

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Hasta la fecha son escasos los estudios sobre cianobacterias heterocísticas fijadoras de nitrógeno en el país (Santamaría y Koch, 1990; Freiberg y Koch, 1999) y ninguno sobre la taxonomía de este tipo de microorganismos ligados a *Polylepis pauta*. Considerando la necesidad de nombrar a las especies adecuadamente en tratados ecológicos o experimentales y la importancia del rol que tienen las cianobacterias fijadoras de nitrógeno, se analizaron las características morfológicas de tres cianofíceas precedentes de esta especie leñosa cuya población se está deteriorando, comprometiendo así a la microbiota que mantiene ligada; la determinación de estos organismos en condiciones naturales es generalmente complicada; sin embargo, al mismo tiempo, en la era moderna de la taxonomía molecular, es indispensable tener un germoplasma bien caracterizado basado en atributos morfológicos y fisiológicos que pueda servir como un punto de partida para proyectos de secuenciación de genoma. Es así que la necesidad de la taxonomía basada en la combinación de datos morfológicos y moleculares se ha hecho mayor en los últimos años (Pereira *et al.*, 2005; Nayak *et al.*, 2007).

El manejo de cultivos microalgales demanda de ciertos parámetros clave a considerarse (Abalde, 1995), las ventajas que se tiene al trabajar con especies endémicas contempla la facilidad del suministro de condiciones ambientales y una producción sostenible, sin embargo el desconocimiento del manejo apropiado de estos microorganismos dificulta la apropiada explotación de su gran variedad de metabolitos, que podrían aprovecharse en países en desarrollo como el nuestro donde la desnutrición y la accesibilidad a los alimentos representa un grave problema y las opciones para conseguir y producir proteína a bajo costo son limitadas por varias circunstancias.

La composición proteínica de las cianobacterias podría utilizarse en la industria alimenticia, en la acuicultura, en la alimentación de ganado bovino e

industria farmacéutica (Olaizola, 2003). Es por esto precisamente que es de gran importancia establecer las condiciones a nivel de laboratorio para la producción adecuada de microalgas con perspectivas a un escalamiento.

1.2 Justificación del problema:

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos con una gran variabilidad morfológica y estructural, debido a que han desarrollado estrategias ecofisiológicas de adaptación a diferentes condiciones ambientales de temperatura, humedad, salinidad, irradiación solar y pH (Houmar, 1994; Mann, 1994; Whitton y Potts, 2000). De igual manera, estas características implican su amplia versatilidad metabólica; por lo cual le confieren interés en biotecnología como productoras de metabolitos de interés comercial (Guerrero, 1992; Otero *et al.*, 1997; Fábregas *et al.*, 1998).

El presente trabajo realiza un aporte al escaso inventario de la microbiota ligada al páramo de Papallacta, además pretende crear una referencia para cultivar estas cianobacterias con un equilibrado aporte de nutrientes y condiciones de luz necesarias para que estas puedan desarrollarse y aprovecharse de forma rentable en la industria.

Las cianobacterias son utilizadas en la alimentación humana y animal, obtención de metabolitos primarios y secundarios de alta calidad, biorremediación de suelos y aguas residuales, absorción de metales pesados e hidrocarburos, entre otras aplicaciones (Kosaric *et al.*, 1974; Fabregas *et al.*, 1984; Lau *et al.*, 1995). Varios géneros representantes de las cianobacterias son una fuente rica en proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros nutrientes por lo que uno de sus principales usos es como suplemento alimenticio en diferentes presentaciones (Sasson, 1997; Laboratorios Almar, 2004).

En general, la mayoría de los sistemas de cultivo masivo son limitados por la luz (Yun y Park 2001). Por lo tanto, comprender la dependencia de la luz en la actividad metabólica de microalgas y cianobacterias es de gran

importancia para la producción de estos microorganismos (Marsh y Weinstein 1966).

Con el fin de mejorar la eficiencia en cuanto a la producción de pigmentos, proteínas o de metabolitos con actividad biológica, es preciso optimizar el crecimiento de las cianobacterias en función de ciertos parámetros importantes como la temperatura, irradiancia, salinidad, agitación, concentración y naturaleza de nutrientes en condiciones de laboratorio, se ha considerado necesario analizar aspectos fundamentales como el tiempo de generación y producción proteica bajo diferentes condiciones de nitrógeno e irradiancia, factores de gran interés tanto en la industria acuícola, de nutrición y dietética.

Para el estudio se utilizarán tres cianobacterias obtenidas del Proyecto “Aislamiento, purificación y caracterización de cianobacterias procedentes de bosques nativos de *Polylepis pauta* para su aplicación en reforestación, recuperación de suelos y extracción de metabolitos primarios y secundarios” financiados por la Escuela Politécnica del Ejército.

El presente trabajo reporta las características morfológicas mediante clave microscópica de tres cianobacterias procedentes de la filósfera de bosques nativos de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta y el efecto de la concentración de nitrato, de la irradiancia y de dos tipos de medio de cultivo sobre su crecimiento y producción de proteína total, bajo las condiciones de los laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, estableciendo de esta manera un precedente para un cultivo industrialmente rentable.

1.3 Objetivos de la investigación.

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar tres cianobacterias aisladas del área foliar de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta mediante clave microscópica, tiempo de generación y producción de proteína total según fuente de nitrógeno, luz y medio de cultivo.

1.3.2 Objetivos Específicos

- 1.3.2.1** Cultivar biomasa suficiente de cada una de las tres cianobacterias para llevar a cabo la experimentación.
- 1.3.2.2** Caracterizar microscópicamente a las tres cianobacterias mediante la clave de Bergey's, Anagnóstidis & Komárek y Desikachary.
- 1.3.2.3** Determinar el crecimiento de las tres cianobacterias mediante curvas de cinética.
- 1.3.2.4** Establecer un medio de cultivo recomendable, la concentración óptima de nitratos y luminiscencia para la generación de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) de las tres cianobacterias.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Introducción a las cianobacterias

La aseveración de que las algas verde-azules (cianobacterias) son bacterias y no algas ha llevado a conceptos alternativos para los dos últimos términos. Bacteria es ahora frecuentemente utilizado para designar el reino procariote que incluye las algas verde-azules, mientras que en otros contextos representa específicamente a aquellos procariotes que no son verde-azules. El término alga, no tienen implicación biosistemática; abarca muchos linajes filogenéticamente independientes caracterizados por la evolución de la fotosíntesis oxigénica (Stanier & Cohen-Bazire, 1977; Sanders, 2004).

En el primer volumen de la segunda edición del manual de Bergey's se trata al dominio Archaea, y a las bacterias fototróficas como las Cianobacterias. Las propiedades empleadas para la diferenciación son: características morfológicas microscópicas, morfología de las colonias y pigmentación, condiciones de crecimiento y nutrición, fisiología y metabolismo, características genéticas, plásmidos y bacteriófagos, estructura antigénica, patogenicidad y ecología.

Los procariotes fotosintéticos oxigénicos comprenden una taxonomía simple y un grupo filogenético, cuya característica principal que los define es la presencia de dos fotosistemas (PSII y PSI) además del uso del agua como

fotoreductor en la fotosíntesis, aunque la quimio y fotoheterotrofia facultativa puede ocurrir en algunas especies o cepas, todos los miembros conocidos son fotoautótrofos, capaces de utilizar el CO₂ como la principal fuente de carbono celular (Boone and Castenholz, 2001).

1.4.1.1 Diferencias entre las cianobacterias y las microalgas

En un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila *a* y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. El término microalga no tiene sentido taxonómico aunque el término alga alguna vez pudo haberlo tenido. Fuentes modernas han enfatizado mucho que *alga* denota un grado ecológico estructural y no una entidad biosistemática, el término alga no tiene implicaciones filogenéticas y dentro del mismo se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos: cianobacterias que tienen estructura celular procariota, y las restantes microalgas con estructura celular eucariota (Abalde, 1995; Sanders, 2004).

Las microalgas son un grupo extremadamente heterogéneo de organismos. Para ser llamado microalga, el organismo necesita ser pequeño (usualmente microscópico), unicelular (pero puede formar colonias con una pequeña o sin diferenciación de células), con mucho color (debido a los pigmentos fotosintéticos y accesorios), aparecer frecuentemente en el agua (pero no necesariamente) y más probablemente ser fotoautotrófico (pero no necesariamente todo el tiempo). Filogenéticamente, las microalgas pueden ser procariotas o eucariotas. Esta gran diversidad hace de las microalgas, como grupo, una fuente potencialmente rica en una inmensa serie de metabolitos (Olaizola, 2003).

1.4.2 Clasificación y filogenia

Los sistemas taxonómicos para organismos biológicos son jerárquicos. La unidad más inclusiva de clasificación es el dominio, después el reino, seguido del phylum (o división), clase, orden, familia, género, especie y subespecie. Un rango adicional bajo el nivel de subespecie es el patotipo,

serotipo o biotipo que se añade cuando se desea distinguir una cepa de un carácter especial que esta posee (Glazer and Hiroshi, 2007).

El taxón género es una categoría taxonómica que se ubica entre la familia y la especie; es un grupo que reúne a varias especies emparentadas. Varios géneros pueden agruparse en Supergéneros; y también los individuos de un género pueden organizarse en Subgéneros. Estos, a su vez, pueden organizarse en Infragéneros (Sanders, 2004).

El taxón especie se constituye por todos los individuos con características estructurales, funcionales, genéticas y comportamentales semejantes, se reproducen entre ellos y origina una descendencia fértil y que tienen una misma ascendencia (Sanders, 2004).

Para la delimitación de los géneros de cianobacterias, los especialistas han seguido dos caminos: (a) Conservar géneros “pequeños” (Anagnóstidis y Komárek, 1985), (b) Juntar muchas especies dentro de pocos géneros (Bourrelly, 1985). Al parecer la primera opción es la más práctica, sin embargo, la información sobre las características genéticas y de cultivo son insuficientes para seguir este camino.

Estos géneros grandes tienen la intención de servir como vehículos temporales para varios grupos de especies, ecotipos o cepas (Boone and Castenholz, 2001). En el siguiente cuadro (Cuadro 1.1) se muestran algunos géneros de cianobacterias agrupados en unicelulares y filamentosas con sus principales características y lugares de procedencia.

