

Cultivo de un consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en fotobiorreactores operados bajo condiciones de invernadero

Cultivation of a consortium of nitrogen-fixing cyanobacteria in photobioreactors operated under greenhouse conditions

Villafañá-Villafañá, D. D.¹, Nájera-Mendoza, M. C.¹, Ramírez-Rosales, A. M.¹, Cea-Barcia, G. E.², Regalado-Aguirre, J. A.

¹ Licenciatura en Ingeniería Ambiental, Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato.

² Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato.
dd.villafanavillafana@ugto.mx, mdc.najeramendoza@ugto.mx, am.ramirezrosales@ugto.mx, glendacea@ugto.mx

Resumen

El presente estudio evaluó el comportamiento de un consorcio microbiano enriquecido con cianobacterias fijadoras de nitrógeno cultivado bajo condiciones no axénicas en invernadero. El inóculo, recolectado de un ambiente natural con alta biodiversidad, fue cultivado en un medio Arnon modificado, libre de nitrógeno inorgánico en fotobiorreactores de bolsa de bajo costo (30L), con el objetivo de inducir la fijación biológica. A lo largo de 17 días de cultivo se registraron aumentos en el pH y variaciones en la conductividad eléctrica, lo cual reflejó la actividad fotosintética y la asimilación de nutrientes del consorcio. Se obtuvo una productividad promedio de 0.023 g/L/día, con sólidos suspendidos totales de hasta 0.97 g/L. Las observaciones microscópicas confirmaron la presencia de estructuras típicas de cianobacterias fijadoras, como filamentos heterocistos, y se identificó contaminación bacteriana moderada hacia el final del experimento. Los resultados demuestran que es factible producir biofertilizante sostenible a mayor escala y a un bajo costo para su uso potencial en estrategias de recuperación de suelos y agricultura sostenible.

Introducción

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso esencial para el equilibrio de los ecosistemas, ya que transforma el nitrógeno atmosférico en formas asimilables por los organismos, favoreciendo la productividad primaria. Las cianobacterias, microorganismos procariontes fotosintéticos, tienen la capacidad de fijar nitrógeno molecular gracias a la acción de la enzima nitrogenasa, especialmente en condiciones donde el nitrógeno combinado es limitado. Algunas especies desarrollan heterocistos, células especializadas que crean un ambiente propicio para esta actividad al proteger la nitrogenasa del oxígeno. Debido a estas características, las cianobacterias son clave en ecosistemas acuáticos y terrestres, particularmente en ambientes oligotróficos, y representan una alternativa sostenible para la producción de biofertilizantes al mejorar la disponibilidad de nutrientes de forma natural.

La sostenibilidad de la agricultura moderna enfrenta el reto de mantener la productividad sin comprometer la salud del suelo ni generar impactos ambientales negativos. Entre los principales insumos agrícolas, los fertilizantes nitrogenados son ampliamente utilizados para mejorar el rendimiento de los cultivos; sin embargo, su producción y uso excesivo han contribuido a la degradación de ecosistemas, la contaminación del agua y el aumento de emisiones de gases de efecto invernadero. Ante este panorama, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) se presenta como una alternativa eficiente y ecológica para suplir las necesidades de nitrógeno en los sistemas agrícolas.

Las cianobacterias, microorganismos procariontes fotosintéticos, destacan entre los agentes biológicos capaces de fijar nitrógeno atmosférico gracias a la actividad de la enzima nitrogenasa. Algunas especies desarrollan estructuras celulares especializadas, como los heterocistos, que permiten mantener un microambiente anaerobio adecuado para que esta enzima funcione, incluso en presencia de oxígeno generado durante la fotosíntesis. Esta doble capacidad, fijar nitrógeno y realizar fotosíntesis, las convierte en candidatas ideales para su uso como biofertilizantes.

La utilización de un consorcio microbiano en lugar de cepas puras se basa en la sinergia ecológica entre especies, que puede mejorar la estabilidad del sistema y permitir una mejor adaptación a condiciones variables (*Ramanan et al., 2016*), como las que se presentan en los fotobiorreactores operados bajo condiciones naturales de invernadero.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el cultivo de un consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno obtenido desde la reserva natural El Pinal del Zamorano, Guanajuato, en fotobiorreactores de bolsa de bajo costo de 30 L de volumen de operación bajo condiciones no axénicas en invernadero. Se evaluará la producción de biomasa (Sólidos Suspendidos Totales), pH, conductividad y parámetros de sedimentación como Sólidos Sedimentables e índice Volumétrico de Lodos.

