. *NIPR Symp Pol Biol.* 10:25-38.
- Gombos, Z., E. Kanervo, N. Tsvetkova, T. Sakamoto, E.M. Aro y N. Murata. 1997. Genetic enhancement of the ability to tolerate photoinhibition by introduction of unsaturated bonds into membrane glycerolipids. *Plant Physiol.* 115:551-559.
- Gómez, J.J. y R.S. Medina. 2001. Introducción a la bioquímica de los radicales libres. Mc Graw Hill Interamericana, México.
- González, R., S. Rodríguez, C. Romay, O. Ancheta, A. González, J. Armesta, D. Ramírez y N. Merino. 1999. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acid-induced colitis in rats. *Pharmacol Res.* 39 (1):55-59.
- Gordon, H.T. y J.C. Bauernfeind. 1982. Carotenoids as food colorants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* (18):59-97.
- Gosgrove, J.P., D.F. Church y W.A. Pryor. 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 22:299-304.
- Granum, E., S. Kirkvold y S.M. Myklestad. 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *MEPS.* 242:83-94.

- Grill, S.S. y N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 48:909-930.
- Grobe, C. y T. Murphy. 1998. Solar ultraviolet-B radiation effects on growth and pigment composition of the intertidal alga *Ulva expansa* (Setch.) S. y G. (Chlorophyta). *J Exp Mar Biol Ecol.* 225:39-51.
- Guihéneuf, F., M. Fouqueray, V. Mimouni, L. Ulmann, B. Jacquette y G. Tremblin. 2010. Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J Appl Phycol.* 22:629-638.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol.* 8:229-239.
- Gupta, R., P. Bhadauriya, V.S. Chauhan y P.S. Bisen. 2008. Impact of UV-B radiation on thylakoid membrane and fatty acid profile of *Spirulina platensis*. *Curr Microbiol.* 56(2):156-161.
- Gutteridge, J.M., D.A. Rowley y B. Halliwell. 1982. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of catalytic iron and antioxidant activity in extracellular fluids. *Biochem.* 206(3):605-609.
- Häder, D.P., F.L. Figueroa. 1997. Photoecophysiology of marine macroalgae. *Photochem Photobiol.* 66:1-14.
- Halliwell B. y J.M.C.Gutteridge. 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford. Fifth edition. New York, USA. 823p.
- Halliwell, B. 1982. The toxic effects of oxygen on plant tissues. *In*: L.W. Oberley (Ed). Superoxide dismutase, Vol I. CRC Press, Boca Raton, Flo. 89-123.
- Halliwell, B. 1993. The chemistry of free radicals. *Toxicol Ind Health.* 9(1-2):1-21.

- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge. 1999. Free Radicals in Biology Medicine, third Edition (Eds.). Oxford, New York.
- Hanaa, H.A., M. Hussein y G.G. El-Baroty. 2008. Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. *J Environ Agric Food Chem.* 7:2812–2832.
- Hanelt, D. 1996. Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Sci Mar.* 60:243-248.
- Harrison, P.J. y T.E. Thomas. 1988. Biomass Measurements: Protein Determination. *In: Experimental Phycology. A Laboratory Manual.* C.S. Lobban, D.J. Chapman and B.P. Kremer (Eds.). Cambridge University Press. 27-34 pp.
- Harwood, J.L. y N.J. Russell. 1984. Lipids in Plants and Microbes. George Allen y Unwin, London.
- Havaux, M. y K.K. Niyogi. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:8762-8767.
- He, Y.Y. y D.P. Häder. 2002. Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 1:729-736.
- He, Y.Y. y D.P. Häder. 2002. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine. *J Photochem Photobiol B Biol.* 66:115-124.
- He, Y.Y., M. Klish, D.P. Häder. 2002. Adaptation of cyanobacteria to UV-B stress correlated with oxidative stress and oxidative damage. *Photochem Photobiol.* 76(2): 188-196.

- Hemlata, y T. Fatma. 2009. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. *Bull Environ Contam Toxicol.* 83:509-515.
- Henley, W.J., G. Levavasseur, L.A. Franklin, S.T. Lindley, J. Ramus y C.B. Osmond. 1991. Diurnal responses of photosynthesis and fluorescence in *Ulva rotundata* acclimated to sun and shade in outdoor culture. *Mar Ecol Progr Ser.*75: 19-28.
- Henriksen, P., B. Riemann, H. Kaas, H.M. Sorensen y H.L. Sorensen. 2002. Effects of nutrient limitation and irradiance on marine phytoplankton pigments. *J Plankton Res.* 24:835-858.
- Hernandez-Ledezma, B., M. Herrero, Y. Freile-Peregrin y D. Robledo. 2013. Bioactive phenolic compounds from algae *In: Bioactive compounds from marine foods: Plant and animal sources*, First ed. Wiley-Blackwell. USA.
- Herrero, A., A.M. Muro-Pastor, A. Valladares y E. Flores. 2004. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 28:469–487.
- Hessen D., H.J. De Lange y E. Van Donk. 1997. UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshw Biol.* 38:513–524.
- Hessen, D., E. Van Donk y T. Andersen. 1995. Growth responses, P-uptake and loss of flagella in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to UV-B. *J Plant Res.* 17:17–27.
- Hideg, E., C. Spetea y I. Vass. 1994a. Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynth Res.* 39:191-199.
- Huang, L., M.P. McCluskey, H. Ni y R.A. La Rossa. 2002. Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in

response to irradiation with UV-B and white light. *J Bacteriol.* 184:6845-6858.

Iltis, A. 1980. Ecologie de *Spiruline platensis* dans les milieux natronés d'Afrique sahélienne. *In: R. Materassi (Ed.). Prospective della Coltura di Spirulina in Italia, Roma.* 41p.

Inoue, M., E.F. Sato, M. Nishikawa, A. Park, Y. Kira, I. Imada y K. Utsumi. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem.* 10(23):2495-2505.

Johnsen, G. y E. Sakshaug. 2007. Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulse-amplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry. *J Phycol.* 43:1236-1251.

Jourdan, J.P. 2006. Grow your *Spirulina*. Manual artisan culture for the production of *Spirulina*. 146p.

Kanekiyo, K., J. Lee, K. Hayashi, H. Takenaka, Y. Hayakawa, S. Endo y T. Hayashi. 2005. Isolation of an Antiviral Polysaccharide, Nostoflan, from a Terrestrial Cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *J Nat Prod.* 68(7):1037-1041.

Kaplan, D., Z. Cohen y A. Abeliovich. 1996a. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass.* 9:37-48.

Kar, M. y D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57:315-319.

Karou, D., M.H. Dicko, J. Simporé y A.S. Traore. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedical plants of *Burkina Faso*. *African J Biotechnol.* 4:823-828.

- Kemmink, J., A.P. Eker, G.A. Van der Marel, J.H. Van Boom y R. Kaptein. 1988. Photoreactivation of the thymine dimer containing DNA octamer d(GCGTTGCG). d(CGCAACGC) by the photoreactivating enzyme from *Anacystis nidulans*. J Photochem Photobiol. 1:323-328.
- Kerr, J.B. y C.T. McElroy. 1993. Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. Science. 262:1032-1034.
- Khozin-Goldberg, I. y Z. Cohen. 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. Phytochem. 67(7):696-701.
- Kim, D.S. y Y. Watanabe. 1993. The effect of long wave ultraviolet radiation (UV-A) on the photosynthetic activity of natural population of freshwater phytoplankton. Ecol Res. 8:225-234.
- Kirkman, H.N. y G.F. Gaetani. 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. Proc Nat Acad Sci. 81:4343-7.
- Kochevar, I.E. 1990. UV-induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. Photochem Photobiol. 52:795-800.
- Korbee-Peinado, N.K., R.T. Abdala, F.L. Figueroa y E.W. Helbling. 2004. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. J Phycol. 40:248-259.
- Krause, G.H. 1994. Photoinhibition induced by low temperature. In photoinhibition of photosynthesis from molecular mechanism to the field (Edited by N. R. Baker and J. R. Boyer), 331-348. BIOS Sci, Oxford.
- Kutzing T.F. 1849. Species algarum. F.A. Brockhaus, Leipzig. 922p.