Cuadro 1.1. Grupos morfológicos y géneros representativos de cianobacterias planctónicas marinas, con sus características (Modificado de Whitton y Potts, 2000).

| GRUPOS | GÉNEROS | FIJADORAS DE N ₂ | CARACTERÍSTICAS |
|---------------------|--|-----------------------------|--|
| Unicelulares | | | |
| (Solitarias) | <i>Synechococcus</i> <i>Prochlorococcus</i> | La mayoría (-) | Solitaria, común en océanos oligotróficos, pueden formar "blooms" en aguas hipersalinas. |
| Solitarias | <i>Synechosystis</i> | (-) | Solitarias, formando "blooms" en lagunas y bahías hipersalinas |
| | <i>Aphanothece</i> | Algunas (+) | Solitarias, ficocoplanctónicas, oligoalinas |
| (Coloniales) | <i>Merismopedia</i> | (-) ? | Prefieren aguas enriquecidas con nutrientes |
| Filamentosas | | | |
| (no heterocísticas) | <i>Lyngbya</i> | Algunas (+) | Agregados, frecuentemente asociados con protistas, metazoos. |
| | <i>Oscillatoria</i> | Algunas (+) | Unas pocas reportadas en "blooms", algunas asociadas con macroalgas y plantas superiores |
| | <i>Phormidium</i> | (-) | Solitarias, y asociadas con otros protistas. |
| | <i>Spirulina</i> | (-) | Solitaria, hipersalina y agua enriquecida con nutrientes |
| | <i>Trichodesmium</i> | (+) | Agregadas forman "blooms" en aguas tropicales y subtropicales asociadas con protistas. |
| (heterocísticas) | <i>Anabaena</i> | (+) | Solitaria, en lagunas y bahías. |
| | <i>Aphanizomenon</i> | (+) | Agregados formadores de "blooms" en aguas enriquecidas con nutrientes. |
| | <i>Nodularia</i> | (+) | Formadores de "blooms" en las costas, aguas enriquecidas con nutrientes. |
| | <i>Richelia</i> | (+) | Endosimbionte en las diatomeas <i>Rizostenia</i> y <i>Hemiaulus</i> en aguas tropicales y subtropicales. |

1.4.3 Sistemas de clasificación de las cianobacterias.

En primer lugar, el sistema más simple, basado casi por completo en el limitado número de cianobacterias en cultivo es el de Rippka *et al.*, 1979. Los criterios para la clasificación incluyen: morfología, modo de reproducción, ultraestructura, fisiología, química y a veces genética (Boone and Castenholz, 2001). El aislamiento, base de datos e historial de la mayor parte de cepas incluidas en el Manual de Bergey's se encuentran en Rippka *et al.*, 1979.

Rippka divide a las cianobacterias en cinco secciones, las dos primeras secciones, I y II, como "unicelulares", las células aisladas o formando agregados coloniales unidas por otras capas de la pared exterior de la célula. Sus otras tres secciones, de la III a V, son descritas como "filamentosas", formadas por tricomas (cadenas de células) que crecen por división intercalar de las células. La sección I (unicelulares) agrupa cianobacterias que se reproducen por fisión binaria o por gemación y pueden ser células cilíndricas u ovoides. En la sección II las cianobacterias unicelulares que se reproducen solamente por fisión múltiple, la sección III (filamentosas) son cianobacterias filamentosas no heterocísticas que se dividen en un solo plano, en la sección IV (filamentosas) cianobacterias heterocísticas que se dividen en un solo plano y su reproducción se da por la rotura de tricomas al azar, algunas germinan de acinetos; tricomas vegetativos. La sección V (filamentosas) contiene cianobacterias heterocísticas filamentosas que se dividen en más de un plano por la rotura de tricomas al azar, por la formación de hormogonios y (si se producen) por la germinación de acinetos (Rippka *et al.*, 1979).

En segundo lugar, el simple pero inapropiado sistema de Drouet (Drouet, 1981) se basa en la morfología de especímenes de herbario, rara vez utilizadas hoy en día.

Por otro lado, el sistema "Geitlerian" es complejo y se basa casi por completo en características morfológicas de los especímenes colectados (Geitler, 1932).

Existe una reevaluación crítica del género "Geitlerian" que aun se basa en características morfológicas y reproductivas primarias (Bourrelly, 1985).

Además una reciente, extensiva y compleja modificación del sistema “Geitlerian”, utilizando morfología, ultraestructura, modos de reproducción, variación y otros criterios de especímenes colectados y cultivados por Anagnostidis y Komárek con una definición más estrecha de género que en el sistema de Rippka.

Es demasiado pronto para caracterizar y catalogar especies de cianobacterias, aunque esto ha sido hecho por autores que continúan utilizando principalmente características fenotípicas (e.g, Komárek y Anagnóstidis, 1998). Todas estas clasificaciones tendrán que ser revisadas casi completamente cuando las comparaciones genéticas estén disponibles (Boone and Castenholz, 2001).

Debe ser entendido que solamente un número pequeño de géneros de cianobacterias están representados en cultivos axénicos y/o clonales y muchos todavía no han sido estudiados con la extensividad suficiente para ser utilizados en una caracterización; el grado de detalle en las descripciones genéricas variará considerablemente, dependiendo de la totalidad de los estudios recientes. El sistema de clasificación y los géneros incluidos aquí continuarán bajo un largo proceso de revisión y expansión (Boone and Castenholz, 2001).

Por lo pronto, según la información que se encuentra disponible actualmente en el Catálogo de Vida 2009 (Bisby *et al.*, 2009) el reino Bacteria reúne nueve Phyla (Cuadro 1.2), siendo uno de estos el Phylum Cyanobacteria, esta jerarquía no tiene una clase asignada y contiene siete órdenes, de las cuales una no ha sido nombrada.

Cuadro 1.2: Clasificación del Reino Bacteria y del Phylum Cyanobacteria
(Catalogue of life: 2009 Annual Checklist on line).

| |
|-----------------------------|
| Bacteria |
| Phylum Acidobacteria |
| Phylum Actinobacteria |
| Phylum Aquificae |
| Phylum Bacteroidetes |
| Phylum Chlamydiae |
| Phylum Chlorobi |
| Phylum Chloroflexi |
| Phylum Chrysiogenetes |
| Phylum Cyanobacteria |
| No asignada a una clase |
| Order Beggiatoales |
| Order Chroococcales |
| Order Nostocales |
| Order Oscillatoriales |
| Order Prochlorales |
| Order Stigonematales |
| No asignada a un orden |

Dentro del Orden de las Chroococcales se encuentran once familias que se anotan en el Cuadro 1.3

Cuadro 1.3: Clasificación del Orden de las Chroococcales
(Catalogue of life: 2009 Annual Checklist on line).

| |
|----------------------------|
| Order Chroococcales |
| Family Chamaesiphonaceae |
| Family Chroococcaceae |
| Family Dermocarpellaceae |
| Family Entophysalidaceae |
| Family Gloeobacteraceae |
| Family Hydrococcaceae |
| Family Hyellaceae |
| Family Merismopediaceae |
| Family Microcystaceae |
| Family Synechococcaceae |
| Family Xenococcaceae |

La orden de las Nostocales se subdivide en cuatro familias, tal como se ve en el Cuadro 1.4.

Cuadro 1.4: Clasificación del Orden de las Chroococcales
(Catalogue of life: 2009 Annual Checklist on line).

Order Nostocales

- Family Microchaetaceae
- Family Nostocaceae
- Family Rivulariaceae
- Family Scytonemataceae

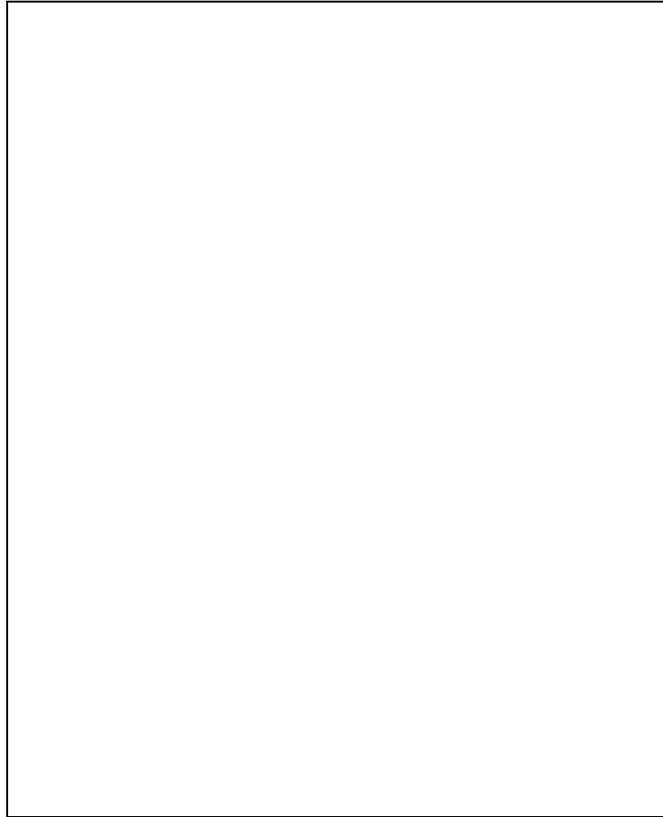
A continuación los géneros que se encuentran dentro de la familia Entophysalidaceae, entre ellos *Chlorogloeopsis (Chlorogloea)* (Cuadro 1.5):

Cuadro 1.5 Clasificación de la familia Entophysalidaceae
(Catalogue of life: 2009 Annual Checklist on line).



Los géneros que se han asignado dentro de la familia Nostocaceae en esta clasificación son 18, entre ellos *Nostoc*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Richelia*, *Trichormus* (Cuadro 1.6).

Cuadro 1.6 Clasificación de la familia Entophysalidaceae
(Catalogue of life: 2009 Annual Checklist on line).



1.4.4 Características generales de las cianobacterias.

La estructura fina de las cianobacterias es bien conocida. Son organismos fotoautótrofos, que realizan la fotosíntesis con liberación de oxígeno, presentan clorofila *a* como pigmento fotosintético primario y ficobiliproteínas como pigmentos auxiliares (Bryantt, 1986; Whitton y Potts, 2000). Las cianobacterias poseen características únicas que se describen brevemente a continuación:

1.4.4.1 Envoltura celular.

La pared celular en las cianobacterias es del tipo Gram negativo, pero la capa de peptidoglicano es usualmente más gruesa que en las proteobacterias Gram negativas, casi siempre entre 1 y 10 nm de grosor. Un gran número de cianobacterias unicelulares, coloniales y filamentosas poseen una envoltura en el exterior de la membrana externa, a esta se le conoce como

matriz, glicocálix o cápsula, o dependiendo de la consistencia como gel, mucílago o baba y así mismo para cada cepa la composición puede variar en polisacáridos y polipéptidos (Boone and Castenholz, 2001).

1.4.4.2 División celular

La mayoría de las cianobacterias son unicelulares, coloniales y algunas formas filamentosas se reproducen por fisión binaria, en formas unicelulares y pseudofilamentosas, la reproducción ocurre por fisiones múltiples internas, frecuentemente adicional a la fisión binaria en algunas células vegetativas. Las células que resultan de estas fisiones múltiples se conocen como endosporas. Dependiendo del resultado de la división celular, se pueden observar poblaciones unicelulares, si es en más planos y permanecen unidas en la matriz, se tienen colonias de varias células, si la fisión ocurre en un solo plano y la separación es incompleta, acontecen cadenas cortas o largas conocidas como tricomas. Los tricomas incluidos en una matriz, se conocen como filamentos. Adicionalmente los tricomas se presentan como uniseriados o multiseriados, si se trata del segundo caso se puede observar ramificaciones falsas o verdaderas dependiendo del origen de la ramificación (Boone and Castenholz, 2001; Komárek & Anagnostidis, 1989).