Metodología

Origen del inoculo

Se recolectó un consorcio microbiano con cianobacterias fijadoras de nitrógeno en el Área Natural Protegida Pinal del Zamorano, Guanajuato, México. Esta zona se caracteriza por su alta diversidad ecológica y por la presencia de cuerpos de agua con comunidades microbianas bien desarrolladas.

Particularmente se recolectaron tapetes microbianos visibles, con colonias azul-verdosas flotantes o adheridas a superficies, las muestras se enriquecieron a escala de laboratorio en medios estériles, se mantuvieron en fases de enriquecimiento con condiciones de intensidad lumínica de 100 PAR ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) y aireación constante para promover la actividad fotosintética.

“Los tapetes microbianos en ambientes acuáticos son reservorios naturales de consorcios fotoautótrofos, incluidos géneros capaces de fijar nitrógeno en condiciones de estrés nutricional” (*Abed et al., 2009, p. 123*).

La selección del sitio respondió a la necesidad de contar con un consorcio adaptado a condiciones naturales de iluminación y temperatura, con potencial para resistir estrés lumínico y osmótico.

Medio Arnon

Solución nutritiva diseñada para cultivar cianobacterias fotosintéticas bajo condiciones autotróficas. Contiene los macronutrientes esenciales, pero carece de fuentes de nitrógeno combinado, lo que lo hace útil para promover la fijación biológica de nitrógeno. Ha sido ampliamente utilizado para el cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, debido a su formulación libre de nitrógeno combinado (*Allen & Arnon, 1955, p. 928*).

Tabla 1. Medio Arnon (Original).

Nutrient solution for photosynthetically grown N ₂ -fixing blue-green algae		
Componente	Cantidad / L	Concentración Final
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.124 g	0.0005 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.015 g	0.0001 M
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.457 g	0.002 M
NaCl	0.117 g	0.002 M
Fe-EDTA (*)	1.0 ml	Fe: 5 mg/L, K: 13 mg/L
D7 (micronutrientes)	1.0 ml	-

Tabla 2. Soluciones.

(*) Solución Fe-EDTA	(*) Solución D7 (por litro de agua)
Preparada disolviendo 16 g de EDTA y 10.4 g de KOH en 186 ml de agua, luego se añadió una solución con 13.7 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 364 ml. Aire burbujeado para oxidar el hierro a Fe^{3+} . pH ~3. Contiene: 5 mg/L Fe y 13 mg/L K.	H_3BO_3 : 2.86 g
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1.81 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.222 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.079 g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1.26 g
	NaVO_3 : 0.239 g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.0403 g

Tabla 3. Medio Arnon modificado.

Con aumento de sales al 10 (NaCl a 0.02 M)		
Componente	Cantidad total (30L)	Concentración Final
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.72 g	0.0005 M
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.45 g	0.0001 M
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	13.71 g	0.002 M
NaCl	35.1 g	0.02 M
Fe-EDTA (*)	30 ml	Fe: 5 mg/L, K: 13 mg/L
D7 (micronutrientes)	30 ml	-

- Aumento de la concentración de NaCl para evaluar la tolerancia osmótica del consorcio.
- Preparación a mayor escala (30 L)

Estas modificaciones no alteran el principio del medio, pero generan una presión selectiva por salinidad, la cual puede ser útil para simular condiciones ambientales extremas o estudiar adaptabilidad.

Cultivo de fotobiorreactor en invernadero

El cultivo se llevó a cabo en un fotobiorreactor tipo bolsa plástica transparente, con un volumen útil de 30 litros. La bolsa se colgó verticalmente en un soporte estructural de malla, dentro de un invernadero, con una entrada de aire en la parte inferior a través de una manguera conectado a un difusor.

Este sistema permitió mantener una exposición continua a la luz solar, facilitar la aireación y evitar el colapso físico del volumen por presión. La elección de este tipo de reactor buscó reproducir un entorno simple, replicable y de bajo mantenimiento para fines experimentales.