- Lan-Zhou, C., L. Dun-Hai, S. Li-Rong, H. Chun-Xiang, W. Gao-Hong y L. Yong-Ding. Effects of Salt Stress on Carbohydrate Metabolism in Desert Soil Alga *Microcoleus vaginatus*. *J Integr Plant Biol.* 48(8):1-5.
- Latifi, A., M. Ruiz y C. Zhang. 2009. Oxidative stress in cyanobacteria *FEMS Microbiol Rev.* 33:258-278.
- Laurion, I. y S. Roy. 2009. Growth and photoprotection in three dinoflagellates (including two strains of *Alexandrium tamarense*) and one diatom exposed to four weeks of natural and enhanced ultraviolet-B radiation. *J Phycol.* 45:16-33.
- Lawrenz, E., E.J. Fedewa y T.L. Richardson. 2011. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *J Appl Phycol.* 23:865-871.
- Lea, U.S., R. Slimestad, P.Smedvig y C. Lillo. 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Plant.* 225(5):1245-1253.
- Ledezma-Gairaud, M. 2004. Validación del método: Determinación de Vitamina C total por HPLC. *Tecnología en Marcha.* 17:15.
- Lee H-M., M.F. Vasquez-Bermudez y N. Tandeau de Marsac. 1999. The global nitrogen regulator NtcA regulates transcription of the signal transducer PLL (GlnB) and influences its phosphorylation level in response to nitrogen and carbon supplies in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *J Bacteriol.* 181:2697-2702.
- Leema, J.T., R. Kirubakaran, N.V. Vinithkumar, P.S. Dheenani y S. Karthikayulu. 2010. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresour Technol.* 101:9221-9227.

- Lesser, M.P. y J.M. Shick. 1989b. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in Zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition and enzyme against active oxygen toxicity. *Mar Biol.* 102:243-255.
- Liang, Y., J. Beardall y P. Heraud. 2006. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J Photochem Photobiol B Biol.* 82:161-172.
- Licett, B., M. Guevara, N. Lemus, L. Freites, L. Marromero, C. Lodeiros y B.O. Arredondo-Vega. 2014. Crecimiento y composición bioquímica de *Arthrospira platensis* (division cyanophyta) cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno. *Bol Inst Oceanogr.* 53(1):3-13.
- Lohrmann, N.L., B.A. Logan y A.S. Johnson. 2004. Seasonal acclimatization of antioxidants and photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, two co-occurring red algae with differing stress tolerance. *Biol Bull.* 207:225-232.
- Loreto, C., N. Rosales, J. Bermúdez y E. Morales. 2003. Pigment and protein production of the cyanobacterium *Anabaena pcc 7120* in relation to nitrogen concentration and irradiance. *Gayana Bot.* 60(2):83-89.
- Lowry, O.H., N.J., Rosenbrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-272.
- Lumsden, J. y D.O. Hall. 1974. Subcellular Localization and Identification of Superoxide Dismutase in the Leaves of Higher Plants. *Biochem Biophys Res Commun.* 58:35-41.

- Lushchak V.I. y N.M. Semchuk. 2012. Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta Physiol Plant.* 34:1607-1628.
- Ma, S.Y., G.C. Wang, H.B. Sun y C.K. Zeng. 2003. Characterization of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycoyanin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum*. *Plant Sci.* 164: 253-257.
- Mackerness, A.H.S., P.J. Butt, B.R. Jordan y B. Thomas. 1996. Amelioration of ultraviolet-B-induced down-regulation of mRNA levels for chloroplast proteins, by high irradiance. *J Plant Physiol.* 148:100-106.
- Mackerness, A.H.S., S.L. Surplus, B.R. Jordan y B. Thomas. 1998. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light levels in pea (*Pisum sativum* L.): Role of active oxygen species and antioxidant enzymes. *Photochem Photobiol.* 68:88-96.
- Marcoval, M.A., V.E. Villafane y E.W. Helbling. 2007. Interactive effects of ultraviolet radiation and nutrient addition on growth and photosynthesis performance of four species of marine phytoplankton. *J Photochem Photobiol Biol.* 89:78-87.
- Marinho-Soriano, E., P.C. Fonseca, M.A.A. Carneiro y W.S.C. Moreira. 2006. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour Technol.* 97:2402-2406.
- Marín-Prida, J., A. Llópiz-Arzuaga, N. Pavón, G. Pentón-Rol y G.L. Pardo-Andreu. 2015. Aplicaciones de la c-ficocianina: métodos de obtención y propiedades farmacológicas. *Rev Cienc Farm Aliment.* 1:29-43.
- Market, M., P.C. Andrews, y B.M. Babior. 1984. Measurement of $O_2^{\bullet-}$ production by human neutrophils. Academic Press, Orlando, Florida. 358-365.

- Markou, G., I. Chatzipavlidis y D. Georgakakis. 2012. Carbohydrates production and bio-flocculation characteristics in cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: improvements through phosphorus limitation process. *Bioenerg Res.* 5:915-925.
- Matés, J.M. 2000. Effects of antioxidants enzymes in the molecular control reactive oxygen species toxicology. *Toxicol.* 153(1-3):83-104.
- Matsumura, Y y H. N. Ananthaswamy. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 195(3):298-308.
- Mayo, F.R. 1986. The evolution of free radical chemistry at Chicago, *J Chem Educ.* 63, 97.
- McCord, J.M y I. Fridovich. 1988. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988) *Free Radic Biol Med.*5:363-9.
- McKenzie, R., B. Connor y G. Bodeker. 1999. Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss. *Science.* 285:1709.1711.
- Melis, A., J.A. Nemson y M.A. Harrison. 1992. Damage to functional components and partial degradation of PS II reaction centre proteins upon chloroplast exposure to ultraviolet-B radiation. *BBA.* 1100(3):312–320.
- Mendiola, J.A., D. García-Martínez, F.J. Rupérez, P.J. Martín-Álvarez, G. Reglero, A. Cifuentes, C. Barbas, E. Ibañez y F.J. Señoráns. 2008. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *J Supercrit Fluids.* 43(3):484–489.
- Mendoza-Cóaztl, D.G. y R. Moreno-Sánchez. 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmio stress. Pathway modeling for plants. *J Theor Biol.* 238.919-936.
- Méne-Saffrané, L. y D. Della Penna. 2010. Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiol Biochem.* 48:301-309.

- Mengelt, C. y B.B. Prezelin. 2005. UVA enhancement of carbon fixation and resilience to UV inhibition in the genus *Pseudo-nitzschia* may provide a competitive advantage in high UV surface waters. *Mar Ecol Prog Ser.* 301:81-93.
- Mexia-Bernal, K.H. 2011. Efecto de la salinidad e irradiancia en el crecimiento, fotosíntesis y composición de *Spirulina maxima* para su utilización en la acuicultura. Bachelor Thesis. Universidad de Occidente, Unidad Guasave, Sinaloa, México, 96p.
- Miller, S.R., M. Martin, J. Touchton y R.W. Castenholz. 2002. Effects of nitrogen availability on pigmentation and carbon assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain. *Arch Microbiol.* 177(5):392-400.
- Miranda, M.S., R.G. Cintra, S.B.M. Barros y J.M. Filho. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J Med Biol Res.* 31:1075-1079.
- Mishra, H.P. 1974. Superoxide radical and superoxide dismutase *Fed Proc.* 33:1505.
- Mishra, S., R.D. Tripathi, S. Srivastava, S. Dwivedi, P.T. Trivedi, D.O. Phankher y A. Khare. 2009. Thiol metabolism play significant role during role cadmio detoxification by *Ceratophyllum demersum*. *L Biores Techn.* 100:215-2161.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410.
- Moon, J.K. y T. Shibamoto. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem.* 57:1655-1666.
- Moore, L., A.F. Post, G. Rocap y S.W. Chisholm. 2002. Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Limnol Oceanogr.* 47:989-996.