1.4.4.3 Exterior de la célula y motilidad

Las fimbrias o pilis aparecen frecuentemente en varias cianobacterias, aunque los flagelos procarióticos nunca han sido demostrados en ellas. Se ha descrito motilidad natatoria en tipos unicelulares pequeños según Waterbury *et al.*, 1985. No se han identificado organelos de propulsión, pero en muchas formas filamentosas se conoce una motilidad suave (Boone and Castenholz, 2001).

1.4.4.4 Interior de la Célula

Aunque no todos los tilacoides en las cianobacterias parecen ser invaginaciones de la membrana citoplasmática, existen “puntos de adhesión” o “centros tilacoidales” asociados con la periferie del citoplasma o la membrana citoplasmática. La mayoría de las cianobacterias poseen ficobilisomas

hemisféricos o hemidiscoidales, los cuales son complejos agregados de proteína y pigmentos, estos constan de la mayor parte del complejo de captación de luz de la mayoría de cianobacterias, los pigmentos que se pueden encontrar en su interior son: aloficocianina, clorofila *a*, ficocianina, ficoeritrocianina y ficoeritrina.

Otros componentes o inclusiones del citoplasma incluyen: gránulos de glicógeno, de cianoficina, carboxisomas, polifosfatos, vacuolas de gas y la región nucleoide (Boone and Castenholz, 2001).

1.4.4.5 Células de especialización y de diferenciación.

1.4.4.5.1 Heterocistos

Las cianobacterias de las subsecciones IV y V producen heterocistos en los tricomas, en los intervalos o en su término a través de la diferenciación de las células vegetativas, usualmente aparecen solo después de que la concentración de nitrógeno inorgánico combinado presente en el medio que las rodea ha decrecido considerablemente, se definen como células especializadas que actúan en la fijación de nitrógeno (Boone and Castenholz, 2001).

1.4.4.5.2 Acinetos

También conocidos como esporas, son producidos por muchas cianobacterias de la subsección IV. Muchos, pero no todos los heterocistos de las cianobacterias producen acinetos, particularmente bajo condiciones de deficiencia de nutrientes y/o limitaciones de luz, se trata de células vegetativas diferenciadas, crecen y adquieren una pared gruesa que rodea a la pared vieja, acumulan cianoficina, glicógeno, lípidos y carotenoides, pero los polifosfatos desaparecen (Boone and Castenholz, 2001).

1.4.4.5.3 Hormogonios

Frecuentemente se definen como cadenas cortas de 5-15 células con diámetros menores a los de las células vegetativas de los tricomas, donde generalmente ocurre la flotación. La formación y liberación de los hormogonios

parece ser un proceso medido en el tiempo asociado con las condiciones ambientales o con etapas particulares del ciclo morfogénico (Boone and Castenholz, 2001).

1.4.4.5.4 Terminaciones

En algunas bacterias filamentosas, las células terminales pueden ser altamente diferenciadas en varias formas de estrechamientos o enganchamientos (Boone and Castenholz, 2001).

1.4.5 Clasificación morfológica.

Una correcta tarea de identificación de las cianofíceas es esencial para hacer frente a cualquier diagnóstico de situación, tarea preventiva, acción de control o masificación con fines productivos. La identificación clásica de los representantes del orden Nostocales está basada principalmente en la morfología de los acinetos y de células vegetativas y en el grado de curvatura de los tricomas (Komárek, 1958; Desikachary, 1959; Komárek & Anagnostidis, 1989; Baker, 1991; Baker & Fabro, 1999). Sin embargo, algunos de estos caracteres morfológicos pueden no aparecer definidos o constantes en algunas poblaciones, debido a la influencia del ambiente en el cual se desarrollan los tricomas (Argañaraz *et al.*, 2005).

La morfología de las cianobacterias ha sido frecuentemente reportada como bastante inestable. Las cepas cultivadas de las mismas especies (morfoespecies) frecuentemente difieren una de otra y muestran una elevada variabilidad en su morfología, reflejando condiciones de crecimiento diversas como lo reportan varios autores (Anand, 1988; Lyra *et al.*, 2001; Nalewajko and Murphy, 2001; Gugger *et al.*, 2002; Gupta and Agrawal 2006a,b, 2007) en Zapomělová, 2008.

Komárek & Anagnostidis (1989) han estimado que las características de más del 50% de las cepas en las colecciones no corresponden a los diagnósticos en la taxonomía a la cual han sido asignadas, además se sabe que los registros que tratan cambios morfológicos de las cianobacterias en

cultivo son normalmente casuales. Hay sólo unos pocos estudios que tratan sistemáticamente el efecto de condiciones de crecimiento en la morfología (Stulp, 1982; Stulp and Stam, 1984).

Aún se consideran varias características morfológicas como estables y por consiguiente tienen la importancia taxonómica más alta. En el grupo de las cianobacterias nostocales, están la anchura y la simetría de los tricomas, la ocurrencia y morfología de los tricomas ramificados, dimensiones y formas de los acinetos, y posición de los acinetos con respecto a los heterocistos. La presencia y regularidad del enrollamiento del tricoma son considerados rasgos específicos de las especies en el género *Anabaena* (Geitler, 1932; Starmach 1966; Komárek, 1996).

Los principales criterios intergenéricos dentro de la familia Nostocaceae (Cuadro 1.7) son la posición de los heterocistos (terminales o intercalares) y la forma de su origen o ausencia; la morfología (simetría) de los filamentos, la cual depende de la posición de los heterocistos (y a veces también de los acinetos) en el tricoma, la presencia de tricomas simétricos, subsimétricos o metaméricos; la posición de los acinetos, el desarrollo paraheterocítico o apoheterocíticos (Ver glosario de términos Anexo I).

Los mecanismos de control de la formación de los acinetos son más o menos dependientes de la posición de los heterocistos. Los acinetos apoheterocíticos se desarrollan principalmente a partir de formas solitarias de células vegetativas; los acinetos de tipo paraheterocítico son normalmente varias veces más grandes. El tipo de simetría de los tricomas representa un buen criterio para distinguir el género dentro de la familia Nostocaceae, así como la polaridad de los tricomas. El tipo de falsa ramificación es tradicionalmente utilizado para la caracterización de las familias dentro del orden de las nostocales y los datos experimentales no contradicen estos criterios (Komárek y Anagnostidis, 1989; Rippka *et al.*, 1979).

Cuadro 1.7 Revisión de las principales características diacríticas entre *Anabaena* y *Nostoc* (Komárek y Anagnostidis, 1989).

| Característica | <i>Anabaena</i> | <i>Nostoc.</i> |
|--|--|------------------------|
| Origen y posición de los heterocistes | Intercalar | Intercalar |
| Estructura de los tricomas | Metamérico o subsimétrico | Metamérico |
| Tipo de acineto desarrollado | Paraheterocítico o paraheterocítico distante | Apoheterocítico |
| Características adicionales diacríticas | Mucílago difluente tricomas solitarios o en colonias | Ciclo de vida especial |

1.4.6 Necesidades de cultivo de las cianobacterias.

Las cianobacterias requieren condiciones y parámetros básicos para desarrollarse masivamente, se conoce además que estos parámetros pueden estar relacionados entre sí modificando la respuesta del metabolismo microalgal. En sistemas naturales, cuando una microalga tiene éxito en un ecosistema significa que es suficientemente flexible en sus requerimientos e interacciones y esta cualidad es muy conveniente cuando se trata de sistemas de cultivo masivos de una especie de interés (Darley, 1987; Vonshak, 1986).

Según Abalde, para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo se necesita: un inóculo viable de tamaño mínimo, un buen suministro de nutrientes y microelementos, adecuadas condiciones físico químicas como pH, temperatura, energía, luz, agitación entre otras.

El hecho de poder fijar las condiciones óptimas para el crecimiento de una especie de cianobacteria de interés constituye un importante avance para poder masificar el cultivo y mejor aún si esas condiciones suponen un mínimo de inversión, ya que en términos de rentabilidad los costos son lo que realmente interesan.

1.4.7 Influencia del nitrógeno en el desarrollo de cianobacterias.

Muchas de las cianobacterias fijan nitrógeno atmosférico como se había explicado anteriormente, un gran número de ellas lo hacen en

condiciones aerobias. Debido a la nitrogenasa, el sistema enzimático complejo encargado de la fijación de nitrógeno, es extremadamente sensible al oxígeno, muchas cianobacterias separan ya sea espacial o temporalmente, los procesos fotosintéticos oxigénicos y la fijación de nitrógeno. Mientras que algunas de las cianobacterias filamentosas (por ejemplo, de los géneros de *Anabaena* y *Nostoc*) confinan la nitrogenasa a los heterocistos, algunas otras, unicelulares como filamentosas, expresan la actividad de la nitrogenasa en los períodos de oscuridad, en los ciclos de crecimiento luz-oscuridad (Herrero *et al.*, 2001; Capone, 1997).

El nitrato es la fuente más abundante de nitrógeno combinado en muchos ambientes. Las cianobacterias más investigadas tienen la capacidad de utilizar esta fuente (Flores *et al.*, 2003). Sin embargo, las cepas marinas del género *Prochlorococcus* no pueden utilizar el nitrato (Rocap *et al.*, 2003). Aunque aparentemente esta es una contradicción debido a que el nitrato es la mayor fuente de nitrógeno en las aguas profundas de los océanos donde *Prochlorococcus* abunda, la limitada irradiación y el elevado costo energético para su reducción a amonio hace del nitrato una fuente inconveniente para *Prochlorococcus* en el fondo del mar (García-Fernández *et al.*, 2004).

1.4.8 Principales vías de asimilación de nitrógeno en las cianobacterias

Generalmente la utilización del nitrato requiere que su absorción esté seguida por una reducción intracelular con la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR) para producir amonio, el cual luego entra en el ciclo GS-GOGAT (Anexo J).

La utilización del nitrito procede de una forma similar, excepto que no se requiere de la actividad de NR. El donador fisiológico de electrones para NR y NiR, es Fdx_{red} (Flores *et al.*, 2005). Bajo condiciones de crecimiento fotoautótrofo, la reducción de nitrato y nitrito está acoplada a la evolución fotosintética del oxígeno *in vivo* y así puede ser considerado un proceso fotosintético genuino (Herrero y Flores, 2008).

En la Figura 1.1 se esquematizan que las fuentes de nitrógeno combinado son captados a través de permeasas y metabolizados hasta amonio, que se incorpora a esqueletos de carbono a través de la glutamina sintetasa vía glutamato sintasa.

El nitrógeno se distribuye de la glutamina o el glutamato a otros compuestos orgánicos que contienen nitrógeno. La reacción de la ureasa libera dos moléculas de amonio (NH_4^+) y una molécula de dióxido de carbono (CO_2) por cada molécula de urea degradada (no indicado en la Fig.1.1) la nitrogenasa (NifHDK) y la ferredoxina específica de heterocistos (FdxH) están en un cuadro para señalar que en algunas filamentosas la fijación de nitrógeno en las cianobacterias se realiza en los heterocistos (Flores y Herrero, 2005).