Figura 1. Fotobiorreactor día 1

Aireación y condiciones ambientales

El fotobiorreactor se mantuvo en un invernadero con ventilación natural. Las temperaturas ambientales oscilaron entre 20 y 32 °C durante el día. No se emplearon fuentes de luz artificial ni control térmico. El sistema recibió luz solar directa con un fotoperiodo natural de entre 12 y 13 horas diarias, replicando condiciones ambientales de campo (Richmond, 2004).

Se instaló un sistema que cuenta con aireación continua, mismo que es integrado por una bomba, además de un difusor para pecera conectado y colocado en el fondo del reactor. La corriente de aire se mantuvo constante siendo aproximadamente un flujo de 0.26 Volumen de Gas por Volumen de Medio por Minuto (VVM).

Monitoreo de parámetros fisicoquímicos

Se monitorearon tres variables:

– **pH**

Se determinó el potencial de hidrogeno con el uso de un medidor de pH multiparamétrico Edge (115V) de la marca HANNA instruments que cuenta con electrodos digitales, el equipo contiene un intervalo de medición que va desde -2.000 a 16.000 pH y una exactitud de ± 0.01 pH.

– **Conductividad eléctrica**

Determinada mediante un conductímetro portátil A1 TDS&EC meter del fabricante Green Grow con un rango de EC: 0-9990 y una precisión de ± 0.2

– **Sólidos suspendidos totales**

Se realizó la técnica de SST para medir la biomasa que se encuentra en suspensión en el medio.

El material utilizado fue un filtro y una charola los cuales se pesaron en seco para obtener el peso total de ambos objetos.

El volumen de muestra tomada fue de 15 mL siendo totalmente homogénea y con ayuda de una bomba de vacío y un filtro de fibra de vidrio de 1.5 micrómetro se realizó el filtrado, una vez concluido este paso se colocó el filtro junto con la charola en un horno a una temperatura de 100 °C durante dos horas.

Concluido el tiempo y extraídas del horno se mantuvieron en un desecador durante 10 minutos, realizado el paso anterior fueron pesados nuevamente el filtro con la charola y de esa manera con los datos de pesaje se obtuvo la diferencia y el representativo de sólidos suspendidos totales.



Figura 2. Técnica SST.

– **Sólidos sedimentables**

La medición de sólidos sedimentables se realizó siguiendo la norma mexicana NMX-AA-004-SCFI-2013, recolectando una muestra con un volumen de 1 L asegurando que sea homogénea, una vez recolectada se colocó en un cono Imhoff llegando hasta la marca que muestre el límite de volumen.

Se deberá dejar reposar durante 45 minutos y transcurrido el tiempo realizar la medición, en caso de que se hayan generado espacios de líquido entre los sedimentables anotar el volumen y restarlo del total registrado.

Teniendo de referencia la técnica de medición para sólidos sedimentables con el cono Imhoff se realizó la prueba adicional de Índice Volumétrico de Lodos siguiendo el mismo procedimiento, sin embargo, la muestra recolectada será vaciada hasta el límite marcado en una probeta de 1 L graduada y dejar reposar durante 30 minutos, cumplido el tiempo establecido y con apoyo de la graduación del material se realizó la medición.

Observación al microscopio

Se realizaron observaciones al microscopio óptico con aumentos de 40x y 100x para identificar morfotipos celulares dominantes.

Para realizar la identificación de microorganismos se contó con el equipo Primo Star de la marca ZEISS,

Las muestras fueron recolectadas de forma estéril cada 48 horas, depositadas en portaobjetos limpios y cubiertas con cubreobjetos estandarizados. Se empleó aceite de inmersión en 100x, para mejorar el contraste celular en algunas observaciones.

Las imágenes obtenidas fueron registradas digitalmente y se almacenaron para análisis morfológico posterior. No se realizaron conteos celulares, pero se describieron estructuras morfológicas generales con base en características como forma, tamaño, y organización celular, con énfasis en filamentos y diferenciación celular.