- Morris, I. 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis. *In: Algal Physiology and Biochemistry*. W.D.P. Stewart (Ed), 583-609. Blackwell Scientific Pub. Oxford.
- Mostafa, M.S.I., M.Y. El-Ayouty y D.M. Piercey-Normore. 2014. Antioxidants characterization in selected cyanobacteria. *Ann Microbiol.* 64(3):1223-1230.
- Muhling, M., A. Belay y B.A. Whitton. 2005. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira (Spirulina)* strains. *J Appl Phycol.* 17:137-146.
- Munné-Bosch, S. 2007. α -Tocopherol: a multifaceted molecule in plants. *Vitam Horm.* 76:375-392.
- Navarro, NP, A. Mansilla, M. Palacios. 2007. UVB effects on early developmental stages of commercially important macroalgae in southern Chile. *J Appl Phycol* 20:447-456.
- Niu, J.F., G.C. Wang, X. Lin y B.C. Zhou. 2007. Large-scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *J Chromatogr.* 850:267-76.
- Noctor, G. y C.H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol.* 49:249-279.
- Oh, M.M., E.E. Carey, y C.B. Rajashekar. 2009. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiol Biochem.* 47:578–583.
- Olguin, E., S. Galicia, O. Angulo-Guerrero y E. Hernández. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp. (Arthrospira)* grown on digested pig waste. *Bioresour Technol.* 77:19-24.

- Oliveira, M.A.C.L., M.P.C. Monteiro, P.G. Robbs y S.G.F. Leite. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquacult Int.* 7:261-275.
- Osmond, B., M. Badger, K. Maxwell, O. Bjorkman y R. Leegod. 1997. Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci.* 2:119-120.
- Packer, L., S.U. Weber y G. Rimbach. 2001. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *J Nutr.* 131:369-373.
- Pakker, H., R.S.T. Martins, P. Boelen, A.G.J. Buma, O. Nikaido y A.M. Breeman. 2000. Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet B-induced DNA damage in *Palmaria palmate* (Rhodophyta). *J Phycol.* 36:334-341.
- Palinska, K.A., B. Deventer, K. Hariri y M. Lotocka. 2011. A taxonomic study on *Phormidium*-group (cyanobacteria) based on morphology, pigments, RAPD molecular markers and RFLP analysis of the 16S rRNA gene fragment. *Fottea* 11(1):41-55.
- Pandey, J.P. y A. Tiwari. 2010. Optimization of Biomass Production of *Spirulina maxima*. *J Algal Biomass Utiln.* 1(2):20-32.
- Paraskevaidis, I.A., E.K. Iliodromitis, D. Vlahakos, D.P. Tsiapras y A. Nikolaidis. 2005. Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance. *Eur Heart J.* 26:263-70.
- Persky, A. M., P.S Green, L. Stublely, C.O. Howell, L. Zaulyanov, G.A. Brazeau y J.W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative

- damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. Proc Soc Exp Biol Med. 223(1):59-66.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod. 63(7):1035-1042.
- Pintner, I.J. y L. Provasoli. 1958. Artificial Cultivation of a Red-Pigmented Marine Blue-Green Alga, *Phormidium persicinurn*. J gen Microbiol. 18:190-197.
- Piñero, J.E., P. Bermejo y A.M. Villar del Fresno. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. Farmac. 56(5-7):497-500.
- Piorreck, M., K.H. Baasch y P. Pohl. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. Phytochem. 23:207-216.
- Poppe, F., D. Hanlet y C. Wiencke. 2002. Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic red alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. Bot Mar. 45:253-261.
- Prakash, D., S. Suri, G. Upadhyay y B.N. Singh. 2007. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medical plants. Int J Food Sci Nutr. 58:18-28.
- Prasad, S.M., R. Dwivedi y M. Zeeshan. 2005. Growth, photosynthetic electron transport, antioxidant responses of young soybean seedlings to simultaneous exposure of nickel and UV-B stress. Photosynthetica 43: 177-185.
- Priya, K.M. 1996. Studies on important phytochemicals and genetic transformation of the cyanobacterium *Spirulina*. Thesis of PhD in Biochemistry. University of Mysore.
- Quezada, A. y W.F. Vincent. 1997. Strategies of adaptation by antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. Eur J Phycol. 32:335-342.

- Rafiqul M., A. Hassan, G. Sulebele, C. Orosco y P. Roustaian. 2003. Influence of temperature on growth and biochemical composition of *Spirulina platensis* and *Spirulina fusiformis*. Iranian Inter J Sci. (4)2:97-106.
- Raha, S. y B.H Robinson. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease, and aging. Trends Biochem Sci. 25:502-8.
- Rahman, M.A., J. Kumar, S. Sundaram y R. Gopal. 2015. Response of growth, photosynthetic pigments, laser-induced pigment fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation to ultraviolet-B radiation in two cyanobacteria. Ind J Plant Physiol. 20(3):240-248.
- Rajagopal, S., S.D.S. Murthy y P. Mohanty. 2000. Effect of ultraviolet-B radiation on intact cells of the cyanobacterium *Spirulina platensis*: characterization of the alterations in the thylakoid membranes. J Photochem Photobiol B Biol. 54:61-66.
- Rajesh, P.R., P.S. Shailendra, D.P. Häder y P.S. Rajeshwar. 2010. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. Biochem Bioph Res Co. 397:603-607.
- Rao, A.V. y L.G. Rao. 2007. Carotenoids and human health. Pharmacol Res. 55: 207-216.
- Ravanat, J.L., T. Douki y J. Cadet. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. J Photochem Photobiol B Biol. 63:88-102.
- Richardson, J.S., K.A. Thomas, B.H. Rubin y D.L. Richardson. 1974. Molecular and functional aspects of superoxide dismutases. Proc Nat Acad Sci USA.
- Richmond, A. 1986. Microalgae of economic potential. *In*: A. Richmond (Ed.). Handbook of microalgal mass culture. CRC Press; Iric, Boca Ratón, USA. 199-243.

- Rijn, J. y M. Shilo. 1986. Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Oscillatoria* sp.) and its effect on macromolecular synthesis. *Appl Environ Microbiol.* 52:340-344.
- Roche, E.D. y R.T. Sauer. 2001. Identification of endogenous SsrA-tagged proteins reveals tagging at positions corresponding to stop codons. *J Biol Chem.* 276:28509-28515.
- Rodríguez, J.M., J.R. Menéndez y Y. Trujillo. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.*30:36-44.
- Rodriguez-Amaya, D.B. 1989. Critical review of provitamin A determination in plant foods. *J Micronutr Anal.* 5:191-225.
- Rodriguez-Amaya, D.B. 1999. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Arch Latinoamericanos Nutrit.* 49:38-47.
- Roleda, M.Y., D. Hanelt y C. Wiencke. 2005. Growth kinetics related to physiological parameters in young *Saccorhiza dermatodea* and *Alaria esculentasp* exposed to UV radiation. *Polar Biol.* 28:539-549.
- Roy, S. 2000. Strategies for the minimization of UV-induced damage *In*: S. de Mora, S. Demers and M. Vernet (Eds.). *The effects of UV radiation in the marine environment.* Cambridge University Press, Cambridge.176-205.
- Rupali, R.B. y P.K. Sharma. 2011. Photosynthetic and biochemical characterization of pigments and UV-absorbing compounds in *Phormidium tenue* due to UV-B radiation. *J Appl Phycol.* 23(2): 283-292.
- Salguero, A., M. Benito, J. Vígara, J.M. Vega, C. Vilchez y R. León. 2003. Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol Eng.* 20:249-253.
- Salomon, E. y N. Keren. 2011. Manganese limitation induces changes in the activity and in the organization of photosynthetic complexes in the

- cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol.* 155:571-579.
- Sánchez, M.R., J. Bernal, C. Rozo y I. Rodríguez. 2003b. *Spirulina (Arthrospira)*: An edible microorganism: A review. *Univ Sci.* 8(1):11-12.
- Sass. L., C. Spetea, Z. Maté, F. Nagy y I. Vass. 1997. Repair of UV-B induced damage of photosystem II via de novo synthesis of the D1 and D2 reaction center subunits in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Photosynth Res.* 54:55-62.
- Sathyaikumar, K.V., I. Swapna., P.V. Reddy, C.M. Murthy, K.R. Roy, A. Dutta, B. Senthilkumaran y P. Reddanna. 2007. Co-administration of C-phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. *J Neurol Sci.* 252:67-75.
- Sato, N. y N. Murata. 1988. Membrane lipids. *In: Methods in Enzymology.* 167: 251-259.
- Sawada, Y., T. Ohyama y A. Yamazaki. 1972. Superoxide radical and superoxide dismutase. *BBA.* 268: 305-12.
- Schreiber, U., T. Endo, H. Mi y K. Asada. 1995. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 36:873-882.
- Schubert, N., E. Garcia-Mendoza y I. Pacheco-Ruiz. 2006. Carotenoid composition of marine red algae. *J Phycol.* 42:1208-1216.
- Schwarz R. y K. Forchhammer. 2005. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiol.* 8:2503-14.
- Senhorinho, G.N.A., G.M. Ross y J.A. Scott. 2015. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. *Phycol.* 54(3), 271-282.

- Serval, M.O., C. Claire, A. Darrien, L. Coiffard y Y. Roeck-Holtzhauer. 1994. Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochem.* 36:691-697.
- Shailendra, P.S., H. Donat-P y P.S. Rajeshwar. 2010. Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: Mitigation strategies. *Ageing Res Rev.* 9:79-90.
- Sharma, P.K. 2002. Photoinhibition of photosynthesis and mechanism of protection against photodamage in crop plants. *Everymans Sci.* 36:237-252.
- Shukla, V., M. Vashistha y S.N. Singh. 2009. Evaluation of antioxidant profile and activity of amalaki (*emblica officinalis*), *Spirulina* and wheat grass. *Indian J Clin Biochem.* 24(1):70-75.
- Sieck, L.W. 2004. Reactions of $(\text{CO}_2)_2 + (\text{CO}_2)_2 +$ association ions. *International J Chem Kin.* 10:335-366.
- Siegelman, H. y J. Kycia. 1978. Algal bili-proteins: Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press, Cambridge, 71-79.
- Sies, H. y D.P Jones. 2007. Encyclopedia of Stress (Ed.). Elsevier. 3:45-48.
- Singh, S., B.N. Kate, U.C. Banerjee. 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol.* 25:73-95.
- Singleton, V.L. y J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid agent. *American J Enol Viticulture.* 16:144-158.
- Sinha, R.P. y D.P. Häder. 2008. UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Sci.* 1774(3):278-289.
- Skerratt, J.H., A.D. Davidson, P.D. Nichols y T.A. McMeekin. 1998. Effect of UV-B on lipid content of three Antarctic marine phytoplankton. *Phytochem.* 49:999-1007.

- Stapleton, A.E. 1992. Ultraviolet radiation and plants: burning questions, *Plant Cell* 4:1353-1358.
- Steinman, H.M., J.L. Abernathy y R.L. Hill. 1974. Free radicals and oxidative stress. *Biol Chem.* 249:7339-47.
- Stolte, W., G.W. Kraay, A.A.M. Noordeloos y R. Riegman. 2000. Genetic and physiological variation in pigment composition of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) and the potential use of its pigment ratios as a quantitative physiological marker. *J Phycol.* 36:529-539.
- Strasser, R.J., A. Srivastava y M. Tsimilli-Michael. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *In:* M. Yunus, U. Pathre and P. Mohanty (Eds.). *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation.* Taylor & Francis: London, 483p.
- Sukenik, A. 1999. Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. *In:* Cohen Z (Ed.). *Chemicals from microalgae.* Taylor & Francis, London, 56p.
- Sushanta K.S., U. Lakshmanan y S. Gopalakrishnan. 2003. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. *FEMS Microbiol Ecol.* 45:263-272.
- Suzuki, K. 2000. Measurements of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. *In:* N.Taniguchi and J. Gutteridge (Eds.). *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species.* Oxford University Press. 91-95.
- Szalai, G., T. Kellös, G. Galiba y G. Kocsy. 2009. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *J Plant Growth Regul.* 28:66-80.

- Tabita, F.R. 1994. The biochemistry and molecular regulation of carbon dioxide metabolism in cyanobacteria. *In*: D.A. Bryant (Ed.). The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer, Dordrecht, 437-467.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. Plant Physiology. Fourth ed. Sinauer, Sunderland, MA. EUA. 764p.
- Takeuchi, Y., M. Murakami, N. Nakajima, N. Kondo y O. Nikaido. 1998. The photorepair and photoisomerization of DNA lesions in etiolated cucumber cotyledons after irradiation by UV-B depends on wavelength. *Plant Cell Physiol.* 39:745-750.
- Tang, Y.L., W.W. Ren, L. Zhang y K.X. Tang. 2011. Molecular cloning and characterization of a tocopherol cyclase gene from *Lactuca sativa* (Asteraceae). *Genet Mol Res.* 10:693-702.
- Tedesco, M y E. Duerr. 1989. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina* UTEX 1928. *J Appl Phycol.* 1:201-209.
- Then, C., K. Herbinger, V.C. Luis, C. Heerdt, R. Matyssek y G. Wieser. 2009. Photosynthesis, chloroplast pigments, and antioxidants in *Pinus canariensis* under free-air ozone fumigation. *Environ Pollut.* 157:392-395.
- Tiboni, O. y O. Ciferri. 1985. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina* sp. *Ann Rev Microbiol.* 39:503-526.
- Tichy, M. y W. Vermaaz. 1999. *In vivo* role of catalase-peroxidase in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 181:1875-1882.
- Torabinejad, J. y M.M. Caldwell. 2000. Inheritance of UV-B tolerance in seven ecotypes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh, and their F1 hybrids. *J Hered.* 91:228-233.

- Turyanitza, I., M. Baloghova, B. Paulovicsova, M. Burdova, J. Hudec y L. Balint. 2006. Antioxidant and antiradical activity of plant resources as indicators of food value. *Ann Univ Maria E. Curie-Sklodowska. Lublin-Polonia.* 19(1):91-94.
- Uslu, L., O. Isik, K. Koç y T. Göksan. 2011. The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. *Afric J Biotechnol.* 10(3):386-389.
- Vannela, R y S.K. Verma. 2006. Co^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnol Prog.* 22:1282-1293.
- Vass, I., L. Sass, C. Spetea, A. Bakou, D.F. Ghanotakis y V. Petrouleas. 1996. UV-B induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor side components. *Biochem.* 35(27):8964-8973.
- Vass, I., D. Kirilovsky, I. Perewoska, Z. Mate, F. Nagy y A.L. Etienne. 2000. UV-B radiation induced exchange of the D1 reaction centre subunits produced from the *psbA2* and *psbA3* genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem.* 267:2640-2648.
- Vázquez-Duhalt, R. y B.O. Arredondo-Vega. 1991. Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* ('A' Race). *Phytochem.* 30(9):2919-2925.
- Velázquez-Paniagua, M., B. Prieto-Gómez y R. Contreras-Pérez. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* (75):36-43.
- Vidussi, F., H. Claustre, J. Bustillos-Guzman, C. Cailliau y J.C. Marty. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *J Plank Res.* 18:2377-2382.