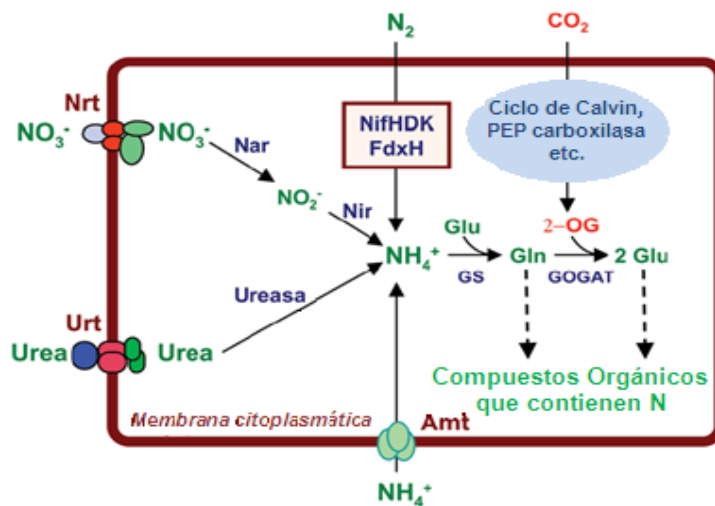


Figura 1.1: Principales vías de asimilación de nitrógeno en las cianobacterias. **NRT**, Permeasas tipo ABC transportadoras de nitrito /nitrato; **Urt**, tipo ABC - transportador de úrea; **Amt**, permeasa de amonio; **Nar**, nitrato reductasa, **Nir**, nitrito reductasa; **NifHDK**, complejo nitrogenasa; **FdxH**, ferredoxina específica de heterocistos; **PEP carboxilasa**, fosfoenolpiruvato carboxilasa; **2-OG**, 2-oxoglutarato; **GS**, glutamina sintetasa; **GOGAT**, glutamato sintasa. (Modificado de Flores & Herrero, 2005).

1.4.8.1 Cianoficina

La cianoficina es un polipéptido que consiste en aspartato y residuos de arginina que sólo se encuentra en cianobacterias donde sirve como una reserva de nitrógeno presente en los heterocistos (Figura 1.2).

La cianoficina normalmente se acumula durante la fase estacionaria inducida por una falta de nutrientes aparte del nitrógeno, y desaparece cuando el crecimiento se equilibra (Allen, 1984; Simón, 1987) también se acumula cuando las células carentes o repletas de nitrógeno tienen acceso a una fuente de nitrógeno utilizable (Allen & Hutchison, 1980; Lawry & Simon, 1982).

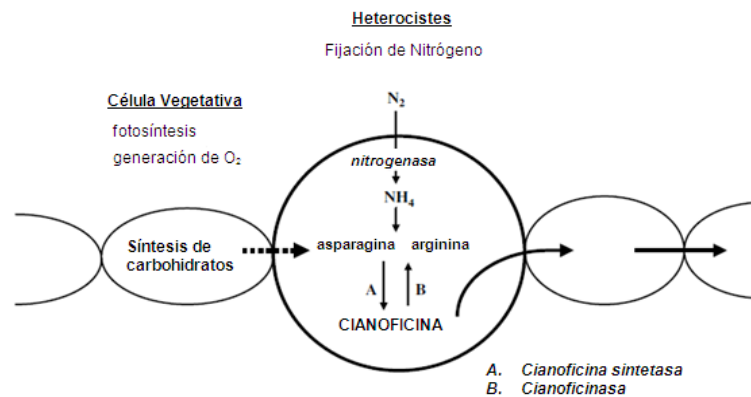


Figura 1.2 Rol de los heterocistos en la fijación de nitrógeno y en la formación de cianoficina, modificado de Lawry & Simon, 1982.

En células carentes de nitrógeno a las que se les proporcionó una fuente nitrogenada, la cianoficina aumentó temporalmente y el crecimiento no recomenzó hasta que la cianoficina se degradó de nuevo (Allen & Hutchison, 1980). Esto demostró que la cianoficina tiene un metabolismo dinámico bajo algunas condiciones y simplemente no se metaboliza durante el exponencial a la transición de la fase estacionaria.

La cianoficina tiene un metabolismo dinámico durante las transiciones entre los estados metabólicos de deficiencia de nitrógeno, la reposición de nitrógeno y viceversa. En estudios realizados con *A. cylindrica* o *Synechocystis*

6308 se sugieren que la cianoficina sirve como un reservorio dinámico que separa la disponibilidad de nitrógeno ambiental del nitrógeno fijado por la demanda metabólica celular, que proporciona un mecanismo que permite a las cianobacterias maximizar su cuota de nitrógeno fijo disponible. Esto daría a las cianobacterias una ventaja competitiva sobre otros organismos (Mackerras, 1990).

1.4.9 Influencia de la luz en el crecimiento de cianobacterias.

Al tratarse de microorganismos fotoautótrofos, la luz que se suministre a un cultivo de microalgas ya sea a escala de laboratorio o de campo es un factor determinante a considerar.

Se conoce que la intensidad de la luz tiene un efecto proporcional en el crecimiento de las microalgas como prueban los estudios realizados por López-Muñoz *et al.*, 1990. En *P. tricornutum*, igualmente en los estudios presentados por Allen y Aron (1955), se indica que bajo buenas condiciones de nutrientes minerales y con un adecuado suministro de N₂ y CO₂, *Anabaena* puede crecer bien a elevadas intensidades luminosas, y la producción celular se incrementa con intensidades luminosas más altas, hasta los 16 Kluxes.

La cuestión que se discute es más bien si las microalgas bajo condiciones de laboratorio controladas crecen mejor cuando se les proporciona un periodo luz/oscuridad diario, o si el máximo crecimiento por unidad de tiempo se obtiene cuando las células son iluminadas continuamente. Kaixian, 1993 y Yongmanitchai (1992) han observado mejor crecimiento bajo luz continua que bajo ciclos de luz oscuridad en cultivos discontinuos, tal como los cita Fábregas (1995). No obstante, las máximas tasas de crecimiento bajo iluminación continua no es mucho mayor que la máxima tasa de crecimiento mantenida en el sistema semicontinuo (Fábregas, 1995).

Sin embargo, con respecto a este punto, en Abalde (1995), se explica que las células cultivadas bajo periodos de luz oscuridad muestran características propias para la adaptación a bajas intensidades de luz y mayor

eficiencia en la absorción lumínica, si se comparan con células cultivadas bajo luz continua a la misma intensidad.

Otro dato interesante que se ha descubierto en trabajos donde se ha empleado bajas intensidades lumínicas en cultivos microalgales a nivel de laboratorio, es que las microalgas tienden a incrementar hasta diez veces más la producción de clorofila con el fin de aprovechar de mejor manera la cantidad de luz que reciben, incrementando así, la eficiencia del sistema; sin embargo estas células crecen más lentamente (Dubinsky *et al.*, 1986). Se puede considerar la utilización de diferentes medios tróficos de cultivo para evitar el suministro parcial o total de luz, como se conoce por trabajos realizados con *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (Mannan and Pakrasi, 1993). Se comprobó su crecimiento en completa oscuridad en cultivo heterotrófico, resultando un notable incremento en el contenido de ficobilina y de unidades del fotosistema II (PSII).

Así mismo, cuando se cultivó *Nostoc flageliforme* en medio fototrófico, mixotrófico y heterotrófico, se obtuvo la mayor cantidad de biomasa (1.67 g/L) en el cultivo mixotrófico en donde se utilizó glucosa, esta fuente de carbono cambió la respuesta de las células a la luz. La tasa de fotosíntesis máxima y la tasa de respiración en la oscuridad fueron mayores que en los medios fotoautotróficos y heterotróficos; estos resultados apuntan a que los procesos fotosintéticos en el crecimiento fotoautótrofo y el metabolismo oxidativo de la glucosa en el crecimiento heterótrofo tienen interacción en el crecimiento mixotrófico de las células de *N. flageliforme* (Yu *et al.*, 2008).

1.4.10 Las toxinas procedentes de cianobacterias

Los ensayos nutricionales no son suficientes para evaluar una nueva fuente proteínica, por eso es necesario completar la información con análisis toxicológicos que garanticen su seguridad. Antes de que un producto pueda ser comercializado y recomendado para su consumo es necesario que pase una serie de pruebas toxicológicas minuciosas que comprueben su inocuidad, esto se aplica en especial a fuentes no convencionales de proteínas, tal como es el

caso de las microalgas, en el Anexo A. se indican algunas de las toxinas y sus propiedades, presentes en varios géneros de cianobacterias (Abalde, 1995).

1.4.11 Metabolitos extraídos de cianobacterias con potencial comercial.

Las microalgas pueden ser utilizadas como una fuente de productos de elevado valor agregado tales como pigmentos, exopolisacáridos, ácidos grasos y proteínas. Además, las microalgas son utilizadas en la acuicultura como fuente de proteínas y ácidos grasos para el cultivo de camarones, los cultivos axénicos de microalgas con elevadas densidades pueden ser utilizados para la nutrición de larvas de moluscos (Volkman *et al.*, 1989; Coutteau *et al.*, 1994; Fábregas *et al.*, 1997).

Hoy en día, el mayor consumidor de astaxantina (pigmento), es la industria de alimento para salmón, en los 80 y 90`s se identificó a *Haematococcus* como un organismo que podía ser cultivado como una rica fuente de astaxantina con un mercado prontamente identificado (Lorenz, 2000; Olaizola, 2000; Olaizola 2003).

Se conoce que muchas cianobacterias son capaces de sintetizar una capa externa viscosa y excretar, al medio de cultivo, material polisacárido durante el crecimiento celular. Los polisacáridos, fácilmente recuperables del medio de cultivo, están atrayendo mucho interés, en vista de sus posibles usos en varias aplicaciones industriales. En términos de la producción de diferentes polisacáridos, la respuesta de las cianobacterias a los cambios de las condiciones de cultivo, parecen ser dependientes de la cepa utilizada (De Philippis y Vincenzini, 1998).

Recientemente, las cianobacterias se han vuelto una fuente atractiva de clases innovadoras de compuestos farmacológicamente activos mostrando actividades biológicas que van desde los antibióticos, inmunosupresores, anticancerígenos, antivirales, antiinflamatorios hasta agentes inhibitorios de proteinasas.

1.4.12 Las cianobacterias en la industria

Las microalgas son una fuente rica potencialmente de una vasta lista de productos químicos, con aplicaciones en la industria alimenticia, cosmética, farmacéutica y hasta la industria de los combustibles (Olaizola, 2003).

En la universidad de Hawaii, se trabaja en el desarrollo de nuevos fármacos a partir de una colección de cerca de dos mil cepas de cianobacterias con una producción de más de cien moléculas bioactivas (Olaizola, 2003). Se considera que las cianobacterias son una fuente rica de metabolitos de gran importancia desde un punto de vista biotecnológico e industrial. Algunos de estos metabolitos secundarios exhiben efectos tóxicos en los organismos vivientes. Un diverso rango de estas cianotoxinas desempeñan papeles ecológicos como aleloquímicos y podrían emplearse para el desarrollo comercial de compuestos con aplicaciones tales como alguicidas, herbicidas e insecticidas (Rajesh *et al.*, 2009).