Resultados

Cinética de Crecimiento

Transcurrido el periodo de cultivo (17 días), mediante el monitoreo continuo de parámetros fisicoquímicos, se recolectaron los siguientes datos:

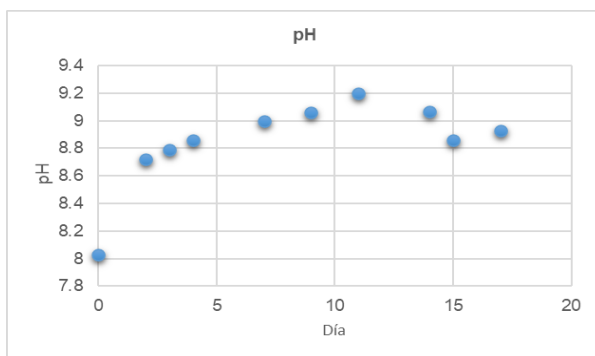


Gráfico 1. Cinética de pH

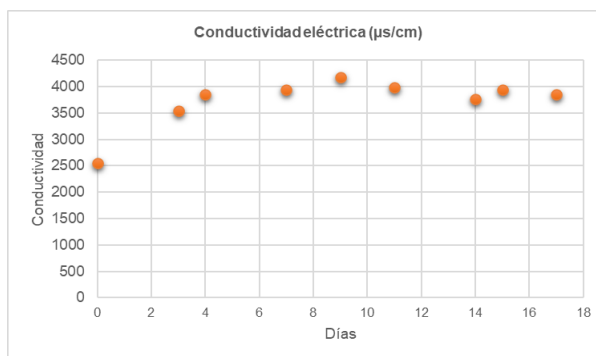


Gráfico 2. Cinética de conductividad eléctrica.

Se puede observar en el *Gráfico 1* que el pH fue en incremento desde la toma inicial, el punto más bajo registrado fue en el día 0 con 8.03, cuando se dio arranque al sistema, mientras que el más alto registrado fue en el día 11 con 9.2, después de este día se notó una ligera fluctuación en este parámetro hasta el punto final terminando con el periodo de cultivo en el día 17.

La conductividad eléctrica tuvo un incremento desde el día cero que se contó con 2544 µs/cm, partiendo de este punto se llegó al máximo valor registrado en el día 9 siendo de 4180 µs/cm, siguiendo la cinética observada en el *Gráfico 2* es posible analizar pequeños cambios en la conductividad, siendo no muy significativos, sin embargo, se contemplan como un indicador relevante del crecimiento de las cianobacterias.

El incremento del pH se utiliza como indicador indirecto de actividad fotosintética, mientras que los cambios en la conductividad reflejaron la asimilación iónica del medio (Lee, 2001).

Llevar el control del pH en sistemas resulta relevante para de esa manera medir el consumo de carbono en la fotosíntesis, el cual incrementaría los niveles de pH en el medio. (Ramírez et al., 2013).

Sólidos Suspendidos Totales

Sobre los 17 días de cultivo de las cianobacterias se utilizó la técnica para medir los Sólidos Suspendidos Totales (SST), realizando la primera prueba por triplicado el día 2 una vez se hubiera iniciado, la última prueba fue hecha por duplicado el día 17 del periodo.

Tabla 4. Sólidos Suspendidos Totales.

Día	Muestra	SST (g/L)
0	1	0.2
	1	0.76
2	2	0.89
	3	0.97
7	1	0.4
	2	0.37
9	1	0.7
	2	0.41
11	1	0.46
	2	0.36
17	1	0.60
	2	0.53

Con las muestras realizadas se pudieron obtener datos representativos durante el tiempo de cultivo:

Tabla 5. Datos recolectados.

Promedio SST (g/L)	Productividad (g/L/d)
0.59 ± 0.216	0.023

Derivado del promedio obtenido de los sólidos suspendidos totales es posible determinar que la técnica empleada entre muestras desde el reactor no fue la más eficiente y es indispensable realizar mejoras para de esa manera obtener resultados más representativos.

Sólidos Sedimentables

Con los resultados obtenidos en la realización de las pruebas para determinar la cantidad de sólidos sedimentables en el fotobiorreactor, es posible observar el crecimiento escalado que obtuvieron las cianobacterias durante el periodo de cultivo, reforzando su capacidad de adaptación en condiciones controladas y naturales.

Tabla 6. Sólidos Sedimentables.