- Villafane, V.E., M.A. Marcoval y E.W. Helbling. 2004. Photosynthesis versus irradiance characteristics in phytoplankton assemblages off Patagonia (Argentina): temporal variability and solar UVR effects. *Mar Ecol Prog Ser.* 284:23-34.
- Vonshak, A. 1997. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, cell-biology and Biotechnology. Taylor y Francis. First edition. London. 233p.
- Vosjan, J.H., G. Dohler y G. Nieuwland. 1990. Effect of UV-B irradiance on the ATP content of microorganisms of the Weddell Sea (Antarctica). *Neth J Sea Res.* 25:391-393.
- Wang, G.C., B.C. Zhou y C.K. Tseng. 1998. Isolation, properties and spatial site analysis of the γ subunits of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin. *Sci China.* 41(1): 9-17.
- Wang, K.S. y T.J. Chai. 1994. Reduction in omega-3 fatty acids by UV-B irradiation in microalgae. *J Appl Phycol.* 6(4):415-421.
- Wang, Q., Y., Hou, J. Miao y G. Li. 2009. Effect of UV-B radiation on the growth and antioxidant enzymes of Antarctic sea ice microalgae *Chlamydomonas* sp. *ICEL Acta Physiol Plant.* 31:1097-1102.
- Weathers, P.J. y M.M. Allen. 1978. Variations in short term products of inorganic carbon fixation in exponential and stationary phase cultures of *Aphanocapsa* 6308. *Arch Microbiol.* 116:231-234.
- Weaver, L.M. y Herrmann, K. 1997. Dynamics of skimimate pathway in plants. *Trends plant Sci.* 2:346-351.
- Weisiger, R.A y I. Fridovich. 1973. Superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 248:3582-92.
- Whitton, B. 1992. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. *In*: N. Mann, N. Carr (Eds.). *Photosynthetic prokaryotes.* Plenum Press. 1-37.

- Wilson, M., S. Ghosh, K.E. Gerhardt, N. Holland, T.S. Babu, M. Edelman, E.B. Dumbroff y B.M. Greenberg. 1995. *In vivo* photomodification of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase holoenzyme by ultravioletB radiation. *Plant Physiol.* 119:221-229.
- Wong, C.Y., W.L. Chu, H. Marchant y S.M. Phang. 2007. Comparing the response of Antarctic, tropical and temperate microalgae to ultraviolet radiation (UVR) stress. *J Appl Phycol.* 19:689-699.
- Wu, S., L.J. Mickley, D.J. Jacob, D. Rind y D.G. Streets. 2008. Effects of 2000–2050 changes in climate and emissions on global tropospheric ozone and the policy-relevant background surface ozone in the United States. *J Geophys Res.* 113:18312.
- Xue, L., S. Li, H. Sheng, H. Feng, S. Xu y L. An. 2007. Nitric oxide alleviates oxidative damage induced by enhanced ultraviolet-B radiation in cyanobacterium. *Curr Microbiol.* 55:294-301.
- Yamasaki, H. y C.S. Grace. 1998. ESR detection of phytophenoxyl radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H₂O₂-peroxidase system. *FEBS Lett.* 422:377-380.
- Yang, H., E Lee y H. Kim. 1997. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Sci.* 61:1237-1244.
- Yang, Z., L. Geng, W. Wang y J. Zhang. 2012. Combined effects of temperature, light intensity, and nitrogen concentration on the growth and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* in batch culture. *Biochem Syst Ecol.* 41:130-135.
- Yoch, D.C. y J.W. Gotto. 1982. Effect of light intensity and inhibitors of nitrogen assimilation on NH⁴⁺ inhibition of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum* y *Anabaena* sp. *J bacteriol.* 151(2):800-806.

- Young, A.J. y G.M. Lowe. 2001. Antioxidant and Prooxidant properties of carotenoids. *Archives Biochem Biophys*. 385(1):20-7.
- Yusuf, M.A., D. Kumar, R. Rajwanshi, R.J. Strasser, M. Tsimilli-Michael y N.B. Sarin. 2010. Overexpression of gamma-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochim Biophys Acta*. 1797:1428-1438.
- Zeeshan, M. y S.M. Prasad. 2009. Differential response of growth, photosynthesis, antioxidant enzymes and lipid peroxidation to UV-B radiation in three cyanobacteria. *S Afr J Bot*. 75:66-474.
- Zhang, W.J. y L.O. Björn. 2009. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation on medical compounds in plants. *Fitoterapia*. 80:207-218.
- Zhao, X. y J.S. Taylor. 1997. Mutation spectra of TA, the major photoproduct of thymidyl-(3'5')-deoxyadenosine, in *Escherichia coli* under SOS conditions. *Nucleic Acids Res*. 24:1561-1565.
- Zubia, M., Y. Freile-Pelegrín y D. Robledo. 2014. Photosynthesis, pigment composition and antioxidant defences in the red alga *Gracilaria tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) under environmental stress. *J Appl Phycol*. 26:2001-2010.
- Zudaire, L. y S. Roy. 2001. Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J Photochem Photobiol B Biol*. 62:26-34.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla IX. Coeficientes de correlación de Pearson (R^2) entre las variables analizadas en *Spirulina (Arthrospira) maxima* en el tratamiento +N+PAR. 1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasa total (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Aloficocianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados, 16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Vitamina C, 20) Vitamina E, 21) Rendimiento efectivo *in situ* (Y(II)), 22) Eficiencia fotosintética (α) 23) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 24) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 25) Irradiancia de saturación (E_k) y 26) Irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 2. Tabla X. Coeficientes de correlación de Pearson (R^2) entre las variables analizadas en *Spirulina (Arthrospira) maxima* en el tratamiento -N+PAR. 1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasa total (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Aloficocianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados, 16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Vitamina C, 20) Vitamina E, 21) Rendimiento efectivo *in situ* (Y(II)), 22) Eficiencia fotosintética (α) 23) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 24) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 25) Irradiancia de saturación (E_k) y 26) Irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 3. Tabla XI. Coeficientes de correlación de Pearson (R^2) entre las variables analizadas en *Spirulina (Arthrospira) maxima* en el tratamiento +N+PAR+UVR. 1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasa total (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Aloficocianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados, 16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Rendimiento efectivo *in situ* (Y(II)), 20) Eficiencia fotosintética (α) 21) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 22) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 23) Irradiancia de saturación (E_k) y 24) Irradiancia de fotoinhibición

(*Eopt*). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 4. Tabla XII. Coeficientes de correlación de Pearson (R^2) entre las variables analizadas en *Spirulina (Arthrospira) maxima* en el tratamiento -N+PAR+UVR. 1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasa total (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Aloficocianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados, 16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Rendimiento efectivo in situ ($Y(II)$), 20) Eficiencia fotosintética (α) 21) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 22) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 23) Irradiancia de saturación (E_k) y 24) Irradiancia de fotoinhibición (*Eopt*). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 5. Tabla XIII. Resumen de las correlaciones significativas entre variables en *Spirulina (Arthrospira) maxima* en los tratamientos probados I) +N+PAR, II) –N+PAR, III)+N+PAR+UVR y IV)-N+PAR+UVR. 1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasa total (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Aloficocianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados, 16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Vitamina C, 20) Vitamina E, 21) Rendimiento efectivo in situ ($Y(II)$), 22) Eficiencia fotosintética (α) 23) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 24) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 25) Irradiancia de saturación (E_k) y 26) Irradiancia de fotoinhibición (*Eopt*). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 6. Tabla XIV. Coeficientes de correlación de Pearson (R^2) entre las variables analizadas en *Phormidium persicinum* en el tratamiento +N+PAR. 1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasa total (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Aloficocianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados,

