

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE *Synechococcus sp.* pcc 7002 EN CULTIVO
SUMERGIDO**

SALOMÉ COLORADO HERNÁNDEZ

**PREGRADO EN BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD EAFIT**

Medellín, 5 de Noviembre de 2018

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE *Synechococcus sp.* pcc 7002 EN CULTIVO
SUMERGIDO**

SALOMÉ COLORADO HERNÁNDEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
BIÓLOGO**

Asesor: Luis Alejandro Gómez Ramírez, Ph.D.

**MEDELLÍN
UNIVERSIDAD EAFIT
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE CIENCIAS**

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. William A. Cramer de Purdue University por facilitarnos el microorganismo clave de para este trabajo y por entusiasmarme a trabajar con el fenómeno de la fotosíntesis. Le agradezco a mi asesor el Doctor Luis Alejandro Gómez por su paciencia y por dedicarme el tiempo para compartirme sus conocimientos, sin él éste trabajo no hubiera sido posible. También quiero agradecer con cariño a la familia Vásquez que tantas veces me acogió y me facilitó muchas cosas, en especial a Víctor que me acompañó en horarios extremos al laboratorio y colaboró con la redacción de este texto.

Le dedico este trabajo a mi familia que siempre ha estado ahí. Incondicional. Ellos significan todo para mí.

CONTENIDO

1) INTRODUCCIÓN	6
2) JUSTIFICACIÓN	8
3) OBJETIVOS	10
3.1 OBJETIVO GENERAL	10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4) MARCO TEÓRICO	11
4.1 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 como organismo modelo.....	11
4.2 Fisiología general de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	11
4.3 Estudios previos en <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	12
4.4 Modelos de crecimiento bacteriano.....	14
4.4.1 Logístico	17
4.4.2 Gompertz	17
5) MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Condiciones de cultivo para <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002.....	20
5.2 Crecimiento y medición de biomasa de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 en cultivo sumergido	21
5.3 Determinación de biomasa en medio líquido para <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	21
6) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
7) CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS	29
8) REFERENCIAS	31

RESUMEN

Synechococcus sp. PCC 7002 es un organismo modelo para el estudio de la fotosíntesis. Esto porque además de su relación evolutiva con el cloroplasto y la facilidad de su cultivo en un amplio rango de salinidad y temperatura; tiene gran potencial biotecnológico por su capacidad natural de incorporar ADN exógeno. Aunque existen estudios cuantitativos del crecimiento de esta cianobacteria, estos se han llevado a cabo bajo unas condiciones estándar de luz, temperatura, fuente de carbono y nutrientes; que en conjunto son una limitación técnica para un laboratorio no especializado en cultivos fotoautótrofos. Por esta razón, el presente trabajo se desarrolló con el propósito de determinar los parámetros cinéticos de *Synechococcus* sp. PCC 7002 para las condiciones disponibles en el laboratorio, que no corresponden a las estándar. Lo anterior con miras al estudio proteómico del aparato fotosintético de la cianobacteria, para lo cual se debe garantizar una toma de muestras celulares con condiciones genéticas y metabólicas constantes; requerimiento que se cumple si la muestra se toma en el mismo momento de crecimiento. En consecuencia, conocer los parámetros cinéticos y los tiempos de las diferentes fases es fundamental para proceder con posteriores estudios moleculares para este microorganismo. En este trabajo se obtuvieron los parámetros cinéticos de *Synechococcus* sp. PCC 7002 para crecimiento en medio líquido. Los datos de crecimiento se analizaron utilizando los modelos de Gompertz y Logístico. Se encontró que tan sólo un 0,04% de CO₂ puede duplicar la velocidad específica de crecimiento, y que la cianobacteria puede alcanzar fase exponencial en aproximadamente 3 días bajo una temperatura de 24 °C y una intensidad lumínica de 1,138 μmol fotones m⁻²s⁻¹.

Palabras clave

Modelos de crecimiento microbiano, parámetros cinéticos, cianobacteria, crecimiento fotoautótrofo.

1) INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son el grupo más ampliamente distribuido, diverso y grande de las bacterias fotoautótrofas (StalJier & Cohen-Bazire, 1977). Sus simples requerimientos nutricionales (luz, agua, dióxido de carbono y sales inorgánicas) le permiten a estos organismo ocupar diferentes nichos ecológicos (Sakamoto & Bryant, 1998; StalJier & Cohen-Bazire, 1977). La cianobacteria *Agmenellun quadruplicatum* más ampliamente conocida como *Synechococcus* sp. PCC 7002 es un organismo modelo para el estudio de la fotosíntesis, porque además de su relación evolutiva con el cloroplasto y las características típicas de las cianobacterias; tiene también un gran potencial biotecnológico por su capacidad natural de incorporar ADN exógeno (*The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 1995; Ruffing, Jensen, & Strickland, 2016; Stevens & Porter, 1980). A nuestro buen entender, la cinética de crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 se ha estudiado poco en comparación con otros organismos modelo tales como *Escherichia coli*. En 1949 Monod escribe *The Growth of Bacterial Cultures*, en donde expone la importancia del estudio del crecimiento bacteriano, no como una rama más de la Microbiología sino como un método básico, fundamental y necesario para el estudio de ésta (siendo también base para el estudio de la fisiología y la bioquímica bacteriana) (Monod, 1949). Aunque existen estudios en donde se han establecido parámetros para el crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Casas, Rodríguez, & Téllez, 2010; Hendry, Prasannan, Joshi, Dasgupta, & Wangikar, 2016), dichos estudios se han llevado a cabo bajo unas condiciones estándar de luz, temperatura, fuentes de carbono y nutrientes que en conjunto se convierten en un reto técnico para ser replicadas por un laboratorio no especializado en cultivos fotoautótrofos. Estas condiciones consisten en una temperatura de 38 °C, un suministro de CO₂ de 1% (v/v) en aire, 250 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminación y una solución de Medio A con micronutrientes (Ludwig & Bryant, 2011). Así, fue necesario determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 para las condiciones de cultivo disponibles; con la intención de hacer un estudio futuro del aparato fotosintético de la cianobacteria a nivel proteómico. Tanto en estudios proteómicos como transcriptómicos (Ludwig & Bryant, 2011; Nothnagel et al., 2011), se debe tomar la muestra en la misma fase del crecimiento microbiano (Monod, 1949; Widdel, 2010) para garantizar la toma de muestras celulares con condiciones genéticas y metabólicas constantes.

Considerando lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se obtuvieron los parámetros cinéticos y se analizó el crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 haciendo uso de los

modelos no lineales de Gompertz y Logístico. Como se explicó previamente, las condiciones de aireación, temperatura e iluminación fueron diferentes a las reportadas en la literatura como estándar. Específicamente, se evaluaron dos condiciones de cultivo: 1) 0,04% de CO₂, 24 °C y 1,138 μmol fotones m⁻²s⁻¹ de intensidad lumínica; y 2) Aproximadamente las mismas condiciones anteriores; pero sin flujo de CO₂. Los resultados obtenidos permiten concluir que tan sólo un 0,04% de CO₂ puede duplicar la velocidad específica de crecimiento y que la cianobacteria puede alcanzar la fase exponencial de crecimiento en aproximadamente 3 días.

2) JUSTIFICACIÓN

Las cianobacterias además de ser el grupo estructuralmente más diverso y más ampliamente distribuido de las bacterias fotoautótrofas (Stallier & Cohen-Bazire, 1977), también poseen un aparato fotosintético muy similar al del cloroplasto (Stallier & Cohen-Bazire, 1977). Por esta razón, estos microorganismos constituyen un modelo bastante adecuado para el estudio de la fotosíntesis, sin la complicada relación que este último tiene con el citoplasma eucariota y la dificultad de su extracción (*The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 1995; Stevens & Porter, 1980). Específicamente, *Synechococcus* sp. PCC 7002 además de poseer simples requerimientos nutricionales (luz, agua, dióxido de carbono y sales inorgánicas) y todas las demás bondades de trabajar con cianobacterias; tiene también un gran potencial biotecnológico por su capacidad natural de incorporar ADN exógeno (Ruffing et al., 2016; Stevens & Porter, 1980). Por lo tanto, el conocimiento de la fisiología y de las herramientas genéticas para *Synechococcus* sp. PCC 7002 podrían ser usadas para modificar este organismo en aras de la producción basada en energía solar de bioquímicos industrialmente relevantes (Hendry et al., 2016). Como la base metodológica para el estudio de la fisiología y la bioquímica de microorganismos es el conocimiento de sus cinéticas de crecimiento (Monod, 1949), es crucial realizar dichos análisis para aprovechar el potencial biotecnológico de ésta cianobacteria.