Cono Imhoff (ml/L)	Índice Volumétrico de Lodos (ml/gSST)
>40	167



Figura 3. Sólidos sedimentables en cono Imhoff.



Figura 4. Sólidos sedimentables en probeta.

Observación microscópica

Se encontraron distintas morfologías rectangulares y circulares dentro del consorcio de cianobacterias observadas en distintas etapas del crecimiento.

Filamentos teñidos de azul (probablemente hifas de hongos o actino bacterias): Aparecen estructuras largas, rectas o ligeramente curvadas, con tinción azul intensa. Podrían tratarse de hifas fúngicas o filamentos bacterianos (como *Streptomyces*), comúnmente presentes en ambientes ricos en materia orgánica o en biorreactores.

Se observan cadenas de células redondeadas, dispuestas en forma de filamentos. Presentan un patrón de células vegetativas intercaladas con posibles *heterocistos* (células especializadas más grandes y redondas, que fijan nitrógeno atmosférico).

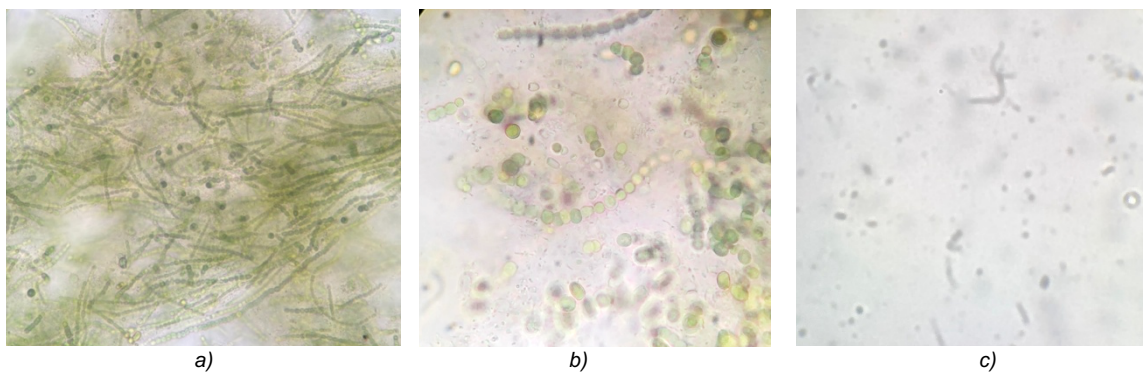


Figura 5. Observación día 3, a) 40x, b) 100x c) contaminación de bacterias

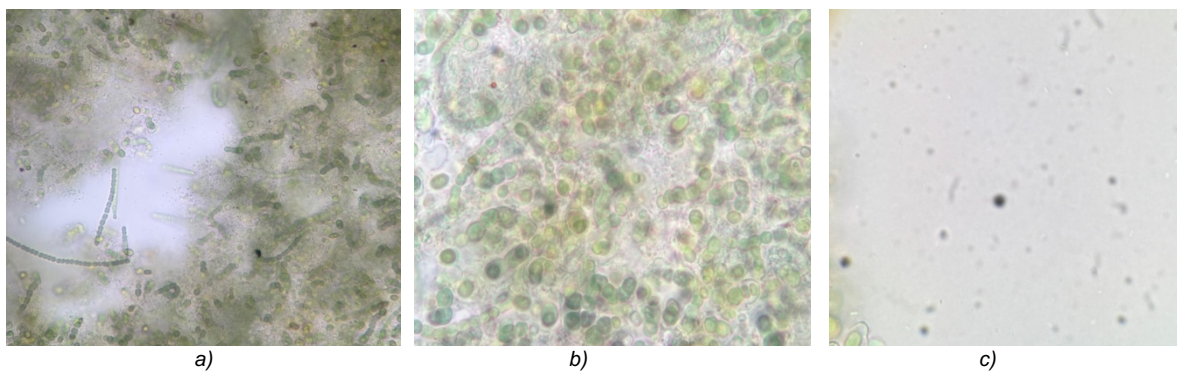


Figura 6. Observación día 10, a) 40x, b) 100x c) contaminación de bacterias.