16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Vitamina C, 20) Rendimiento efectivo in situ (Y(II)), 21) Eficiencia fotosintética (α) 22) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 23) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 24) Irradiancia de saturación (E_k) y 25) Irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 7. Tabla XV. Coeficientes de correlación de Pearson (R^2) entre las variables analizadas en *Phormidium persicinum* en el tratamiento -N+PAR. 1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasa total (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Alococianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados, 16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Vitamina C, 20) Rendimiento efectivo in situ (Y(II)), 21) Eficiencia fotosintética (α) 22) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 23) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 24) Irradiancia de saturación (E_k) y 25) Irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 8. Tabla XVI. Coeficientes de correlación de Pearson (R^2) entre las variables analizadas en *Phormidium persicinum* en el tratamiento +N+PAR+UVR. 1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasa total (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Alococianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados, 16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Rendimiento efectivo in situ (Y(II)), 20) Eficiencia fotosintética (α) 21) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 22) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 23) Irradiancia de saturación (E_k) y 24) Irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 9. Tabla XVII. Coeficientes de correlación de Pearson (R^2) entre las variables analizadas en *Phormidium persicinum* en el tratamiento -N+PAR+UVR.

1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasas totales (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Aloficocianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados, 16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Rendimiento efectivo in situ ($Y(II)$), 20) Eficiencia fotosintética (α) 21) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 22) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 23) Irradiancia de saturación (E_k) y 24) Irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 10. Tabla XVIII. Resumen de las correlaciones significativas entre variables en *Phormidium persicinum* en los tratamientos probados I) +N+PAR, II) -N+PAR, III)+N+PAR+UVR y IV)-N+PAR+UVR. 1) concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD), 3) actividad de catalasa (CAT), 4) actividad de peroxidasas totales (POX), 5) Compuestos fenólicos totales, 6) Clorofila a, 7) Carotenoides, 8) Ficocianina, 9) Aloficocianina, 10) Ficoeritrina, 11) Capacidad antioxidante total, 12) Proteínas, 13) Carbohidratos 14) Lípidos, 15) AG saturados, 16) AG monoinsaturados, 17) AG biinsaturados, 18) AG poliinsaturados, 19) Vitamina C, 20) Rendimiento efectivo in situ ($Y(II)$), 21) Eficiencia fotosintética (α) 22) Rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), 23) Tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}), 24) Irradiancia de saturación (E_k) y 25) Irradiancia de fotoinhibición (E_{opt}). A= No hay variación. *La correlación es significativa a $p<0.05$, ** La correlación es significativa a $p<0.01$, *** La correlación es significativa a $p<0.001$.

Anexo 11. Espectros de las lámparas utilizadas (280-750 nm). Radiación espectral recibida por los organismos en cada uno de los tratamientos, PAR y PAR+UV. La línea negra representa el espectro de la lámpara de emite radiación PAR, mientras que la línea punteada representa el espectro conjunto de la lámpara de radiación PAR sumado al de la lámpara de UVR.

Anexo 12. Curvas de atenuación de la irradiancia. Irradiancia PAR expresada en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (línea azul) y UV en la banda de UVA (315-400 nm) y UVB (280-315 nm) expresada en W m^{-2} (línea roja y verde respectivamente) en función de la distancia a la fuente de luz (m). Con base a las ecuaciones extraídas a partir de esta gráfica ($R^2=0,99$) se estableció una distancia los biorreactores a las lámparas de irradiancia PAR y UV.

Tabla IX. Continuación

Variabes	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Radical superóxido	0.01	0.25	0.38	0.55	0.04	0.78	0.26	0.6	0.99	0.83	0.85	0.81	0.79
TBARS	0.16	0.002	0.08	0.29	0.38	0.7	0.37	0.51	0.99*	0.76	0.91	0.74	0.85
SOD	0.58	0.02	0.05	0.05	0.06	0.07	0.88	0.17	0.77	0.16	0.96	0.12	0.99
CAT	0.81*	0.6	0.64	0.69	0.24	0.86	0.12	0.71	0.96	0.90	0.77	0.88	0.69
POX	0.25	0.4	0.009	0.16	0.857	0.14	0.96	0.38	0.62	0.06	0.88	0.10	0.93
Compuestos fenólicos totales	0.03	0.3	0.55	0.43	0.385	A							
Clorofila a	0.4	0.07	0.02	0.07	0.28	0.26	0.78	0.02	0.88	0.34	0.990	0.31	0.99*
Carotenoides	0.7	0.71	0.89*	0.90*	0.75	0.76	0.28	0.59	0.99	0.82	0.86	0.80	0.79
Ficocianina	0.86*	0.79	0.66	0.79	0.38	0.97	0.16	0.88	0.84	0.99	0.55	0.98	0.450
Aloficocianina	0.79	0.64	0.8	0.89*	0.38	0.73	0.33	0.54	0.99*	0.79	0.89	0.77	0.82
Ficoeritrina	0.04	0.35	0.05	0.08	0.23	0.46	0.99*	0.66	0.33	0.38	0.68	0.42	0.75
Capacidad antioxidante total	0.85	0.34	0.68	0.8	0.26	0.57	0.52	0.36	0.99	0.65	0.96	0.62	0.92
Proteínas	0.34	0.74	0.91*	0.88*	0.74	0.99**	0.4	0.97	0.68	0.99	0.33	0.99*	0.22

Tabla X. Continuación

Varibles	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Radical superóxido	0.19	0.09	0.08	0.12	0.02	0.90	0.65	0.46	0.92	0.79	0.09	0.68	0.09
TBARS	0.55	0.56	0.37	0.01	0.32	0.44	0.98	0.91	0.48	0.23	0.69	0.07	0.70
SOD	0.39	0.50	0.41	0.58	0.49	0.85	0.27	0.49	0.83	0.95	0.79	0.99	0.78
CAT	0.19	0.71	0.53	0.52	0.60	0.99	0.41	0.18	0.99	0.93	0.20	0.86	0.20
POX	0.79	0.62	0.38	0.23	0.30	0.56	0.95	0.85	0.60	0.37	0.58	0.22	0.58
Compuestos fenólicos totales	0.17	0.08	0.19	0.15	0.08	A							
Clorofila a	0.47	0.17	0.33	0.39	0.33	0.88	0.70	0.51	0.90	0.75	0.15	0.64	0.15
Carotenoides	0.19	0.52	0.32	0.26	0.31	0.94	0.58	0.37	0.96	0.85	0.01	0.75	0.004
Ficocianina	0.46	0.78	0.81	0.83*	0.83*	0.12	0.92	0.99	0.07	0.33	0.97	0.48	0.97
Aloficocianina	0.78	0.63	0.63	0.78	0.62	0.22	0.88	0.97	0.17	0.43	0.99	0.57	0.99
Ficoeritrina	0.40	0.14	0.29	0.36	0.18	0.73	0.85	0.70	0.77	0.57	0.38	0.43	0.39
Capacidad antioxidante total	0.93	0.36	0.59	0.95	0.67	0.42	0.76	0.89	0.38	0.61	0.99	0.73	0.99
Proteínas	0.79	0.24	0.36	0.60	0.42	0.17	0.99	0.99	0.22	0.05	0.86	0.21	0.87