Aunque existen reportes previos de la cinética de crecimiento para *Synechococcus* sp. PCC 7002, la mayoría de dichos trabajos han abordado el análisis del crecimiento como un componente parcial de otro tipo de estudios (Hendry et al., 2016; Ludwig & Bryant, 2011; Nothnagel et al., 2011). Por lo tanto, no se ha hecho una caracterización detallada del crecimiento del microorganismo y de los parámetros cinéticos correspondientes. En este sentido es importante aclarar que en un estudio previo (Sakamoto & Bryant, 1998) se investigaron los efectos de la temperatura sobre el crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002. No obstante, no es posible tomar sus resultados como un punto de referencia; ya que las condiciones disponibles en nuestro laboratorio son diferentes a las usadas en dicho estudio. Por lo tanto, la manera correcta de proceder para llevar a cabo estudios fisiológicos y bioquímicos con *Synechococcus* sp. PCC 7002 es optimizar las condiciones de su crecimiento para de este modo obtener la curva de crecimiento específica para dichas condiciones, y los parámetros cinéticos correspondientes. De este modo se garantiza la estandarización del

protocolo a la hora de planear experimentos posteriores con dicha cianobacteria (Hendry et al., 2016; Ludwig & Bryant, 2011; *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 1995).

Con los resultados de este trabajo se espera, como perspectiva futura, poder realizar estudios electroforéticos del aparato fotosintético de *Synechococcus* sp. PCC 7002 empleando técnicas tales como la electroforesis nativa de proteínas, procedimiento para el cual es ideal recolectar la muestra de péptidos de la cianobacteria siempre en las mismas condiciones metabólicas (*The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 1995). Para esto, la determinación del tiempo en el que se alcanza la fase exponencial y la duración de la misma es crucial porque es la única fase del crecimiento en la que las propiedades de las células pueden ser consideradas constantes (Monod, 1949). Hallar los parámetros cinéticos permite asignar un comportamiento específico de crecimiento a la cianobacteria bajo ciertas condiciones de luz, temperatura y nutrientes; y así, dicho comportamiento podrá reproducirse cuando sea necesario bajo las mismas condiciones, para efectos de estandarización (Ludwig & Bryant, 2011; Monod, 1949).

De otro lado, la importancia de realizar la cinética de crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 utilizando condiciones de cultivo sumergido, en lugar de medio sólido, se debe a dos razones principales: Primero, para evaluar la posibilidad de utilizar datos de dispersión de la luz (densidad óptica) de la suspensión para determinar el crecimiento de la cianobacteria en términos de concentración celular (células/mL). Esta práctica ahorra mucho tiempo no sólo en la toma de datos para la cinética *per se*, sino también en la determinación rápida de la fase del crecimiento en la que se está o de la concentración celular en la que se encuentra la suspensión celular en cualquier momento del cultivo líquido. La segunda razón para trabajar con un cultivo sumergido es que la medición por densidad óptica elimina varias fuentes de error típicas del método de peso seco (que es muy común para la cuantificación de biomasa contra el tiempo) tales como la calibración de las balanzas y la dificultad en el control de la humedad de las muestras. Por tanto, la estandarización de la cuantificación de biomasa a partir de datos de dispersión de la luz para *Synechococcus* sp. PCC 7002 queda establecida en este trabajo para ser utilizada cuando sea necesaria.

3) OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los parámetros cinéticos para *Synechococcus* sp. PCC 7002 en condiciones de cultivo sumergido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar los modelos cinéticos Logístico y Gompertz para el crecimiento de biomasa en condiciones de cultivo líquido y con el uso de preinóculo.

Evaluar el efecto de limitación en el nivel de CO₂ sobre el crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 en cultivo sumergido.

4) MARCO TEÓRICO

4.1 *Synechococcus* sp. PCC 7002 como organismo modelo

El alga unicelular verde-azul (cianobacteria) *Agmenellum quadruplicatum*, cepa PR-6 (American Type Culture Collection, 27264; Pasteur Culture Collection, 7002) también conocida comercialmente como *Synechococcus* sp. PCC 7002 fue aislada por Van Baalen en 1962 (Baalen, 1961). Esta cianobacteria unicelular, euriahalina y de morfología cocoide, tolera intensidades lumínicas muy altas y crece en un amplio rango de concentraciones de cloruro de sodio (Ludwig & Bryant, 2011; Stevens & Porter, 1980). *Synechococcus* sp. PCC 7002 provee un sistema modelo excelente para el estudio del metabolismo fotoautótrofo: Lleva a cabo fotosíntesis oxigénica, asimila nitrógeno de una manera similar a las de las plantas terrestres y es susceptible a muchas técnicas utilizadas en el estudio de bacterias heterotróficas (Stevens & Porter, 1980). Adicionalmente, Stevens and Porter encontraron que *Synechococcus* sp. PCC 7002 posee un mecanismo natural y eficiente para la integración de ADN exógeno en un proceso similar a la transformación en bacterias (Stevens & Porter, 1980). Como el genoma completo de *Synechococcus* sp. PCC 7002 está disponible (ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el conjunto completo de sus genes está descrito, la expresión génica de esta cianobacteria puede ser estudiada a diferentes niveles. Trabajos como el de (Ludwig & Bryant, 2011) donde se hace un estudio transcriptómico de todos los marcos de lectura abiertos predichos para la cianobacteria, bajo diferentes condiciones de cultivo, van haciendo más robusta la información general del microorganismo. En conjunto, estas características hacen a *Synechococcus* sp. PCC 7002 una robusta y prometedora plataforma para aplicaciones biotecnológicas, incluyendo la producción de biocombustibles (Ludwig & Bryant, 2011).

4.2 Fisiología general de *Synechococcus* sp. PCC 7002

Mediante el uso de la energía solar, las cianobacterias, incluida *Synechococcus* sp. PCC 7002, producen equivalentes reductores y ATP que se requieren entre otras cosas, para la reducción del CO₂ a carbohidratos. Durante el proceso lumínico de la generación de estos agentes reductores y del ATP las moléculas de agua son oxidadas (produciendo oxígeno gaseoso) a través de dos fotosistemas, denotados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) (*The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 1995). Al mismo tiempo, este sistema fotosintético genera un

gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna celular; la cual sería equivalente a la membrana de los tilacoides en cloroplastos, y esta fuerza protón motriz sería usada para la síntesis de ATP. Los equivalentes reductores resultantes serán mayoritariamente utilizados para la generación de carbohidratos y la construcción de otros bloques constitutivos celulares a base del carbono obtenido del CO₂ (*The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 1995).

Como la luz en el medio natural de las cianobacterias no está disponible de manera continua, todos los organismos fotoautótrofos deben utilizar un metabolismo alterno en la noche para producir la energía necesaria para soportar las funciones celulares básicas. Las cianobacterias tienen una cadena de transporte de electrones diferente a la de la etapa lumínica, que permite la respiración aerobia (*The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 1995). No obstante, es importante anotar que en muchos ambientes naturales el oxígeno es consumido rápidamente en la oscuridad por otras cianobacterias y demás organismos (Stal, 1995; Steunou et al., 2008), y por tanto las condiciones del ambiente local pueden volverse anóxicas rápidamente. Para este caso, la mayoría de cianobacterias pueden fermentar carbohidratos de reserva para generar la energía de un mantenimiento celular básico (M.L. McNeely et al., 2010; Stal & Moezelaar, 1997). Por tanto, las cianobacterias deben ajustarse rápidamente a la disponibilidad de luz, a las diferencias en intensidad lumínica y la disponibilidad de nutrientes inorgánicos (Ludwig & Bryant, 2011). Como consecuencia de esta variabilidad, las células experimentan rápidos cambios de estados *Redox* debido a la variabilidad en el nivel de oxígeno celular y a la utilización alterna de los procesos fotosintéticos y respiratorios (Ludwig & Bryant, 2011).