Las cianobacterias tienen la capacidad de superar la toxicidad de la radiación ultravioleta (UVR) por medio de sus compuestos de absorción UV, como aquellos del tipo de los aminoácidos micosporina y sytonemina (Rajesh *et al.*, 2009). Éstos metabolitos secundarios son considerados 'multiuso' y fotoreactantes naturales. En este sentido, ellos pueden ser biotecnológicamente aprovechados por la industria cosmética, agrícola y farmacéutica; sin embargo, el desarrollo de los sistemas de producción microalgal requiere de la solución de muchos problemas fisiológicos y de bioingeniería (Rajesh *et al.*, 2009; Abalde, 1995).

1.4.13 Proteínas a partir de microalgas.

Se consideró a la biomasa microalgal como una alternativa para la obtención de proteínas que no fuesen de origen animal o vegetal para que sean consumidas por el ganado o el hombre una vez que concluyó la II Guerra Mundial; antes el interés se centraba en la masificación para la obtención de lípidos (Abalde, 1995). Con sus trabajos Spoehr y Milner (1949) en el Carnegie

Institute mostraron que la composición de *Chlorella*, sobre todo su contenido de grasa y proteína, podía ser manipulada modificando las condiciones de cultivo.

En el mismo trabajo se sugiere que el uso de este tipo de proteínas podría ayudar a evitar en parte la deficiencia proteica global. Se basan en que las microalgas tienen un contenido de proteínas en materia bruta de aproximadamente el 50% y una productividad de 25 Tm/Ha/año.

Durante siglos, en algunas partes del mundo se han utilizado como alimento humano microalgas producidas con una tecnología primitiva, y se han establecido apropiadas tecnologías para la producción a gran escala tanto de microalgas verdes como cianobacterias. *Spirulina máxima* fue empleada por los aztecas en alimentación, en forma de bizcochos que se denominaban “tecuiltatt”, el contenido proteico es asombrosamente alto, llegando al 70% del peso seco (Abalde, 1995; Olaizola, 2003).

Las aplicaciones microalgales en la acuicultura, industria de alimentos, y en aplicaciones químicas y ambientales continúan siendo revisadas (Bhrens, 1999; Benemann, 2002).

1.4.14 Cianobacterias de interés industrial.

1.4.15.1 *Nostoc*.

Este tipo de cianobacteria exhibe propiedades estructurales que son similares a los miembros de *Anabaena*, (los esquemas de este género se indican en el Anexo B) los miembros típicos los hormogonios son rectos; los heterocistos terminales están diferenciados en ambos finales de los hormogonios maduros; subsecuentemente, el desarrollo da lugar al crecimiento de tricomas que contienen heterocistos predominantemente intercalados. La producción de un mucílago o matriz es típica en muchos de sus miembros. Su reproducción ocurre por fisión binaria; con algunas excepciones, los miembros de *Nostoc* están caracterizados por un ciclo de desarrollo.

Espíndola (2009) reporta los cambios en la morfología durante el desarrollo de la cianobacteria con la que trabajó (C15) donde se ve claramente los enrollamientos que presenta con el pasar de los días. La formación de acinetos es siempre de forma equidistante entre dos heterocistos. También se conoce que representantes de *Nostoc* son los más comúnmente encontrados formando parte de asociaciones endo o exo simbióticas con ascomicetes (para formar líquenes); briofitas, pteridofitas, cicadias (Boone and Castenholz, 2001).

1.4.15.2 *Anabaena*

Las especies más representativas pertenecientes a este género, tienen células en forma cilíndrica o de barril (Anexo B), de dimensiones relativamente pequeñas (diámetro de 3 a 6 μm). No se halla una matriz firme pero la producción de mucílago puede ser abundante (Rippka, 2001). El género *Anabaena* se estableció por Bory en 1922. Geitler (1932) en su Tratado de Taxonomía Algal de las verde azules describió 57 especies europeas de *Anabaena*, mientras Desikachary (1959) designó 25 especies. En la más reciente clasificación, el género *Anabaena* ha sido clasificado bajo la subdivisión de la familia IV, pero ciertas cepas muestran un alto grado de similitud de su ADN-ADN con *Nostoc* y se transfirieron a este género. También, se transfirieron varias especies de *Anabaena* a un nuevo género *Trichormus* (Komárek y Anagnostidis 1989; Rippka *et al.* 2001). A pesar de las características distintivas atribuidas a este género, ciertos caracteres se solapan con *Nostoc*, lo que da énfasis a la necesidad por desarrollar sistemas inequívocos de taxonomía de las cianobacterias basados en el uso de cultivos clonales axénicos, los cuales también son considerados en diversas bases de datos incluyendo atributos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Nayak, 2007).

1.4.15.3 *Chlorogloea*

Las células se disponen irregularmente en un mucílago común, pero a veces formando (particularmente en las partes marginales) filas cortas e irregulares de células, que normalmente se orientan de forma radial (Anexo B); las filas a veces aparecen perpendiculares al sustrato. Las células esféricas u

ovales, en colonias viejas pueden aparecer redondeadas poligonales, con o sin imprecisiones difluyendo, delimitadas por envolturas firmes mucilaginosas con un contenido fino granular de coloración azul verdoso, amarillento, rojizo, grisáceo o pálido (Komárek & Anagnostidis, 1998).

La capacidad para fijar nitrógeno entre las algas verde azules parecía invariablemente estar asociada con la habilidad de formar el heterocistos, los mismos que no son producidos por algas verde azules unicelulares, con la excepción de *Chlorogloea fritschii*, como ya ha sido reportado en otros estudios (Whitton, 1967; Fay, 1965) un organismo cuya asignación a las Chroococcales es polémico (Fay, 1964a,b).

Se han tenido reportes en *Chlorogloeopsis (Chlorogloea) fritschii*. Que al igual que otras cianobacterias, puede existir en más de una forma morfológicamente reconocible, los dos principales ejemplos son una forma filamentosa y una forma aseriada con grupos irregulares de células (Evans *et al.*, 1976).

1.5 Sistema de hipótesis.

Las tres cianobacterias procedentes de la filósfera de bosques nativos de *Polylepis pauta* presentan diferentes patrones de crecimiento y producción de proteínas totales frente a diferentes concentraciones de nitrato de sodio, intensidades lumínicas y medio de cultivo.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes.

Con el financiamiento de la Escuela Politécnica del Ejército se ejecutó el proyecto “Aislamiento, purificación y caracterización de cianobacterias procedentes de bosques nativos de *Polylepis pauta* para su aplicación en reforestación, recuperación de suelos y extracción de metabolitos primarios y secundarios (2007-2008)”; siendo esta tesis parte de este proyecto en el Centro de Investigaciones Científicas de la ESPE; donde se llevaron a cabo los ensayos.

En el Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Facultad de Ciencias de la Universidad del Zulia en la ciudad de Maracaibo Venezuela se desarrolló parte de la identificación mediante clave microscópica.

Como directora de tesis y del proyecto, del que este trabajo forma parte está la Lic. Biol. Alma Koch MSc., de igual manera se contó con el aporte de la Dra. Blanca Naranjo, co-directora de la tesis.

El Dr. Ever Morales, jefe del laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Facultad de Ciencias de la Universidad del Zulia, el Lic. Néstor Rosales MSc. aportaron en la caracterización mediante clave microscópica de las cianobacterias estudiadas.

El Dr. Alexis Debut, docente de la carrera de biotecnología colaboró con sus conocimientos en microscopía electrónica que se utilizaron para la caracterización de las tres cinaobacterias de este estudio.

La Srta. Saskia Carrera proporcionó su colaboración en calidad de pasante en la ejecución de la presente tesis.

2.2 Zona de estudio

Las cianobacterias que se utilizaron en este trabajo de tesis se aislaron de las hojas de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta, zona localizada en la provincia de Napo, Ecuador.

Los estudios de laboratorio se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Escuela Politécnica del Ejército campus Sangolquí, Pichincha, Ecuador y en el laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Facultad de Ciencias de la Universidad del Zulia en la ciudad de Maracaibo Venezuela.

2.3 Período del Tiempo de Investigación

El presente tuvo una duración de 11 meses.

2.4 Diseño

2.4.1 Identificación mediante clave microscópica, determinación de la concentración de proteína total y cinética de crecimiento.

Los resultados que se reportan en este trabajo son de tipo cualitativo para la identificación mediante clave microscópica y cuantitativo para la determinación de proteína total así como para las curvas de cinética de crecimiento, para las tres cianobacterias.

2.4.2 Diseño Experimental Utilizado

Tanto para la determinación de proteína total como para las curvas de cinética de crecimiento se utilizó un arreglo con 4 factores AxBxCxD para cada una de las cianobacterias dispuesto en un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los factores con sus respectivos niveles se indican en la Tabla 2.1.

Para cada una de las tres cianobacterias se aplicó el mismo diseño experimental.

Tabla 2.1 Diseño Experimental propuesto para cada cianobacteria.

| Factores | | Niveles | N |
|-------------------------------------|---|-------------------|-----|
| Nitrato de Sodio, en milimoles | 1 | 0 mM | 162 |
| | 2 | 4 mM | 162 |
| | 3 | 8 mM | 162 |
| Irradiancia, en kluxes (1000 luxes) | 1 | 5 kluxes | 162 |
| | 2 | 8 kluxes | 162 |
| | 3 | 11 kluxes | 162 |
| Medio de Cultivo | 1 | BG11 | 243 |
| | 2 | Agua de Vertiente | 243 |
| Tiempo en días | 1 | Día 6 | 54 |
| | 2 | Día 9 | 54 |
| | 3 | Día 12 | 54 |
| | 4 | Día 15 | 54 |
| | 5 | Día 18 | 54 |
| | 6 | Día 21 | 54 |
| | 7 | Día 24 | 54 |
| | 8 | Día 27 | 54 |
| | 9 | Día 30 | 54 |

Se determinó la diferencia entre tratamientos del modelo factorial para el crecimiento y la producción de proteínas de cada cianobacteria los cuales se organizaron con la combinación de los niveles de cada factor. Las lecturas se tomaron a partir del sexto día cada tres días durante treinta días.

El análisis de los resultados de esta investigación se realizó con el programa SPSS 15.0. Se llevaron a cabo análisis de varianzas, comparaciones entre tratamientos con gráficas de perfil además de la estadística descriptiva. El análisis de significancia y el establecimiento de rangos se realizaron mediante el método de Tukey con una significancia del 5%.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Caracterización mediante clave microscópica.

Se tomaron del cepario del laboratorio de Microbiología de la ESPE las tres cianobacterias de interés (Figura 2.3) y se procedió a subcultivarlas en medio BG11 líquido y sólido, se utilizó medio normal y sin nitrato de sodio hasta obtener biomasa suficiente para su observación.