Tabla XI. Continuación

Variables	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Radical superóxido	0.45	0.47	0.58	0.36	0.88	0.39	0.99*	0.99	0.85	0.91	0.45
TBARS	0.92	0.86	0.79	0.91	0.42	0.89	0.12	0.21	0.47	0.38	0.92
SOD	0.94	0.82	0.75	0.89	0.37	0.87	0.18	0.26	0.42	0.32	0.94
CAT	0.64	0.99*	0.98	0.99*	0.79	0.99**	0.34	0.26	0.82	0.75	0.64
POX	0.40	0.98	0.99*	0.95	0.92	0.96	0.58	0.51	0.94	0.90	0.41
Compuestos fenólicos totales	0.52	0.99*	0.99*	0.98	0.87	0.99	0.47	0.39	0.89	0.84	0.52
Clorofila a	0.45	0.48	0.58	0.36	0.89	0.39	0.99*	0.99	0.86	0.91	0.44
Carotenoides	0.79	0.95	0.91	0.98	0.62	0.98	0.11	0.03	0.67	0.58	0.80
Ficocianina	0.44	0.99	0.99*	0.96	0.91	0.97	0.55	0.48	0.93	0.89	0.44
Aloficocianina	0.48	0.99	0.99**	0.97	0.89	0.98	0.51	0.44	0.91	0.86	0.48
Ficoeritrina	0.53	0.99*	0.99*	0.98	0.86	0.98	0.45	0.38	0.89	0.83	0.54
Capacidad antioxidante total	0.54	0.37	0.48	0.25	0.83	0.29	0.99*	0.99*	0.79	0.85	0.54
Proteínas	0.61	0.30	0.41	0.17	0.78	0.21	0.99	0.99*	0.74	0.81	0.61

Tabla XII. Continuación

Variables	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Radical superóxido	0.50	0.69	0.35	0.38	0.074	0.48	0.76	0.70	0.21	0.188	0.201
TBARS	0.99*	0.22	0.97	0.98	0.87	0.46	0.12	0.21	0.93	0.72	0.93
SOD	0.90	0.66	0.95	0.95	0.99**	0.82	0.57	0.64	0.99	0.96	0.99
CAT	0.91	0.63	0.96	0.96	0.99*	0.81	0.55	0.62	0.99	0.95	0.99
POX	0.96	0.0005	0.9	0.91	0.74	0.25	0.10	0.01	0.83	0.54	0.82
Compuestos fenólicos totales	0.01	0.95	0.14	0.11	0.42	0.85	0.98	0.96	0.28	0.64	0.30
Clorofila a	0.72	0.85	0.82	0.80	0.95	0.96	0.80	0.84	0.90	0.99*	0.90
Carotenoides	0.54	0.95	0.67	0.65	0.85	0.99*	0.91	0.94	0.77	0.96	0.78
Ficocianina	0.94	0.05	0.87	0.89	0.70	0.19	0.16	0.07	0.79	0.49	0.79
Aloficocianina	0.70	0.15	0.829	0.84	0.63	0.10	0.25	0.17	0.73	0.40	0.72
Ficoeritrina	0.81	0.33	0.70	0.73	0.47	0.08	0.43	0.35	0.59	0.23	0.58
Capacidad antioxidante total	0.90	0.65	0.96	0.95	0.99*	0.82	0.56	0.63	0.9	0.95	0.99
Proteínas	0.99*	0.31	0.99	0.99	0.91	0.54	0.21	0.30	0.96	0.78	0.96

Tabla XIII. Continuación

Variables	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Radical superóxido	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	-	-
TBARS	IV	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-
SOD	-	-	-	-	IV	-	-	-	-	-	-	-	-
CAT	I	III	-	III	IV	-	-	III	-	-	-	-	-
POX	-	-	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Compuestos fenólicos totales	-	III	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorofila a	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	III	I
Carotenoides	-	-	I	I	-	-	-	IV	-	-	-	-	-
Ficocianina	I	-	III	II	II	-	-	-	-	-	-	-	-
Aloficocianina	-	-	III	I	-	-	-	-	I	-	-	-	-
Ficoeritrina	-	III	III	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-
Capacidad antioxidante total	-	-	-	-	IV	-	-	-	III	III	-	-	-
Proteínas	IV	-	I	I	-	I	-	-	-	III	-	I	-

Tabla XIV. Continuación

Variables	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Radical superóxido	0.44	0.57	0.61	0.46	0.66	0.09	0.25	0.58	0.63	0.34	0.39	0.61
TBARS	0.919**	0.36	0.09	0.09	0.02	0.14	0.40	0.62	0.59	0.29	0.43	0.57
SOD	0.839*	0.18	0.39	0.23	0.37	0.19	0.17	0.66	0.56	0.25	0.47	0.53
CAT	0.02	0.35	0.20	0.17	0.06	0.99***	0.05	0.86	0.71	0.90	0.95	0.73
POX	0.75	0.00	0.11	0.01	0.23	0.98	0.43	0.95	0.55	0.80	0.99	0.57
Compuestos fenólicos totales	0.13	0.71	0.60	0.35	0.41	0.93	0.39	0.63	0.92	0.99*	0.78	0.93
Clorofila a	0.53	0.828*	0.64	0.50	0.49	0.99*	0.19	0.87	0.70	0.90	0.96	0.72
Carotenoides	0.08	0.65	0.56	0.55	0.68	0.94	0.03	0.64	0.91	0.99	0.80	0.92
Ficocianina	0.21	0.40	0.40	0.10	0.31	0.89	0.52	0.55	0.95	0.99*	0.72	0.96
Aloficocianina	0.43	0.24	0.27	0.26	0.45	0.99*	0.51	0.84	0.74	0.92	0.94	0.76
Ficoeritrina	0.61	0.21	0.23	0.03	0.22	0.81	0.21	0.99	0.16	0.48	0.95	0.19
Capacidad antioxidante total	0.99	0.53	0.75	0.88	0.94	0.69	0.02	0.96	0.02	0.32	0.88	0.01
Proteínas	0.04	0.63	0.52	0.19	0.29	0.92	0.18	0.59	0.93	0.99*	0.76	0.94

Tabla XV. Continuación

Variables	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Radical superóxido	0.65	0.35	0.24	0.39	0.51	0.11	0.46	0.33	0.93	0.99	0.63	0.56
TBARS	0.64	0.70	0.79	0.78	0.38	0.99	0.20	0.99	0.54	0.31	0.89	0.70
SOD	0.57	0.40	0.28	0.43	0.50	0.08	0.56	0.29	0.92	0.99	0.60	0.59
CAT	0.03	0.91*	0.70	0.14	0.12	0.31	0.882*	0.50	0.98	0.99	0.77	0.39
POX	0.11	0.51	0.21	0.36	0.25	0.01	0.92*	0.21	0.88	0.97	0.52	0.66
Compuestos fenólicos totales	0.26	0.26	0.13	0.38	0.28	0.46	0.71	0.64	0.99**	0.97	0.86	0.23
Clorofila a	0.20	0.82*	0.63	0.28	0.03	0.72	0.67	0.85	0.95	0.84	0.98	0.10
Carotenoides	0.19	0.52	0.24	0.23	0.16	0.15	0.88*	0.36	0.94	1.00	0.65	0.53
Ficocianina	0.22	0.46	0.39	0.23	0.79	0.94	0.43	0.99	0.73	0.54	0.97	0.50
Aloficocianina	0.31	0.63	0.47	0.28	0.22	0.82	0.46	0.68	0.12	0.37	0.39	0.99
Ficoeritrina	0.62	0.38	0.48	0.03	0.55	0.94	0.16	0.99	0.74	0.55	0.98	0.49
Capacidad antioxidante total	0.99	0.11	0.22	0.07	0.75	0.94	0.31	0.85	0.14	0.11	0.62	0.93
Proteínas	0.35	0.94**	0.89	0.62	0.28	0.48	0.61	0.66	0.999*	0.96	0.88	0.20