4.3 Estudios previos en *Synechococcus* sp. PCC 7002

Existen diferentes estudios previos sobre *Synechococcus* sp. PCC 7002 en los que se reportan cinéticas de crecimiento bajo diferentes condiciones. Por ejemplo, Ludwig & Bryant antes de realizar un estudio transcriptómico en la cianobacteria, construyen una gráfica (ver Figura 1) de OD₇₃₀ (Densidad óptica a 730 nm) en función del tiempo (Ludwig & Bryant, 2011). Las condiciones fueron 38°C, 1% (v/v) CO₂ en aire, una intensidad lumínica de ~250 μmol fotones m⁻²s⁻¹ y Medio A (solución de diferentes compuestos, mayoritariamente sales). Estas condiciones de temperatura, flujo de CO₂ e intensidad lumínica se definen como “condiciones

estándar". En dicho estudio, Ludwig & Bryant reportan que el crecimiento exponencial corresponde a una OD_{730} de $\sim 0,7$ (no hablan de la Fase Lag), que equivale a ~ 25 horas de crecimiento (ver Figura 1). De acuerdo con los resultados de este estudio, el crecimiento correspondiente a OD_{730} mayores a $0,7$ se vuelve más lento por la propia barrera a la luz que genera la turbidez del medio con las cianobacterias.

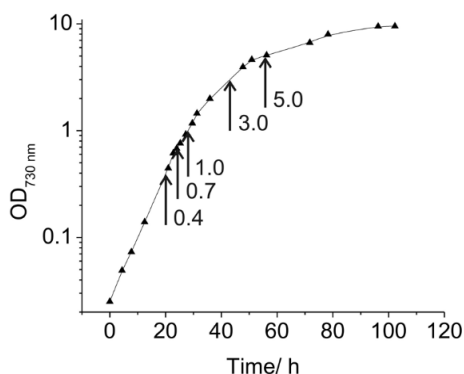


Figura 1. Curva de crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 bajo condiciones estándar. Figura tomada de (Ludwig & Bryant, 2011). En este estudio se emplearon las siguientes condiciones de crecimiento, que se consideran como “estándar”: 38°C , $250\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 1% (v/v) CO_2 en aire y Medium A. Los números bajo las flechas, corresponden a la densidad óptica a la cual se tomaron muestras para un estudio transcriptómico.

En otro estudio, *Synechococcus* sp. PCC 7002 fue cultivada en medio fotoautótrofo así: 1% (v/v) de CO_2 en aire, Medio A (Ludwig & Bryant, 2011), temperatura de 38°C e iluminación de $250\ \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Casas et al., 2010). El crecimiento celular fue monitoreado midiendo densidad óptica a 550 nm. Bajo estas condiciones, se reportó un tiempo de duplicación 4 horas aproximadamente. En este estudio se muestra además que al bajar la temperatura del cultivo de 38°C a 15°C el crecimiento exponencial disminuye en velocidad y aumenta en duración (ver Figura 2).

De otro lado, en el estudio realizado por Hendry et al. se estimaron tasas de crecimiento de $\sim 0,18\ \text{h}^{-1}$ para *Synechococcus* sp. PCC 7002 en condiciones de fotoautotrofía (Hendry et al., 2016). Más específicamente, usaron $\sim 250\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminación, una temperatura de 38°C , BG11+ASNIII (1:1 v/v) como medio de cultivo y una aireación continua de $200\ \text{mL min}^{-1}$ usando un compresor de aire. En este estudio el medio de cultivo cambia y no se especifica la cantidad de CO_2 añadida a la suspensión.

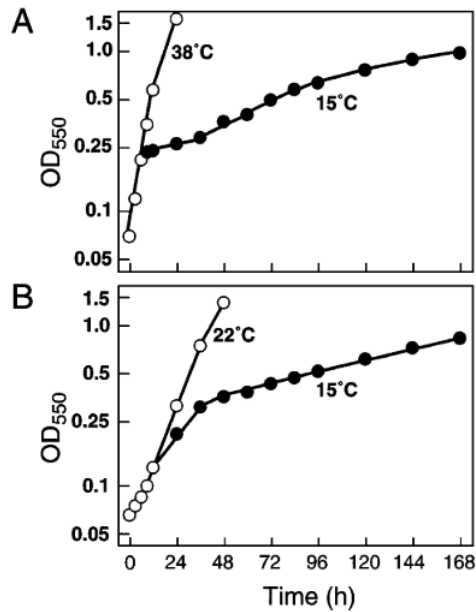


Figura 2. Curvas de crecimiento para *Synechococcus* sp. PCC 7002 a 15°C después de un descenso en la temperatura desde **A.** 38°C o **B.** 22°C. Figura tomada de (Sakamoto & Bryant, 1998). Las condiciones de cultivo de éste estudio fueron: 38°C, 250 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 1% (v/v) CO₂ en aire y Medium A, pero a diferencia de la Figura 1, la densidad óptica es medida a 550nm.

4.4 Modelos de crecimiento bacteriano

Los modelos matemáticos de crecimiento son usados para describir el comportamiento de los microorganismos bajo diferentes condiciones fisicoquímicas como temperatura, pH o nutrientes en solución. Estos modelos permiten la predicción de momentos críticos en la producción de metabolitos secundarios o la optimización de condiciones de crecimiento, entre otras cosas (Zwietering, Jongenburger, Rombouts & Riet, 1990). Para la construcción de estos modelos, el crecimiento tiene que ser medido y posteriormente modelado. El crecimiento bacteriano, a menudo muestra una fase en la cual la tasa de crecimiento específico comienza con un valor de cero y luego se acelera hasta alcanzar un valor máximo (μ_{max}) en un cierto período de tiempo (lo que se denomina fase Lag). La fase exponencial es aquella en la que μ_{max} es constante y la fase estacionaria consiste en una desaceleración del crecimiento microbiano, que responde a la capacidad de carga del sistema. Adicionalmente, las curvas de crecimiento

contienen una fase final en la cual la tasa de crecimiento es negativa, en donde se presenta muerte celular (ver Figura 3).

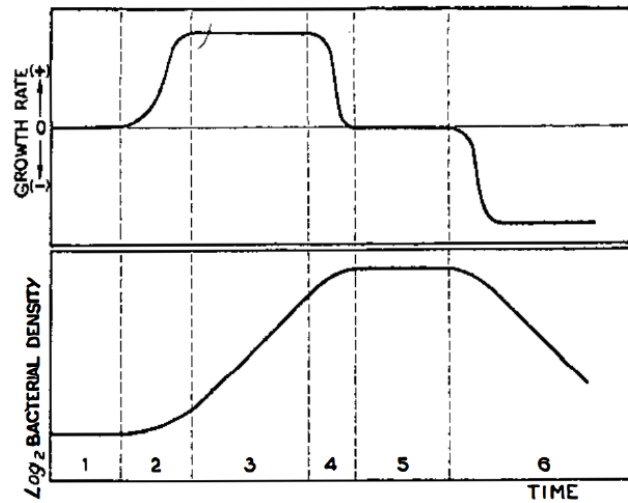


Figura 3. Fases de crecimiento bacteriano. Figura tomada de (Monod, 1949). De izquierda a derecha: 1 y 2 Fase Lag (tasa de crecimiento nula). 3 Fase exponencial (tasa de crecimiento es constante después de una aceleración en la fase Lag). El número 4 corresponde a la desaceleración del crecimiento exponencial. 5 Fase estacionaria (tasa de crecimiento nula después de una desaceleración de la fase exponencial). 6 Fase de muerte (tasa de crecimiento negativa).