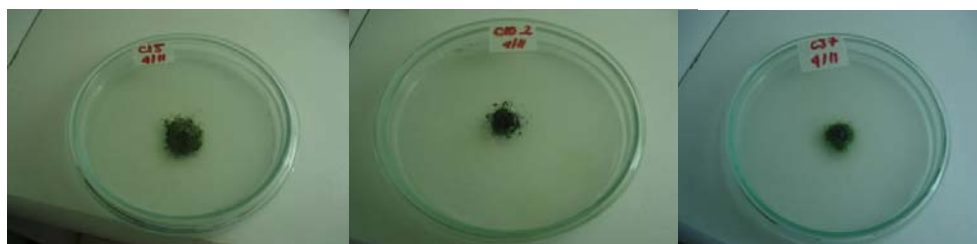


Figura 2.1 Cianobacterias utilizadas para la tesis en medio BG11 sin nitrato de sodio codificadas en el cepario: **a.** C10; **b.** C15; **c.** C37.

Obtenida la cantidad suficiente de biomasa (Figura 2.4) se realizaron observaciones periódicas del aspecto de las macrocolonias, de los cultivos tanto en medio líquido como sólido. Para la observación microscópica se utilizó un microscopio cabezal trinocular marca Olympus modelo CX-31, las placas se prepararon directamente del medio de cultivo de forma periódica y se registraron las características sobresalientes en una base de fotomicrografías que sirvió para la selección de las imágenes más representativas. Mediante las claves del manual de Bergey's, Desickachary, 1959; Komarek y Anagnóstidis, 1989, se establecieron las particularidades de cada una de las cianobacterias y se les asignó a diferentes géneros.

La identificación de estos géneros se basó en las características morfológicas tales como la morfología de los filamentos, células vegetativas, presencia de heterocistos y acinetos, la forma de la colonia, forma de las células terminales, presencia de matriz mucilaginosa, así como el ciclo de vida

como característica adicional para la identificación de las cianobacterias dentro de cada género según las claves mencionadas



Figura 2.2 Subcultivos en medio BG11 sólido y líquido, y masificación por escalamiento de las tres cianobacterias.

2.5.1.1 Determinación cualitativa de la envoltura celular.

Se preparó placas con alícuotas de las tres cianobacterias cultivadas en medio BG11 sin nitrato de sodio (medio diferencial) y se les fijó con azul de Alcian para observar la matriz mucilaginosa como se describe en Reddy *et al.*, (1996).

2.5.1.2 Microscopía electrónica de barrido

Para la observación mediante microscopía electrónica de barrido se siguió el procedimiento descrito por Bozzola (2007), y modificado de acuerdo a las condiciones del laboratorio por el Dr. Alexis Debut, la colección de muestras se realizó por centrifugación sin homogenización previa.

2.5.2 Condiciones de cultivo y masificación de los tres microorganismos para llevar a cabo la experimentación

Se cultivaron tres cianobacterias aisladas de la filósfera de bosques nativos de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta, del cepario de Microbiología de la ESPE, se las subcultivó y masificó (Figura 2.1) en medio de cultivo BG11 descrito por Rippka *et al.* 1979 (Anexo C) sin nitrato de sodio, a una intensidad de luz de 1000 luxes, aireación constante, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y temperatura ambiente ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) (Koch *et al.*, 2008).



Figura 2.3 Cultivos de las tres cianobacterias en medio BG11 sin nitrato de sodio en medio líquido.

Se mantuvo a los microorganismos bajo las condiciones indicadas hasta alcanzar suficiente biomasa para inocular en los frascos a utilizar es decir, un aproximado de $5 \cdot 10^6$ cel/mL. Las unidades experimentales fueron frascos de vidrio claro de 500 mL con 400 mL de medio de cultivo estéril BG11 y agua de vertiente con una composición de minerales natural (Anexo D) con tres concentraciones de nitrato de sodio (0, 4 y 8 mM,), ajustado a pH 7.8 Se agitó y aireó el medio de cultivo mediante la inyección de aire comprimido.

2.5.3.1 Disposición de las unidades experimentales

Para la determinación de la concentración de nitrato de sodio, irradiancia y medio de cultivo óptimos para el crecimiento y producción de

proteína total de las tres cianobacterias, se utilizó una cámara de cultivo (Figura 2.2) construida específicamente para suministrar aireación y la cantidad de luz establecidas; mediante iluminación con un panel de luz fluorescente a tres intensidades de luz: 5000, 8000 y 11000 luxes, fotoperiodo unilateral de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y temperatura ambiente ($28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) en donde se colocaron las unidades experimentales por triplicado, los frascos se dispusieron en hileras de seis unidades en la cámara de cultivo de acuerdo a la intensidad de luz que se requeridas por los tratamientos.

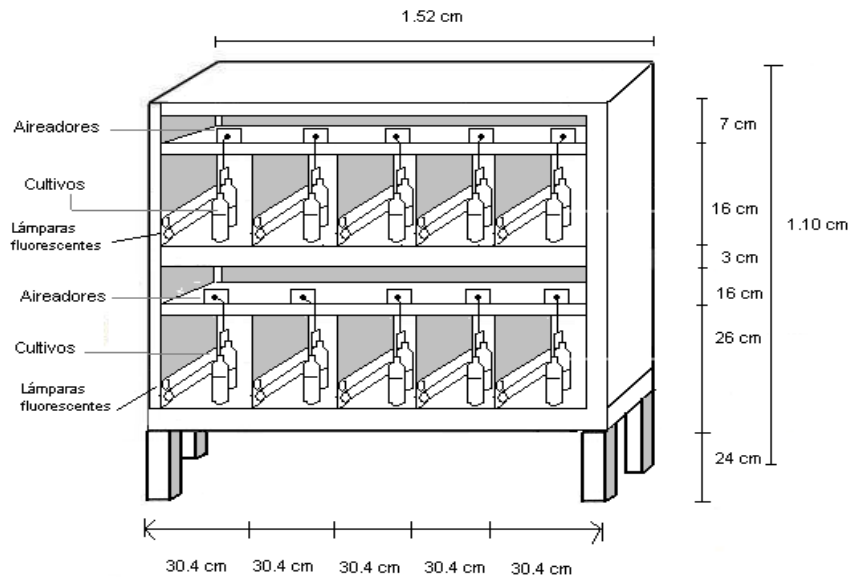


Figura 2.4 Cámara de cultivo (Chico, 2009).

2.5.5 Análisis de Biomasa

A partir de los datos tomados para el crecimiento de cada una de las tres cianobacterias mediante turbidez y recuento celular, se estableció un modelo de cuantificación de células por mililitro, mediante la correlación de los dos grupos de datos (Anexo E). A partir de los datos de concentración celular obtenidos, se procedió al análisis estadístico con relación a la biomasa (cel/mL) obtenida a lo largo de la medición.

2.5.5.1 Cinética de crecimiento mediante turbidez

El crecimiento de las tres cianobacterias se cuantificó mediante espectrofotometría en un equipo Genesys 10UV Scanning Thermo Scientific a una longitud de onda de 750 nm cada 3 días (Pattnaik *et al.*, 1978; Loreto *et al.*, 2003). Previa homogenización del medio de cultivo de cada unidad experimental, se tomó 2 mL del medio de cultivo en un eppendorf limpio y se midió la absorbancia.

2.5.5.2 Recuento Celular

Se determinó el número de células/mL mediante conteo directo en cámara de Neubauer (Marienfeld 0,1mm x 0,0025 mm²) con un microscopio cabezal trinocular marca Olympus modelo CX-31. Con la misma muestra utilizada para medir la turbidez, se llenó la cámara a una velocidad homogénea, evitando una mala distribución de las células en la preparación y la formación de burbujas. Para las muestras muy concentradas se utilizó un factor de dilución. Se realizó el conteo de las células en la cuadrícula de 25 cuadrados, para calcular las células. mL⁻¹, se utilizó la fórmula:

$\text{Cel.mL}^{-1} = C \times 10^4 \times \text{fd}$. (C= Promedio de células contadas en la cuadrícula de 25 cuadrados, fd= Factor de dilución) como se describe en Mundt *et al.* (2001) y Loreto (2003).

2.5.2.4 Cuantificación de proteína.

2.5.2.4.1 Elaboración de una curva estándar

Para la cuantificación de las proteínas se utilizó como estándar una solución de seroalbúmina bovina (BSA). A partir de una concentración de 1 mg mL⁻¹, se prepararon diferentes concentraciones. Se tomaron diez tubos de vidrio en los que se colocaron distintas cantidades de solución de BSA y luego se llevaron los tubos al mismo volumen final con agua destilada. Siguiendo el protocolo de cuantificación de proteínas de Lowry (1951) se obtuvo la curva patrón. Los resultados obtenidos de las absorbancias se ajustaron por mínimos cuadrados a una ecuación de segundo grado, las concentraciones utilizadas en

la elaboración de la curva estándar fueron 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 500, 800 $\mu\text{g/mL}$ de BSA.

2.5.6 Determinación de la concentración de Proteína.

Mediante el método de Lowry (1951) modificado por Herbert *et al.* (1971), se determinó la concentración de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) cada tres días. Se congeló 2 mL del medio de cultivo con la biomasa a -10°C , se añadió 2 mL de NaOH 1N y luego a baño María durante una hora a una temperatura de 95 a 100°C . Las muestras frías se clarificaron por centrifugación a 12000 rpm durante 4 min 0,3 mL del sobrenadante se colocó en cada microtubo con tapa rosca, con 1,5 mL de la Solución 1.

La solución 1 estuvo compuesta de carbonato de sodio (5%) preparado con hidróxido de sodio (0,1 N) y sulfato de cobre (II) pentahidratado (0.5%) con tartrato de potasio (1%), en una relación 25:1 Los microtubos fueron agitados en el vórtex durante 10 s y luego de 10 min se agregó 0,15 mL de una mezcla 50:50 v/v de reactivo Folin-Ciocalteau 2N (Sigma) con agua destilada, se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente y se midió las absorbancias en el espectrofotómetro Thermocientific Genesis 10 UV Scannig a una longitud de onda de 750 nm (DO_{750}). Los valores de proteínas se calcularon por interpolación en la curva estándar.

2.6 Análisis de Datos.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el software estadístico SPSS versión 15.0 para el diseño experimental propuesto, se aplicó pruebas de Tukey con el 95% de confianza para las variables independientes.

Se aplicó la prueba de Levene para contrastar la hipótesis de que los grupos definidos por los factores que son objeto de este estudio en cada una de las tres cianobacterias, proceden de poblaciones con la misma varianza (Anexo F) y considerando la robustez de la prueba ANOVA, se dio paso a considerar los resultados que originó.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Caracterización mediante clave microscópica.

A partir de los cultivos en el medio diferencial líquido se pudo observar la formación de flóculos de las tres cianobacterias (Figura 3.1).