Tabla XVI. Continuación

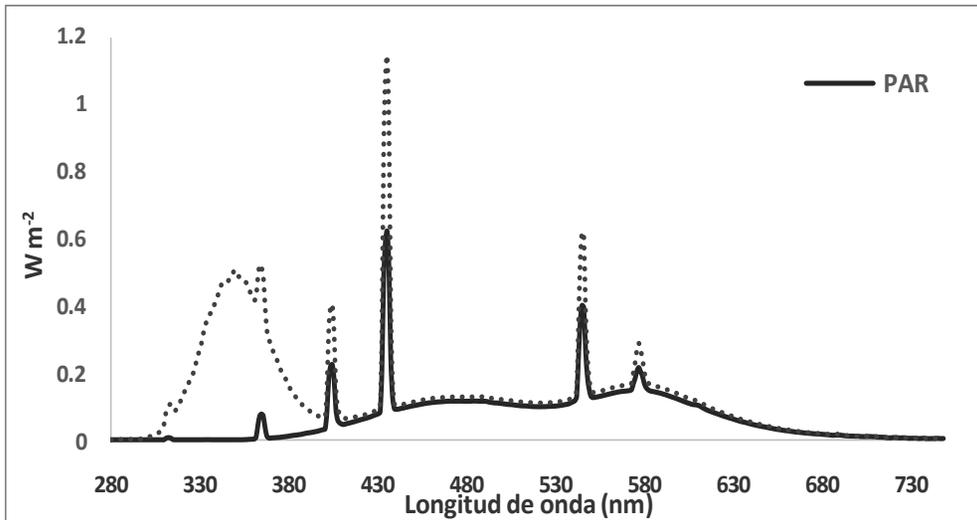
Variables	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Radical superóxido	0.84	0.63	0.90	0.84	0.21	0.92	0.98	0.93	0.98	0.98	0.82
TBARS	0.99	0.23	0.62	0.99	0.24	0.65	0.79	0.99*	0.79	0.80	0.49
SOD	0.68	0.81	0.98	0.67	0.45	0.99	0.99*	0.80	0.99*	0.99*	0.94
CAT	0.74	0.75	0.96	0.74	0.36	0.97	0.99*	0.85	0.99*	0.99*	0.90
POX	0.57	0.75	0.39	0.58	0.97	0.37	0.17	0.41	0.16	0.16	0.54
Compuestos fenólicos totales	0.88	0.35	0.08	0.89	0.74	0.11	0.31	0.79	0.32	0.32	0.08
Clorofila a	0.76	0.73	0.95	0.76	0.33	0.96	0.99	0.87	0.99*	0.99*	0.89
Carotenoides	0.87	0.39	0.04	0.87	0.77	0.07	0.28	0.77	0.28	0.29	0.12
Ficocianina	0.85	0.62	0.90	0.85	0.19	0.91	0.98	0.93	0.98	0.98	0.81
Aloficocianina	0.86	0.60	0.89	0.86	0.17	0.90	0.97	0.94	0.97	0.97	0.80
Ficoeritrina	0.98	0.06	0.37	0.99	0.51	0.40	0.58	0.94	0.58	0.59	0.22
Capacidad antioxidante total	0.74	0.75	0.96	0.74	0.36	0.97	0.99*	0.85	0.99*	0.99*	0.90
Proteínas	0.19	0.99*	0.93	0.18	0.85	0.92	0.82	0.36	0.82	0.82	0.98

Tabla XVII. Continuación

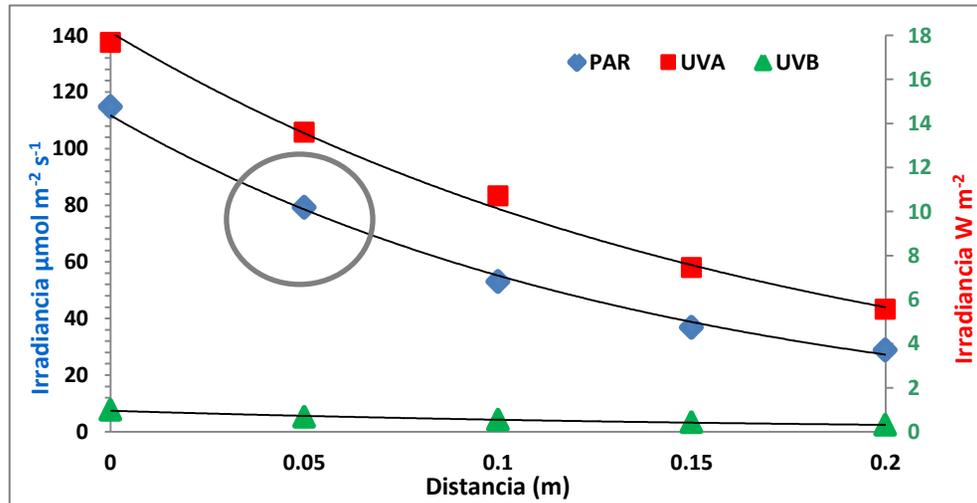
Variables	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Radical superóxido	0.40	0.14	0.95	0.50	0.60	0.65	0.98	0.95	0.99	0.99*	0.98
TBARS	0.45	0.68	0.35	0.35	0.24	0.18	0.76	0.84	0.50	0.62	0.47
SOD	0.45	0.67	0.36	0.35	0.23	0.17	0.77	0.84	0.51	0.63	0.48
CAT	0.26	0.01	0.89	0.37	0.48	0.53	0.99*	0.99	0.95	0.99	0.94
POX	0.33	0.57	0.48	0.22	0.10	0.04	0.85	0.91	0.62	0.72	0.59
Compuestos fenólicos totales	0.27	0.52	0.53	0.16	0.04	0.02	0.88	0.93	0.66	0.76	0.64
Clorofila a	0.97	0.87	0.84	0.99	0.99*	0.99*	0.46	0.34	0.73	0.63	0.76
Carotenoides	0.41	0.64	0.39	0.31	0.19	0.13	0.79	0.86	0.54	0.66	0.51
Ficocianina	0.95	0.99	0.41	0.91	0.85	0.82	0.09	0.22	0.25	0.11	0.28
Aloficocianina	0.96	0.99*	0.43	0.92	0.87	0.83	0.06	0.19	0.28	0.14	0.31
Ficoeritrina	0.95	0.84	0.87	0.98	0.99*	0.99**	0.51	0.39	0.77	0.67	0.79
Capacidad antioxidante total	0.36	0.60	0.45	0.25	0.13	0.07	0.83	0.89	0.59	0.70	0.56
Proteínas	0.98	0.88	0.82	0.99	0.999*	0.99	0.43	0.31	0.71	0.60	0.73

Tabla XVIII. Continuación

Variables	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Radical superóxido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	IV	-
TBARS	I	-	-	-	-	-	-	-	IV	-	-	-
SOD	I	-	-	-	-	-	-	III	-	III	III	-
CAT	-	II	-	-	-	I	II	III y IV	-	III	III	-
POX	-	-	-	-	-	-	II	-	-	-	-	-
Compuestos fenólicos totales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorofila a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carotenoides	-	-	-	-	-	-	II	-	-	-	-	-
Ficocianina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-
Aloficocianina	-	IV	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-
Ficoetrina	-	-	-	-	IV	-	IV	-	-	-	-	-
Capacidad antioxidante total	-	-	-	-	-	-	-	III	-	III	III	-
Proteínas	-	II y III	-	-	IV	-	-	-	II	I	-	-



Espectros de las lámparas utilizadas (280-750 nm). Radiación espectral recibida por los organismos en cada uno de los tratamientos, PAR y PAR+UV. La línea negra representa el espectro de la lámpara de emite radiación PAR, mientras que la línea punteada representa el espectro conjunto de la lámpara de radiación PAR sumado al de la lámpara de UVR.



Curvas de atenuación de la irradiancia. Irradiancia PAR expresada en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (línea azul) y UV en la banda de UVA (315-400 nm) y UVB (280-315 nm) expresada en W m^{-2} (línea roja y verde respectivamente) en función de la distancia a la fuente de luz (m). Con base a las ecuaciones extraídas a partir de esta gráfica ($R^2=0,99$) se estableció una distancia los biorreactores a las lámparas de irradiancia PAR y UV.