Las curvas de crecimiento se trabajan en una amplia gama de disciplinas, dentro de las que se encuentran la biología, la biotecnología, la ciencia de los alimentos, la medicina y la economía. La mayoría de la materia viva crece según el patrón observado en la Figura 3. Para realizar un correcto análisis de la curva sigmoidea que se quiere modelar y reducir los datos medidos a un número limitado de parámetros de interés, los investigadores necesitan ecuaciones que se adecúen a sus necesidades (Zwietering et al., 1990). Existen un buen número de modelos de crecimiento en la literatura; tales como Gompertz, Richards, Schnute y el modelo logístico, entre otros (Buchanan, Whiting & Damert, 1997; Ferenci, 1999; Tjorve & Tjorve, 2017).

En los modelos del tipo Gompertz o Logístico se asume que la cantidad de sustrato es suficiente para no ser una limitante del crecimiento durante el comienzo de la fase exponencial. Entre los parámetros a partir de los cuales se pueden describir estos modelos, la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) es de las más importantes (Zwietering et al., 1990). La importancia de la determinación de la velocidad y duración de la fase exponencial en muchos

estudios radica en que en esta fase la velocidad específica de crecimiento es constante. Por lo tanto, es razonable considerar que se establece durante esta etapa lo que se conoce como *steady state* donde las concentraciones relativas de todos los metabolitos y de todas las enzimas son constantes. En los estudios bioquímicos y fisiológicos de microbiología es clave tener unas condiciones celulares constantes para la realización de experimentos donde los cambios celulares por los que atraviesa un cultivo tipo *batch* no sean una variable (Monod, 1949). La tasa de crecimiento máximo μ_{max} es la pendiente de la línea recta que se obtiene calculado el logaritmo natural de la fase exponencial (donde se alcanza la mayor aceleración en el crecimiento). Sin embargo; una manera más adecuada de calcular μ_{max} es describiendo el conjunto total de los datos con un modelo de crecimiento que estime a la vez la fase inicial, μ_{max} y el valor en el que se forma la asíntota final (valor máximo de crecimiento) (Zwietering et al., 1990). Trabajar con el conjunto total de datos permite evitar el error que puede darse al determinar a ojo el comienzo y final de la fase exponencial, dado que los cambios entre las fases de crecimiento no son abruptos (Zwietering et al., 1990). La mayoría de los autores que utilizan modelos de crecimiento para describir sus datos muestran el número de organismos (N) o el logaritmo del número de organismos [$\log(N)$] en función del tiempo (Fujikawa & Morozumi, 2005). Entre las técnicas más usadas de medición de biomasa celular está la medición de densidad óptica, la medición por peso seco y el conteo directo de células en la cámara de Neubauer. La técnica de peso seco aunque entrega datos de masa real, no discrimina entre células viables y no viables. Por el contrario, el conteo en cámara de Neubauer permite contabilizar sólo las células viables de una suspensión. Cuando la suspensión es monodispersa (es decir que no forma agregados celulares y que todas las células son aproximadamente del mismo tamaño), la técnica de medición por densidad óptica suele ser una muy buena medida de la biomasa (concentración celular), cuando se combina con una calibración por conteo directo con la cámara de Neubauer.

Un gran número de modelos se encuentra actualmente disponibles y son usados en diferentes investigaciones, con un nivel de complejidad diferente y un número variable de parámetros. Las ecuaciones originales de los modelos no siempre son escritos en términos de “tasa de crecimiento”, “tiempo Lag” o “valor asíntótico final”; lo que hace difícil su interpretación y necesaria su reescritura en otros términos de acuerdo a la necesidad (Zwietering et al., 1990). Ejemplos de la reescritura de dos modelos (Gompertz y Logístico) para que adquieran una relevancia biológica, se mostrarán a continuación (según Zwietering et al., 1990):

4.4.1 Logístico

El modelo logístico es un modelo que entrega 3 parámetros (μ_{max} , y_{max} y λ o y_0). La ecuación dada por (Zwietering et al., 1990) es la siguiente:

$$y = \frac{y_{max}}{\left\{ 1 + e^{\left[\frac{4\mu_{max}}{y_{max}}(\lambda - t) + 2 \right]} \right\}}$$

Ecuación 1. Donde y_{max} es crecimiento máximo de la población (o biomasa máxima), μ_{max} es la tasa de crecimiento máxima (o la velocidad específica) y λ es el tiempo de duración de la fase Lag. Las variables son t (tiempo) y y (número de individuos o biomasa).

También puede reescribirse la Ecuación 1 para que el modelo entregue en vez del tiempo de la Fase Lag (λ), el valor de la Biomasa Inicial (y_0). A continuación se presenta una forma modificada del modelo logístico (Cortés López, Romero Bauset, Roselló Ferragud, & Villanueva Micó).

$$y = \frac{y_{max} * y_0}{y_0 + (y_{max} - y_0)e^{-\mu_{max}(t-t_0)}}$$

Ecuación 2. Donde y_{max} es la biomasa máxima, y_0 es el valor de la biomasa inicial o población en el tiempo cero; y μ_{max} es la tasa de crecimiento máxima cuando $(t-t_0)$ corresponde al lapso de tiempo que dura la fase exponencial.

El modelo logístico o de Verhulst es un modelo que por su concepto y desarrollo es un buen comienzo para el estudio de otros modelos matemáticos más complejos. Este prototipo responde a las limitaciones de modelos más sencillos como el exponencial o el modelo de Malthus que predice el crecimiento ilimitado bajo ciertos supuestos (Zwietering et al., 1990).

4.4.2 Gompertz

El modelo de Gompertz también es un modelo de tres parámetros (μ_{max} , y_{max} y λ). La ecuación dada por (Zwietering et al., 1990) es la siguiente:

$$y = y_{max} \frac{1}{\frac{\mu_{max} * e}{y_{max}}(\lambda - t) + 1}$$

Ecuación 3. Donde y_{max} es la biomasa máxima, λ es el tiempo de la fase Lag; y μ_{max} es la tasa de crecimiento máxima.

Si un modelo de tres parámetros es suficiente para describir los datos del crecimiento microbiano, es más recomendable usarlo sobre un modelo de cuatro parámetros, porque un modelo de tres parámetros es más simple y por tanto más fácil de usar. También una solución de tres parámetros es más estable porque sus parámetros están menos correlacionados (M. H. Zwietering, F. M. Rombouts, K. Van 'T Riet, 1990). Más aún, cuando un modelo de tres parámetros es usado, los estimadores tienen más grados de libertad, lo cual puede ser importante cuando se construye una curva de crecimiento usando pocas mediciones (M. H. Zwietering, F. M. Rombouts, K. Van 'T Riet, 1990). Aunque la simplicidad del modelo utilizado puede llegar a ser una característica deseada, un modelo de dos parámetros para describir el crecimiento bacteriano, es ya muy simple y presenta serias limitaciones, como es el caso del modelo lineal.

La razón para la elección de los modelos de Gompertz y Logístico fue que entre diferentes modelos ampliamente conocidos (I. J. M. H. Zwietering, F. M. Rombouts, K. Van 'T Riet, 1990; Tjorve & Tjorve, 2017), históricamente estos dos han descrito muy bien los datos del crecimiento bacteriano (Buchanan et al., 1997). En la Tabla 2 se observa por ejemplo, que el modelo exponencial no es un buen modelo para describir el crecimiento bacteriano porque a pesar de entregar tres parámetros, no describe la capacidad de carga del cultivo. El modelo lineal es muy simple, y la ecuación de Richards muy compleja para nuestro caso de estudio particular; como se explica anteriormente:

Tabla 2. Diferentes modelos utilizados en la microbiología.