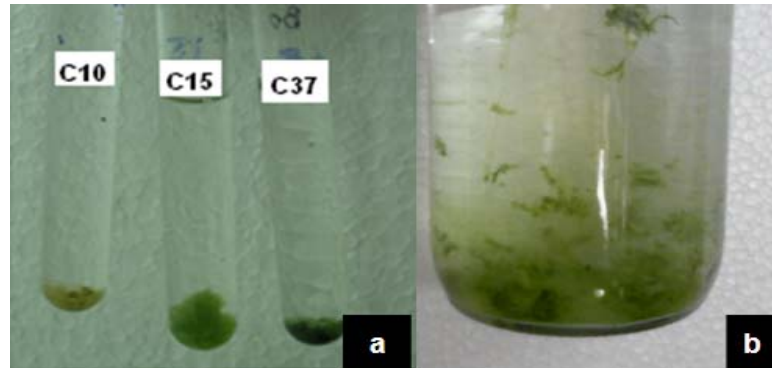


Figura 3.1 Formación de flóculos en medio BG11 sin nitrato de sodio.

a. Las tres cianobacterias en tubos de escalado **b.** Apariencia de los flóculos en las unidades experimentales.

En medio sólido (Figura 3.2) se aprecia diferentes aspectos de las colonias de cianobacterias, C10 con un color verde pardo y colonias irregulares, C15 presenta colonias verde oliva amarillenta que se expanden homogéneamente en toda la superficie del agar, C37 muestra colonias esféricas verrugosas que se denotan dentro un contorno color verde pálido.

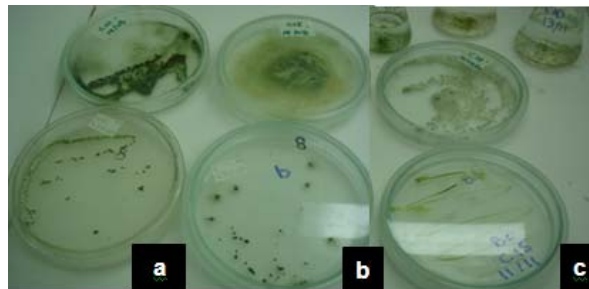


Figura 3.2 Crecimiento de las cianobacterias en medio sólido, en la parte superior en BG11 sin nitrato de sodio. En la parte inferior en medio BG11 normal. **a.** C10 **b.** C15 **c.** C37

Cuando se cultivó las tres cianobacterias en medio BG11 con nitrato de sodio a una concentración 4mM se observó crecimiento de células independientes con escasos heterocistos (Fig. 3.3). La coloración del medio es de un verde intenso bastante homogéneo.

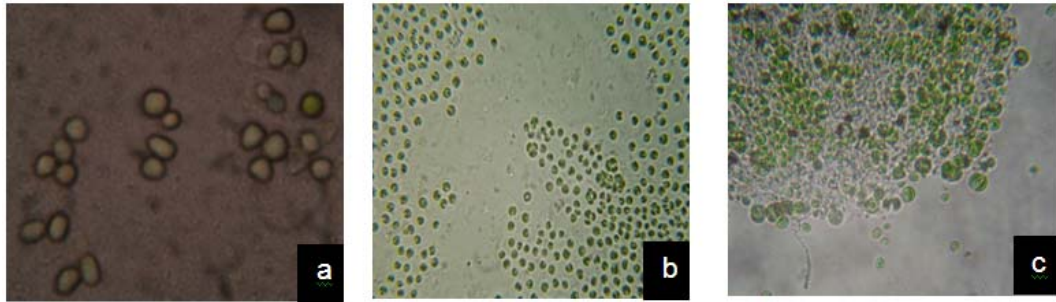


Figura 3.3 Vista al microscopio óptico de las tres cianobacterias cultivadas en medio líquido BG11 con nitrato de Sodio con el lente de 40x. **a.** C10; **b.** C15; **c.**C37

3.1.1 Determinación cualitativa de la envoltura celular.

Además se realizaron placas de las tres cianobacterias cultivadas en BG11 sin nitrato de sodio utilizando la técnica de tinción con azul de Alcian que reacciona con los polisacáridos ácidos, propios de cianobacterias (Reddy *et al.*, 1996), En C10 se resaltó la presencia y espesura de la capa mucilaginosa (Figura 3.4).

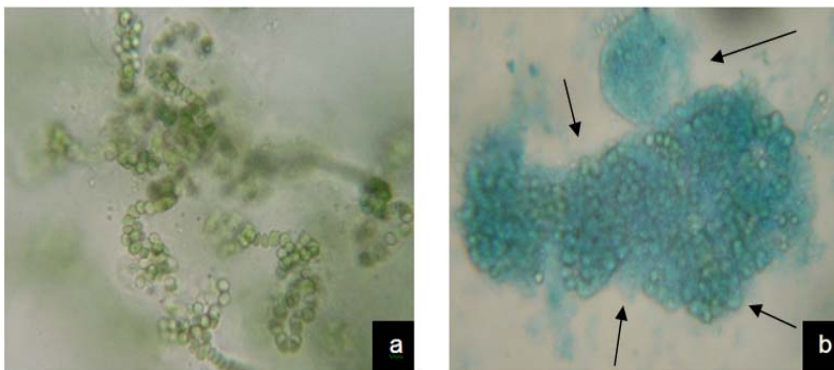


Figura 3.4 a. Vista de C10 bajo el lente 40x. **a.** Placa de C10 sin tinción **b.** C10 con su envoltura celular teñida con azul de alcian las flechas indican la envoltura mucilaginosa.

Las colonias en C10 se encontraron formando una masa gelatinosa grande que contenía microcolonias de color verde oliva pálido

Para C15 la matriz mucilaginosa que envuelve a los tallos se hace visible únicamente después de la tinción con el colorante, en condiciones normales solo se distingue en la periferia (Figura 3.5)

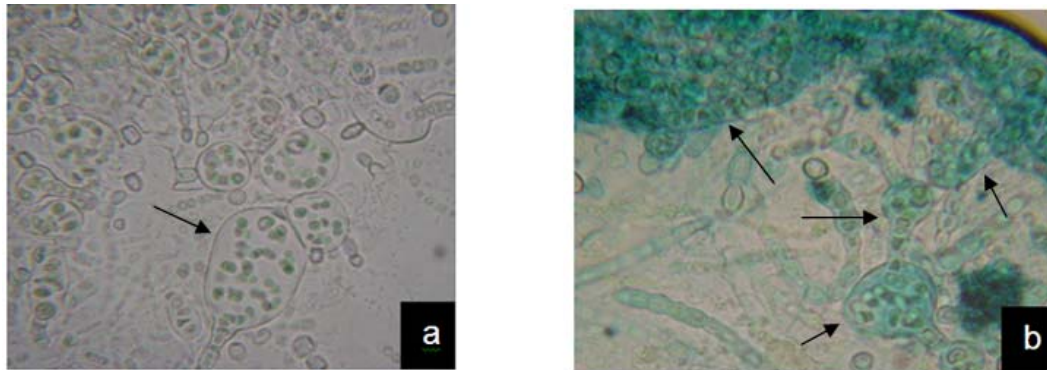


Figura 3.5 Vista de C15 bajo el lente 40x **a.** Placa de C10 sin tinción **b.** C15 con su envoltura celular teñida con azul de alcian las flechas indican la envoltura mucilaginosa.

En C37, se comprobó que la matriz mucilaginosa es difluente y se halla incrustada entre los tricomas, este tipo de matriz o envoltura sirvió como referente para su aproximación taxonómica (Fig.3.6).

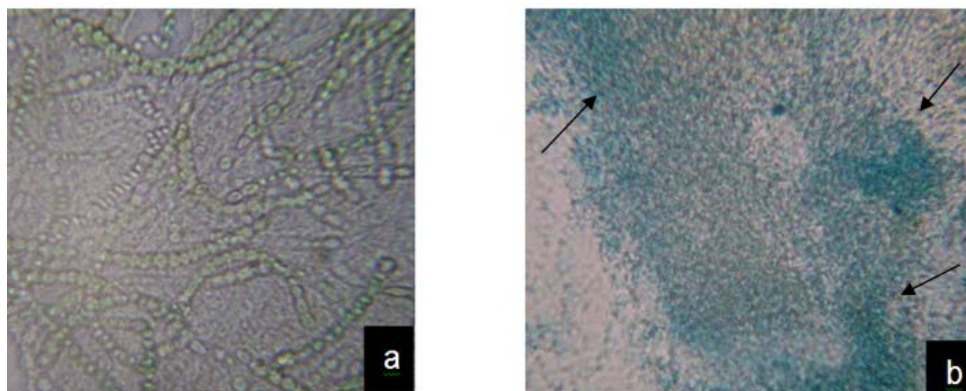


Figura 3.6 Vista de C37 bajo el lente 40x **a.** Placa de C37 sin tinción **b.** C3 con su envoltura celular teñida con azul de alcian las flechas indican la envoltura mucilaginosa.

3.1.2 Observación cianobacteria C10.

Se apreciaron colonias multicelulares, mucilaginosas en el contorno, más o menos esféricas, homogéneas, desinfladas, granulares compuestas de subcolonias microscópicas, en las partes marginales presenta filas cortas e irregulares de células de color verde azulado.

Obviamente los heterocistes fueron vistos solamente en cultivos con medio carente de nitrato de sodio, se notó un incremento en número durante el desarrollo de los cultivos, cabe subrayar que este cultivo desarrolló etapas pseudofilamentosas y de células libres agrupadas (Fig.3.7), siendo muy variable en ambas, la etapa pseudofilamentosa se notó relativamente rápido, en los primeros días de crecimiento.

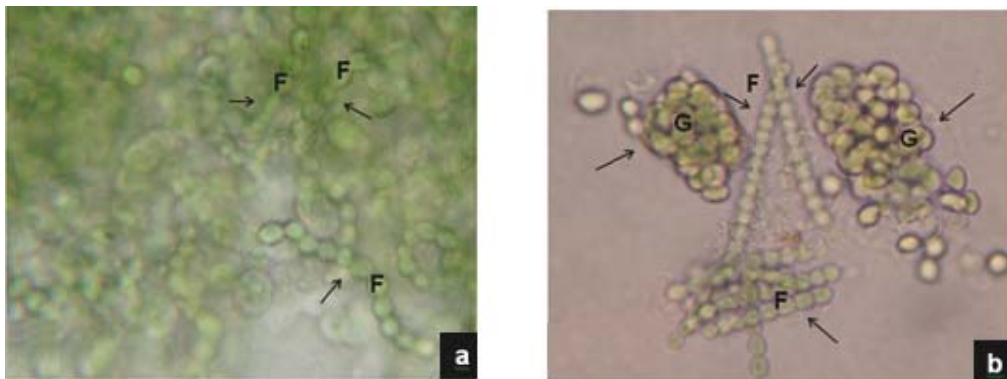
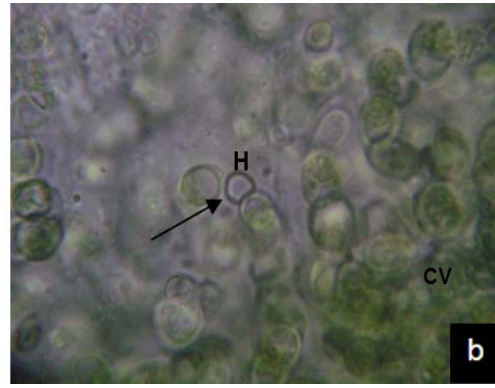
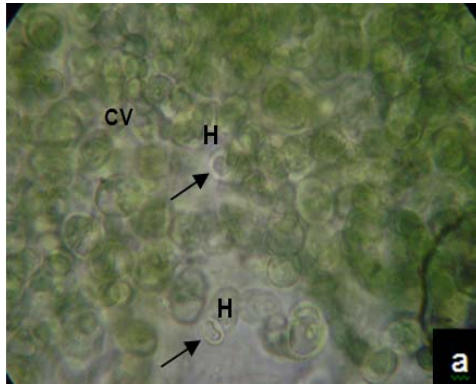


Figura 3.7 Células vegetativas de C10 bajo el lente 40x. **a.** Se observan pseudofilamentos (F) en medio de la envoltura mucilaginosa. **b.** Presencia de células libres agrupadas (G) en el día 20.