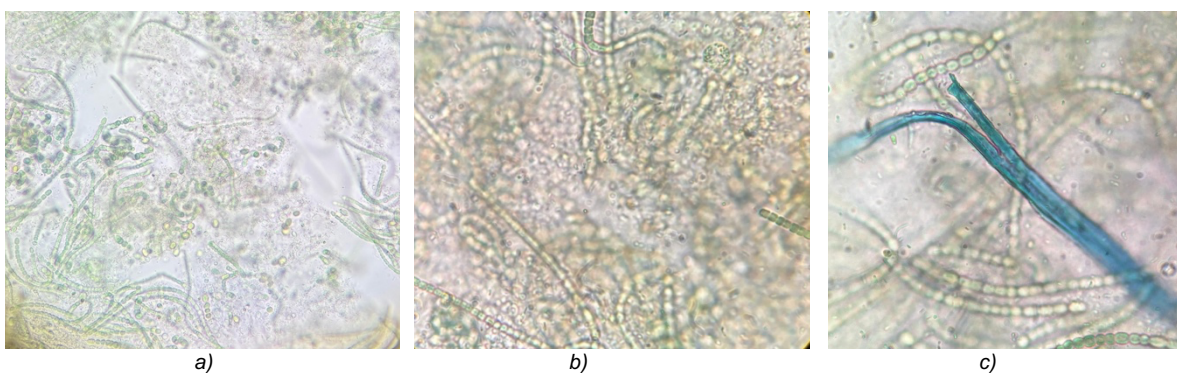


Figura 7. Observación día 14, a) 40x, b) 100x c) filamentos teñidos de azul

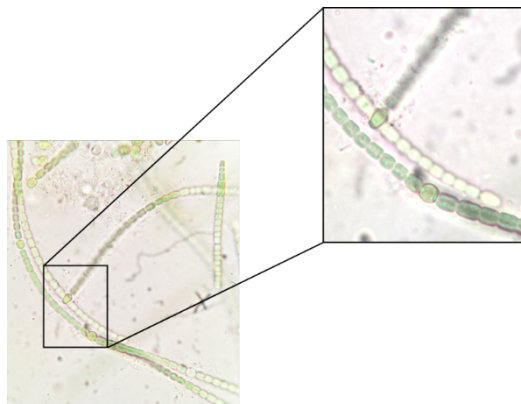


Figura 8. Heterocistos día 15

Fotobiorreactor Final

Los fotobiorreactores tipo bolsa representan una alternativa de bajo costo para el cultivo de microalgas, siendo efectivos en condiciones naturales de iluminación (Pulz, 2001, p. 137).



Figura 9. Fotobiorreactor día 17.

Conclusión

El presente estudio demostró que es posible cultivar exitosamente un consorcio microbiano enriquecido con cianobacterias fijadoras de nitrógeno bajo condiciones ambientales controladas, utilizando un fotobiorreactor tipo bolsa de bajo costo en invernadero. El uso del medio Arnon modificado sin nitrógeno combinado y con incremento de sales permitió estimular la actividad nitrogenasa, lo cual se reflejó en un incremento sostenido del pH y en variaciones de la conductividad eléctrica, indicadores indirectos de la fotosíntesis y la asimilación iónica.

La observación microscópica confirmó la presencia de estructuras clave como heterocistos, lo que valida la capacidad fijadora del consorcio. Aunque se identificó contaminación bacteriana hacia el final del cultivo, la productividad obtenida y los valores alcanzados de sólidos suspendidos respaldan el potencial biotecnológico del sistema.

Sin embargo, se identificaron limitaciones metodológicas, particularmente en la técnica de muestreo de sólidos suspendidos, que deben mejorarse para futuras investigaciones. En conjunto, estos resultados respaldan el uso de este tipo de sistemas como estrategia accesible y replicable para la producción de biofertilizantes sostenibles basados en consorcios microbianos adaptados a condiciones ambientales variables.

Referencias

- Abed, R. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>
- Allen, M. M., & Arnon, D. I. (1955). Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. *Plant Physiology*, 30(4), 366–372.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., & Flores, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 411–425. <https://doi.org/10.1128/JB.183.2.411-425.2001>
- Lee, R. E. (2001). *Phycology* (4th ed.). Cambridge University Press.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 287–293. <https://doi.org/10.1007/s002530100702>
- Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, 34(1), 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171–205.