Modelo	Número de parámetros	Ecuación
Logístico	3	$y = \frac{y_{max} * y_0}{y_0 + (y_{max} - y_0)e^{-\mu_{max}(t-t_0)}}$

Gompertz	3	$y = y_{max} \frac{1}{\frac{\mu_{max} * e}{y_{max}}(\lambda - t) + 1}$
Richards*	4	$y = y_{max} \left\{ 1 + v^{[k(T-x)]^{-1/v}} \right\}$
Exponencial*	3	$y = e^x$

*Ver descripción de los términos de estas dos ecuaciones en (M. H. Zwietering, F. M. Rombouts, K. Van 't Riet, 1990).

5) MATERIALES Y MÉTODOS

La cianobacteria marina *Synechococcus* sp. cepa PCC 7002 se obtuvo gracias a la colaboración y buena voluntad del doctor William Cramer de Purdue University. El montaje para la administración de CO₂ a los medios de cultivo fue instalado gracias a la colaboración del profesor Alex Sáez de la Universidad EAFIT. El montaje incluyó un compresor de aire, piedras difusoras, llaves de paso y tapones de corcho. La densidad óptica de los cultivos fue medida utilizando un *Thermo Scientific™ Evolution 60S UV-Visible spectrophotometer* y el conteo celular se realizó con la *Neubauer improved bright-line* de *BLAU BRAND*.

5.1 Condiciones de cultivo para *Synechococcus* sp. PCC 7002

La cianobacteria marina unicelular *Synechococcus* sp. cepa PCC7002 (Formalmente conocida como *Agmenellum quadruplicatum* PR-6) se mantuvo a una temperatura ambiente (aprox. 24°C) bajo condiciones continuas de fotoautotrofia (1,138 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$). La intensidad lumínica se midió con un radiómetro para detectar longitudes de onda alrededor de los 700nm. La cianobacteria se inoculó en medio A-D7 el cual contiene exactamente: 0,3M NaCl; 0,008M KCl; 0,012M NaNO₃; 0,02M MgSO₄; 0,0025M CaCl₂; 15 μ M FeSO₄; 15 μ M EDTA; 8,3mM Tris-HCl pH 8,2; 0,37mM KH₂PO₄; 7,4nM Vitamina B12 (Ludwig & Bryant, 2011); 1X solución de trazas de metales (La solución 1000x de estos metales contiene: H₃BO₃ 2,8g/L; MnCl₂·4H₂O 1,81g/L; ZnSO₄·7H₂O 0,222g/L; CuSO₄·5H₂O 0,079g/L) (Ludwig & Bryant, 2011). Los cultivos sumergidos con medio A-D7 se mantuvieron, luego de ser inoculados, con un flujo constante de aire de 23,03 mL s⁻¹ durante toda la cinética. De esta manera, teniendo en cuenta los datos más recientes de CO₂ atmosférico <https://www.co2.earth/>, se estima que aproximadamente un 0,04% de CO₂ entró a la muestra de manera constante. El flujo de aire se midió por triplicado utilizando un eudiómetro.

Previo a este montaje se realizó una cinética con las mismas condiciones de iluminación pero con una temperatura un poco mayor (28°C) y sin más flujo de aire que el que entraba al erlenmeyer cuando se tomaba la muestra. Las diferencias en las condiciones de temperatura de ambos experimentos se discuten más adelante (ver *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*) con base en el estudio de M. H. Zwietering et al., 1991.

5.2 Crecimiento y medición de biomasa de *Synechococcus* sp. PCC 7002 en cultivo sumergido

Se evaluó la cinética de crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 en cultivo sumergido mediante el cambio en su densidad óptica, con el fin de determinar sus fases de crecimiento. Para esto, se usó un espectrofotómetro (mencionado anteriormente) midiendo por triplicado a una longitud de onda de 730nm cada 12 horas aproximadamente. Las muestras se tomaron durante 20 días, para un total de 469 horas aproximadamente.

Las gráficas presentadas en este trabajo, se construyeron con el software Graphpad Prism 8 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/> Versión de prueba), en donde los datos de las 3 cinéticas independientes fueron modelados utilizando las ecuaciones de crecimiento Logístico y de Gompertz.

El montaje de los cultivos sumergidos de *Synechococcus* sp. cepa PCC7002 se inició con tres preinóculos preparados de la siguiente manera: En 90mL de medio A se vertieron 10 mL de cianobacterias crioconservadas. Luego cuando los preinóculos alcanzan una OD_{730} entre 0,05 y 0,1 (tiempo aproximado para salir de la fase Lag consecuencia de la criopreservación) (Ludwig & Bryant, 2011), fueron llevados a un volumen de 1000 mL de medio A. Se emplearon tres erlenmeyers de 1000 mL (marcados como 1, 2 y 3) en donde se vertieron los tres preinóculos. En estos erlenmeyers de 1000 mL se realizó la toma de datos para la cinética de crecimiento (Ver Figura 9).

5.3 Determinación de biomasa en medio líquido para *Synechococcus* sp. PCC 7002

En microbiología es muy usado el método de McFarland para estimar, de acuerdo a la turbidez de la muestra, el número de bacterias en una suspensión dada (Hindler et al., 2012). Sin embargo, este método no es lo suficientemente adecuado para determinar la biomasa de cianobacterias, debido a que las longitudes de onda en las que se mide la dispersión de la luz de la muestra están alrededor de 600 nm. Esto puede llevar a datos muy imprecisos por la cercanía al rango de absorción de la clorofila, pigmento presente en cianobacterias. En efecto, esta es la razón por la cual todas las mediciones de densidad óptica (OD) en este trabajo se hicieron a 730 nm. También, estudios previos utilizan OD_{730} para mediciones del crecimiento de cianobacterias. Por lo anterior, para cuantificar la concentración celular (células/mL) de *Synechococcus* sp. PCC 7002 como medida de la biomasa, se construyó una curva de calibración con densidad óptica en función de la concentración celular. Para ello se realizaron

de 5 diluciones de una suspensión concentrada de *Synechococcus* sp. PCC 7002, a las cuales se les midió la densidad óptica a 730 nm, OD_{730} . Luego se obtuvo la concentración de células de cada dilución mediante conteo directo en la cámara de Neubauer, utilizando la siguiente serie de diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-5} , y 10^{-6} .

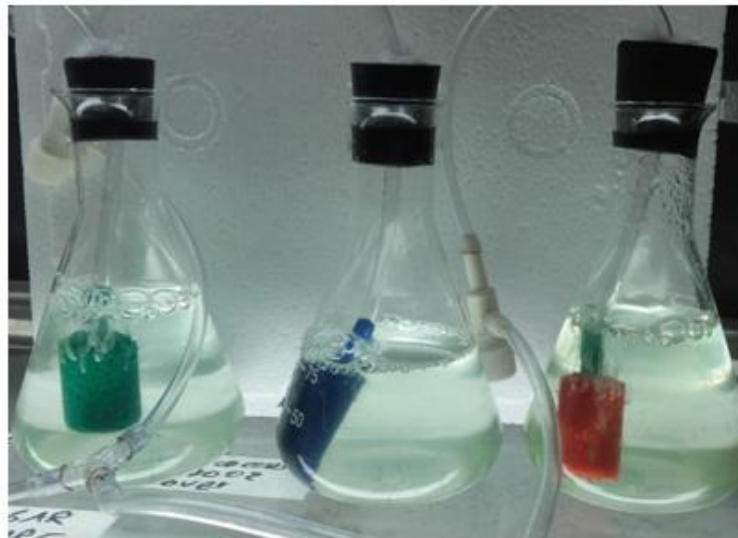
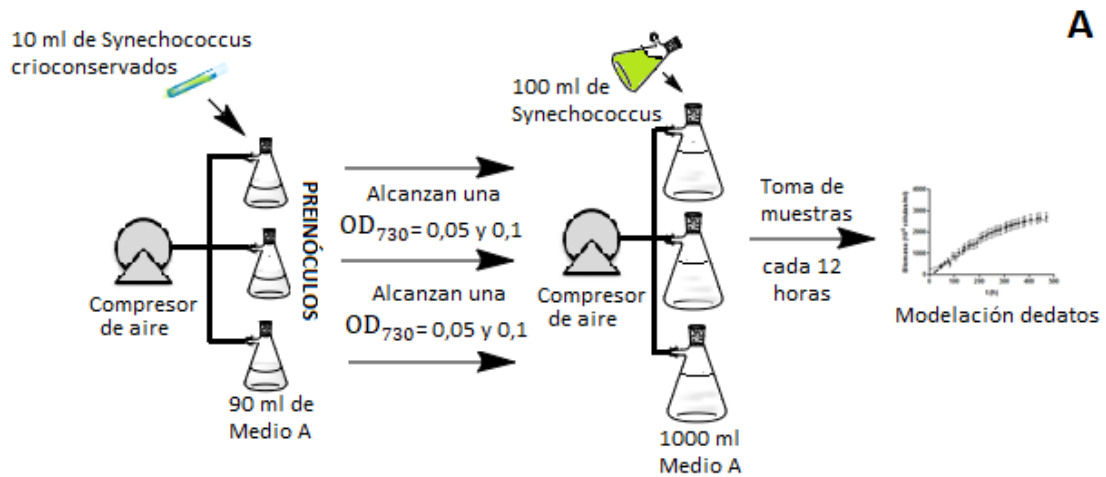


Figura 9. Montaje para la medición de biomasa de *Synechococcus* sp. cepa PCC7002 en cultivo sumergido. **A.** Esquema donde se muestra el uso de preinóculos y los pasos para la construcción de la curva de crecimiento. **B.** Montaje real de los preinóculos donde se ven las entradas de aire y el uso de piedras difusoras.

6) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de concentración celular (biomasa) a partir de densidad óptica

Se construyó una regresión lineal para los datos de OD₇₃₀ y concentración celular (células/ mL). Se obtuvo un R² de 0,999 (ver Figura 4 y Tabla 1). La correlación lineal obtenida entre biomasa y densidad óptica fue utilizada para extrapolar todos los datos de las cinéticas de crecimiento (Figuras 5 y 6), a concentración celular.

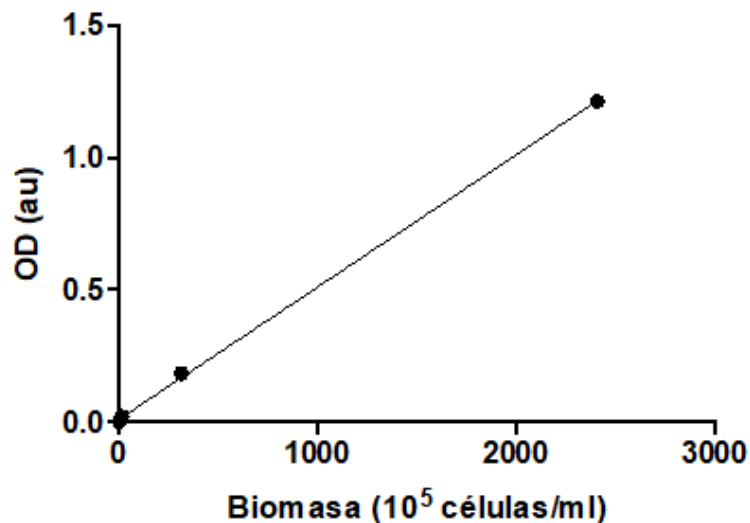


Figura 4. Curva de calibración para cuantificación de biomasa (células/mL). Los 5 puntos graficados aquí se pueden observar en la Tabla 1. Los datos de densidad óptica (OD) están dados en unidades arbitrarias (au) y fueron tomados a una longitud de onda de 730nm; y la biomasa en términos de concentración celular (células/ mL).

Tabla 1. Valores para la calibración de OD₇₃₀ en función de células/ mL

Concentración celular (células/mL)	OD ₇₃₀ (au)
1,17x10 ⁵	0,002
2,33x10 ⁵	0,003

$16,17 \times 10^5$	0,022
$315,33 \times 10^5$	0,185
$2407,00 \times 10^5$	1,213

En la columna izquierda, resultados del conteo directo en la cámara de Neubauer de las 5 diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-5} , y 10^{-6} . En la columna derecha, resultados de la turbidez de las mismas diluciones a OD₇₃₀.

Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 en condiciones de cultivo sumergido

Las Figuras 5 y 6 muestran las gráficas de los datos de biomasa contra el tiempo. La Figura 5 corresponde al modelo Logístico con un R² de 0,8881 y los siguientes parámetros: velocidad específica de crecimiento; $\mu_{max} = 0,01371 \text{ h}^{-1}$, concentración celular inicial; $y_0 = 251,7 \times 10^5$ células/mL, y concentración celular máxima; $y_{max} = 2614 \times 10^5$ células/mL. Para la Figura 5 Los valores de y_{max} y y_0 corresponden a 2614×10^5 células y $251,7 \times 10^8$ células, respectivamente. La Figura 6 corresponde al modelo Gompertz con un R² de 0,8564 y los siguientes parámetros: velocidad específica de crecimiento; $\mu_{max} = 0,02041 \text{ h}^{-1}$, Tiempo en fase Lag; $\lambda = -52,28$, y Ln (OD₇₃₀ máximo/OD₇₃₀ inicial); $y_{max} = 4,027$. Para la Figura 6 el valor de y_{max} corresponde $2699,47 \times 10^8$ células.

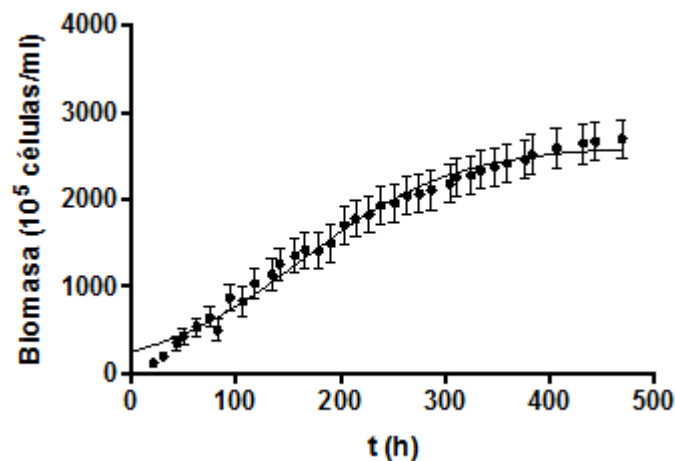


Figura 5. Curva de crecimiento Logístico para *Synechococcus* sp. PCC 7002. Se observan las concentraciones celulares de todas las muestras tomadas por

aprox. 20 días. En el eje x está el tiempo en horas. Los parámetros reportados por el modelo fueron: $\mu_{max}=0,01371 \text{ h}^{-1}$, $y_0=251,7 \times 10^5$ células/mL, $y_{max}=2614 \times 10^5$ células/mL. Cada punto corresponde al promedio de $n=3$ experimentos independientes y las barras verticales representan el error estandar de la media. Para el ajuste del modelo logístico se obtuvo un R^2 de 0,8881. Los intervalos de confianza del 95% obtenidos para los parámetros fueron los siguientes: $\mu_{max}=0.01125$ a 0.01617 h^{-1} ; $y_0=169.4$ a 333.9 ; $y_{max}=2451$ a 2777 .

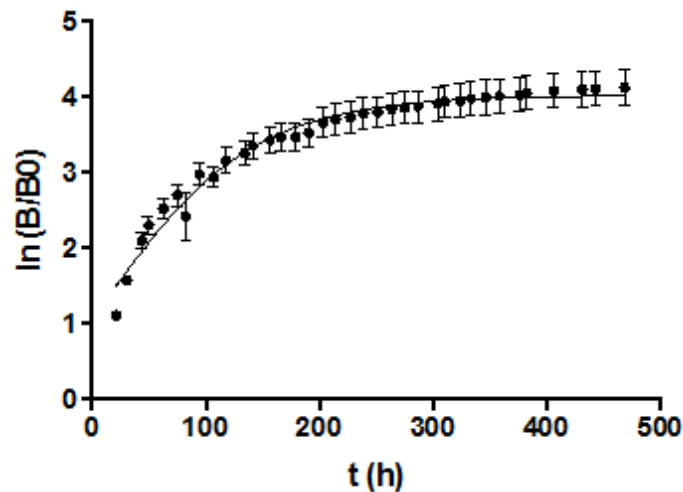


Figura 6. Curva de crecimiento Gompertz para *Synechococcus* sp. PCC 7002. Se observa el logaritmo natural de la biomasa (B) relativa a la biomasa inicial (B_0), estimadas a partir de la densidad óptica relativa a 730nm (OD_{730}). Los datos fueron tomados cada 12 horas por aprox. 20 días. En el eje x está el tiempo en horas. Los parámetros reportados por el modelo fueron: $\mu_{max} = 0,02041 \text{ h}^{-1}$, $\lambda = -52,28 \text{ h}$, $y_{max} = 4,027$. Cada punto corresponde al promedio de $n=3$ experimentos independientes y las barras verticales representan el error estandar de la media. Para el ajuste del modelo logístico se obtuvo un R^2 de 0,8564. Los intervalos de confianza del 95% obtenidos para los parámetros fueron los siguientes: $\mu_{max}=0.01693$ a 0.02389 h^{-1} ; $\lambda = -73.02$ a -31.54 h ; $y_{max} = 3.917$ a 4.137 . Los datos utilizados para la construcción de esta curva fueron exactamente los mismos de la Figura 5.

El modelo de Gompertz, a diferencia del Logístico, se ajustó en términos de μ_{max} , λ y y_{max} . Como los datos para estas cinéticas no fueron tomados durante la fase Lag sino después de que ésta tuviera lugar, por el uso de preinóculos, se observa que el valor que arroja el modelo es negativo, lo cual carece sentido físico; pero indica que la fase Lag no está en el rango de tiempo en el que se tomaron los datos. Adicionalmente, se observa que la correlación

obtenida para el modelo Gompertz fue menor a la obtenida para el modelo logístico, con una diferencia en el valor de R^2 en ambos modelos de 0,0317. De otro lado, ambos modelos presentan una velocidad específica de crecimiento más o menos cercana: Logístico: $\mu_{max}=0,01371 \text{ h}^{-1}$, Gompertz: $\mu_{max}=0,02041 \text{ h}^{-1}$; con intervalos de confianza del 95% similares entre sí.

Comparación del crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 con aireación constante y sin aireación constante

En la Figura 8 se observa la comparación entre una cinética de crecimiento con flujo de aire constante y sin flujo de aire. La diferencia en la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) fue del doble. Ambas cinéticas presentaron un buen ajuste bajo el modelo Logístico. La cinética construida con muestras sin flujo de aire constante no estaba completamente en condiciones anóxicas porque cada 12 horas aproximadamente fue necesario destapar el erlenmeyer al ambiente para tomar la muestra. Nuestros cálculos permiten estimar un porcentaje de CO_2 de aproximadamente 0,04% para los experimentos con aireación constante.

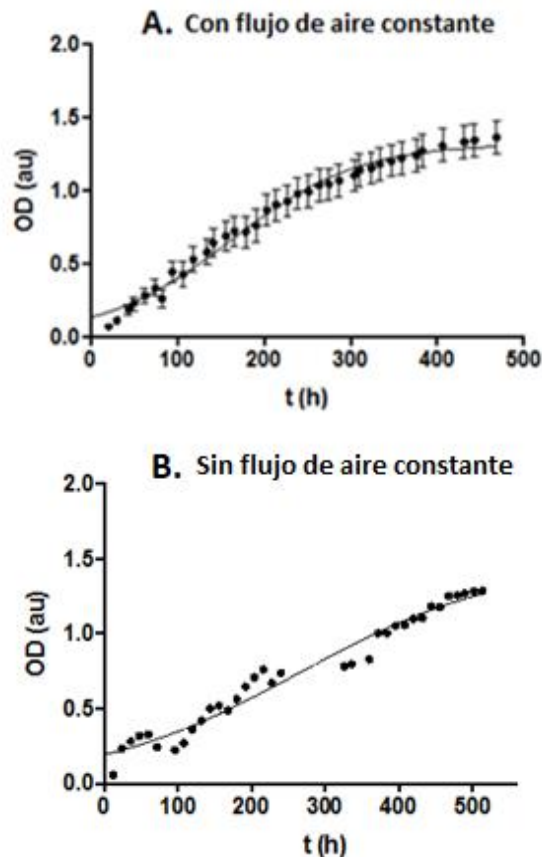


Figura 8. Evaluación del crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 con aireación constante y sin aireación constante. Los datos representan densidad óptica contra el tiempo de un cultivo con flujo de aire constante (aprox. 0,04% CO₂) (panel A) y un cultivo sin aireación constante (panel B). **A. Con flujo de aire constante:** La gráfica fue construida haciendo uso de la ecuación logística y entregó los siguientes parámetros: $\mu_{max}=0,01354 \text{ h}^{-1}$; $y_0=0,1322$ au; $y_{max}=1,321$ au. Cada punto corresponde al promedio de n=3 experimentos independientes y las barras verticales representan el error estandar de la media. Para el ajuste del modelo logístico se obtuvo un R² de 0,8886. Los intervalos de confianza del 95% obtenidos para los parámetros fueron los siguientes: $\mu_{max}= 0.01113$ a 0.01596 h^{-1} ; $y_0= 0.09033$ a 0.1741 au; $y_{max}= 1.239$ a 1.403 au. **B. Sin flujo de aire constante:** Los datos para esta gráfica corresponden a un sólo experimento (n=1). La gráfica fue construida haciendo uso de la ecuación logística y entregó los siguientes parámetros: $\mu_{max}= 0,007176 \text{ h}^{-1}$; $y_0= 0,1922$ au; $y_{max}= 1,480$ au. Para el ajuste del modelo logístico se obtuvo un R² de 0,9592. Los intervalos de confianza del 95% obtenidos para los parámetros fueron los siguientes: $\mu_{max}= 0.005329$ a 0.009023 h^{-1} ; $y_0= 0.1440$ a 0.2405 au; $y_{max}= 1.216$ a 1.743 au.

La falta de CO₂ pareció ser un factor limitante para el óptimo crecimiento de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7002 y el montaje con aireación resultó ser más ideal para el crecimiento eficiente de la cianobacteria. La diferencia de 4 grados en la temperatura de ambos experimentos es considerada insignificante para la evaluación de los parámetros que arrojan ambas curvas de crecimiento con y sin aireación. Esto es, porque de acuerdo con el estudio realizado por (M. H. Zwietering et al., 1991), una diferencia de 4 grados en la temperatura de un cultivo microbiano solo crea una diferencia en la velocidad específica de crecimiento de 0,2. En dicho estudio se muestran varias ecuaciones para el crecimiento microbiano con un ajuste para tener en cuenta diferencias en la temperatura (ver M. H. Zwietering, B. E. Hasenack, J. C. de Wit, K. Van 'T Riet, 1991).

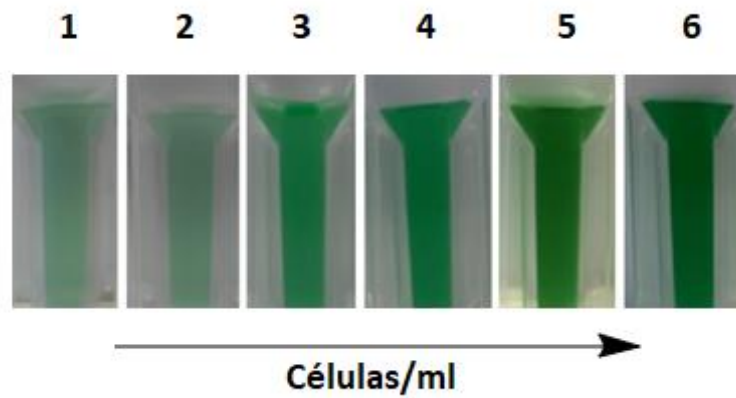


Figura 7. Desarrollo visible de la concentración celular en el tiempo. Seis de las 36 muestras totales de la cinética se muestran en esta imagen. Las muestras 1 y 2 fueron tomadas hacia el principio del crecimiento, las 3 y 4 hacia la mitad y las muestras 5 y 6 hacia el final del muestreo. El aumento visible en la clorofila es un indicador cualitativo del aumento de la concentración celular. La turbidez en la muestra, además del verde característico por la presencia de clorofila, es un indicador de la integridad celular en la suspensión.

7) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los parámetros cinéticos del crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 bajo 1,138 μmol fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica, aprox. 0,04% de CO_2 en aire y una temperatura aproximada de 24°C en Medio A (Arnon, Mcswain, Tsujimoto, & Wada, 1974); fueron: $\mu_{max}=0,01371 \text{ h}^{-1}$, $y_0=251,7 \times 10^5$ células/mL, $y_{max}=2614 \times 10^5$ células/mL.

En este trabajo se observó que la adición de una cantidad tan baja de CO_2 como 0,04% permite alcanzar valores de densidad óptica en la mitad del tiempo que tomaría alcanzarlos sin flujo de aire constante (con 0,04% de CO_2 se duplica el valor de μ_{max}). Sin embargo para obtener resultados concluyentes del cambio en la velocidad de crecimiento en función del CO_2 se deben realizar futuros experimentos para obtener datos adecuados para la realización de una prueba de hipótesis.

Aunque no existe una motivación específica para utilizar el modelo de Gompertz sobre el modelo logístico es usual evaluar diferentes modelos para comparar cuál de ellos explica mejor los datos (Zwietering et al., 1990). En este trabajo el modelo que mejor explicó nuestro conjunto de datos del crecimiento de *Synechococcus* sp. PCC 7002 fue el logístico con un R^2 de 0,8881 y tres parámetros biológicamente relevantes. El modelo de Gompertz aunque tuvo un R^2 similar (0,8564), el parámetro que corresponde al tiempo de la fase Lag no tuvo sentido físico porque arrojó un valor negativo para los datos de este trabajo; lo cual se puede explicar por el uso de preinóculos.

Es importante considerar la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002 como un organismo ideal para el estudio proteómico. A partir de los datos obtenidos en este trabajo se puede conocer la duración y el momento aproximado de la fase exponencial en la que las condiciones celulares son constantes y los niveles de expresión protéica no varían drásticamente (Monod, 1949). Además, como las muestras de proteínas intermembranales se extraerían de una suspensión de cianobacterias y no por un proceso de extracción de organelas eucariotas, las membranas celulares estarían más intactas que las de un cloroplasto. Por lo anterior y por la facilidad de medición de biomasa utilizando densidad óptica, se sugiere realizar un estudio comparativo de las proteínas de membrana de *Synechococcus* sp. PCC 7002 con las proteínas intermembranales de cloroplastos.

Finalmente aclaramos que la curva de calibración para la determinación de biomasa a partir de datos de densidad óptica, debe ser mejorada (para su debida estandarización) de la siguiente manera: Primero, hacer al menos otras dos réplicas del conteo celular con sus respectivas densidades ópticas y volver a hacer la regresión lineal con la media de los tres conjuntos de datos. Segundo, validar la información de la curva de calibración así construida, midiendo la concentración celular y la densidad óptica de muestras de cianobacterias tomadas al azar durante el crecimiento bacteriano.

9) REFERENCIAS

- Arnon, D. I., Mcswain, B. D., Tsujimoto, H. Y., & Wada, K. (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 357, 231-245.
- Baalen, C. V. (1961). Studies on Marine Blue-Green Algae. *Botanica Marina*, 4, 129-139.
- Buchanan, R. L., Whiting, R. C., & Damert, W. C. (1997). When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi and three-phase lineal models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, 14, 313-326.
- Casas, G. A., Rodríguez, D., & Téllez, G. A. (2010). Propiedades matemáticas del modelo de Gompertz y su aplicación al crecimiento de los cerdos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23, 349-358.
- Cortés López, J. C., Romero Bauset, J. V., Roselló Ferragud, M. D., & Villanueva Micó, R. J.). *El modelo no lineal de crecimiento logístico: estudio y solución*. Instituto Universitario de Matemática Multidisciplinar.
- Ferenci, T. (1999). 'Growth of bacterial cultures' 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. *Res. Microbiol.*, 150, 431-438.
- Fujikawa, H., & Morozumi, S. (2005). Modeling surface growth of Escherichia coli on agar plates. *Appl Environ Microbiol*, 71(12), 7920-7926. doi:10.1128/AEM.71.12.7920-7926.2005
- Hendry, J. I., Prasannan, C. B., Joshi, A., Dasgupta, S., & Wangikar, P. P. (2016). Metabolic model of Synechococcus sp. PCC 7002: Prediction of flux distribution and network modification for enhanced biofuel production. *Bioresour Technol*, 213, 190-197. doi:10.1016/j.biortech.2016.02.128
- Hindler, J. A., Patel, J. B., Powell, M., Swenson, J. M., Thomson, R. B., Traczewski, M. M., Zimmer, B. L. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition* (Vol. 32). Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Ludwig, M., & Bryant, D. A. (2011). Transcription Profiling of the Model Cyanobacterium Synechococcus sp. Strain PCC 7002 by Next-Gen (SOLiD) Sequencing of cDNA. *Front Microbiol*, 2, 41. doi:10.3389/fmicb.2011.00041
- McNeely M.L., K. Campbell, M. Ospina, B.H. Rowe, K. Dabbs, T.P. Klassen, J. Mackey, K. Courneya (2010). Exercise interventions for upper-limb dysfunction due to breast cancer treatment (Review). *TheCochrane Library* (6).
- The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (1995). (D. A. Bryant Ed. Vol. II). Pennsylvania, U.S.A.
- Monod, J. (1949). THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. *Annu. Rev. Microbiol.*, 3, 371-394.
- Nothnagel, H. J., Preimesberger, M. R., Pond, M. P., Winer, B. Y., Adney, E. M., & Lecomte, J. T. (2011). Chemical reactivity of Synechococcus sp. PCC 7002 and Synechocystis sp. PCC 6803 hemoglobins: covalent heme attachment and bishistidine coordination. *J Biol Inorg Chem*, 16(4), 539-552. doi:10.1007/s00775-011-0754-2
- Ruffing, A. M., Jensen, T. J., & Strickland, L. M. (2016). Genetic tools for advancement of Synechococcus sp. PCC 7002 as a cyanobacterial chassis. *Microb Cell Fact*, 15(1), 190. doi:10.1186/s12934-016-0584-6
- Sakamoto, T., & Bryant, D. A. (1998). Growth at low temperature causes limitation in the cyanobacterium Synechococcus PCC 7002. *Arch Microbiol*, 169, 10-19.
- Stallier, R. Y., & Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31, 225-274.

- Stal, L. J. (1995). Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytol.*, *131*, 1-32.
- Stal, L. J., & Moezelaar, R. (1997). Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbial Reviews*, *21*, 179-211.
- Steunou, A. S., Jensen, S. I., Brecht, E., Becraft, E. D., Bateson, M. M., Kilian, O., . . . Kuhl, M. (2008). Regulation of nif gene expression and the energetics of N₂ fixation over the diel cycle in a hot spring microbial mat. *ISME J*, *2*(4), 364-378. doi:10.1038/ismej.2007.117
- Stevens, S. E., & Porter, R. D. (1980). Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc. Natl. Acad.*, *77*(10), 6052-6056.
- Tjorve, K. M. C., & Tjorve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS One*, *12*(6), e0178691. doi:10.1371/journal.pone.0178691
- Widdel, F. (2010). Theory and Measurement of Bacterial Growth. *Grundpraktikum Mikrobiologie*.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Riet, K. V. T. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *56*(6), 1875-1881.
- Zwietering M. H., Rombouts F. M., Van 't Riet K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *56*(6), 1875-1881.
- Zwietering M. H., Hasenack B. E., Wit J. C., Van 't Riet K. (1991). Modeling of Bacterial Growth as a Function of Temperature. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *57*(4), 1094-1101.