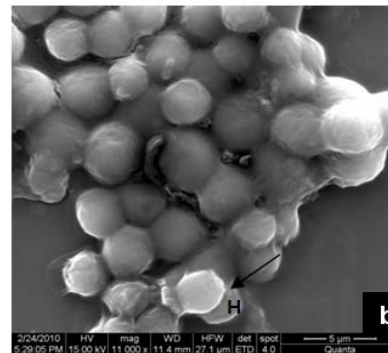
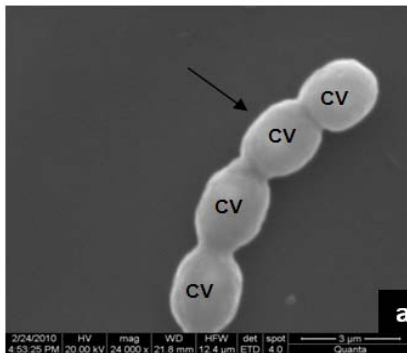
Los heterocistos casi siempre son más pequeños que las otras células de los alrededores, aparentemente no incrementan mucho su tamaño luego de la diferenciación mientras las otras células se vuelven más largas y anchas, además su pared celular es evidentemente más gruesa, de complicada localización por volverse incoloros a medida que avanzaba la edad del cultivo. Los heterocistos aparecen con más frecuencia en la parte externa de los grupos de células que en el interior (Figura 3.8).



Fotografías captadas en colaboración con el Dr. Ever Morales

Figura 3.8 Cianobacteria C10 bajo el lente de 40x. Los heterocistos se señalan con flechas encerrados en círculos. **a.** Presencia de heterocistos (H) en medio de la colonia formada por células vegetativas CV **b.** en el centro de la imagen un heterociste, se diferencia del resto de células de los alrededores por su pared celular más gruesa.

Al microscopio electrónico se obtuvieron micrografías que permitieron obtener las medidas específicas del diámetro de las células vegetativas (2,25 μm), en la Figura 3.9 se observan las variaciones en la morfología de C10, formas pseudofilamentosas, y agrupaciones irregulares de grupos celulares, en la periferia de la parte inferior una célula diferente al resto, probablemente un heterocisto.



Fotografías: Dr. Alexis Debut.

Figura 3.9 Micrografías electrónicas de la cianobacteria C10. **a.** El extremo de un pseudofilamento con cuatro células vegetativas (CV) ovaladas de 2,25 μm de largo a una magnificación X 24000. **b.** Una colonia de células, en la parte inferior del centro resalta un heterocisto (H), a una magnificación x 11000.

3.1.3 Observación cianobacteria C15.

Filamentos agrupados en tallos ligeramente enredados envueltos en una matriz delicada y mucilaginosa ligeramente difluente con heterocistos terminales en ambos extremos de la cadena de células vegetativas ovoides, de coloración verde oliva. Los tallos son subglobosos y flexibles, y su conformación interna densamente enredada le da una estructura que los mantiene firmes y a los filamentos inmóviles (Figura 3.10).

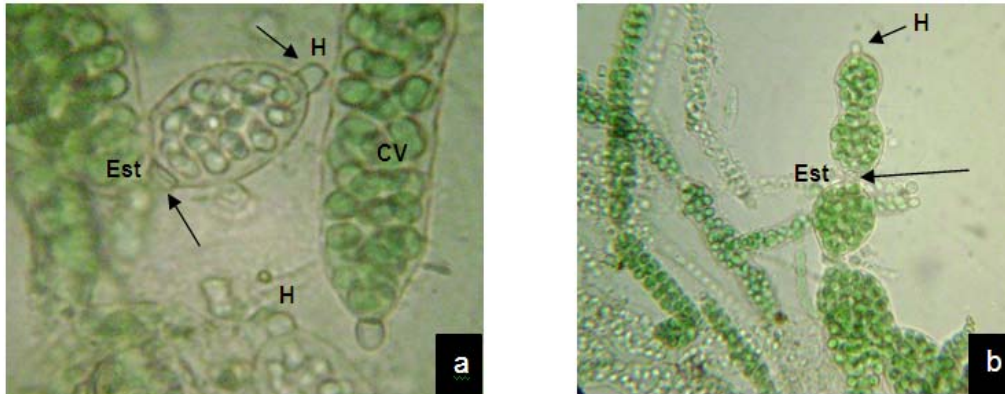


Figura 3.10 Cianobacteria C15. **a.** Imagen bajo el lente de 100x heterocistos (H) en un extremo del tallo globoso que contiene células vegetativas CV y con una estrangulación (Est.) en el otro extremo **b.** Bajo el lente 40x formas globosas intercaladas con estrangulamientos y heterocistos, en el extremo del tallo.

Nostoc tiene un ciclo de vida especial, durante el cual se presentan varias formas con características particulares. Lo que se hizo evidente en C15 y permitió establecer contrastes con *Anabaena*. Los hormogonios se desarrollaron en una fase específica del ciclo de vida (Figura 3.11) en hileras cortas de células (no sobrepasan 15 células vegetativas).

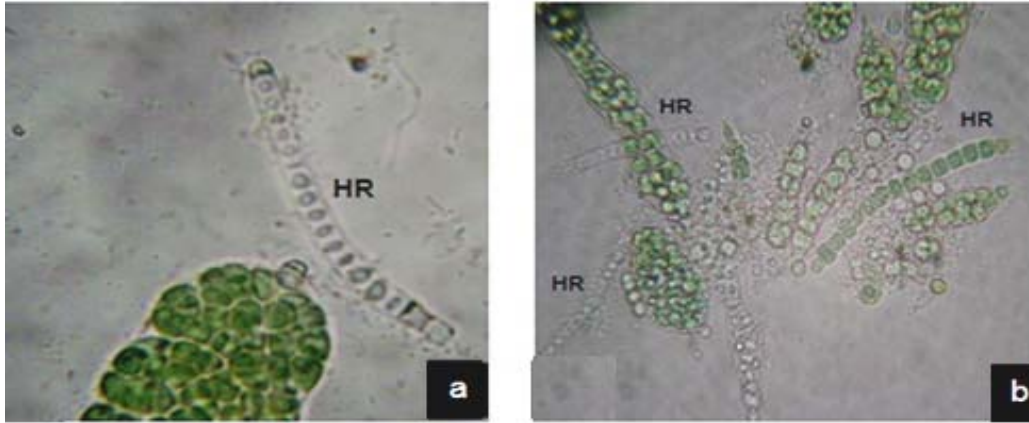


Figura 3.11 Hormogonios de C15 **a.** Bajo el lente 40x, un hormogonio ligeramente curvado de C15, con un heterociste en el extremo, en la parte de abajo un tallo formado por un grupo enredado de células vegetativas envueltas en una matriz. **b.** Bajo el lente de 20x varios hormogonios combinados con tallos globosos.

La micrografía (Figura 3.12) reflejó la estructura tridimensional de una microcolonia celular, se aprecia un filamento enredado y difuso en medio de la envoltura mucilaginosa que lo recubre pareciendo un arreglo globoso desinflado, la turbidez de la masa celular indicó el volumen de la matriz que la contenía.

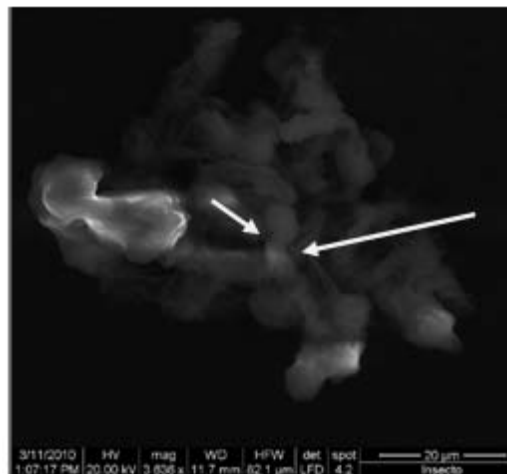


Figura 3.12 Micrografía electrónica de C15 a una magnificación de 3636 X. Se ve una parte del tallo globoso tridimensional, destaca un filamento de 30 µm en medio de una matriz mucilaginosa espesa.

3.1.4 Observación de la cianobacteria C37.

En C37, se aprecian filamentos flexibles de color opaco, curvados y enredados; la matriz es generalmente difluente, de células hendidas de forma de barril; los heterocistos se hacen evidentes en ambos lados de los hormogonios anteceditos de notorias contracciones, los hormogonios maduros se ven de forma intercalada y metamérica; los acinetos aparecen entre la mitad del intervalo heterocístico (Fig 3.13).

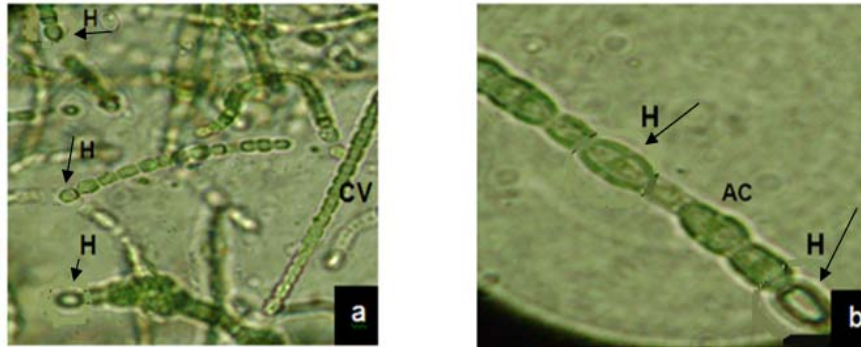


Figura 3.13 Filamentos de C37 **a.** Células Vegetativas (CV), heterocistos (H) bajo el lente 10x. **b.** Acinetos (AC) en el intervalo de los heterocistos (H), bajo el lente de 40X.

C37 presentan vainas alrededor de sus tricomas, pero por lo general sólo visibles en la periferia de la colonia o en colonias jóvenes, de consistencia mucilaginosa, sus tricomas son iso-polares, metaméricos, sus acinetos nacen de forma apoheterocítica, de forma oval un poco más grande que las células vegetativas (Fig. 3.14)

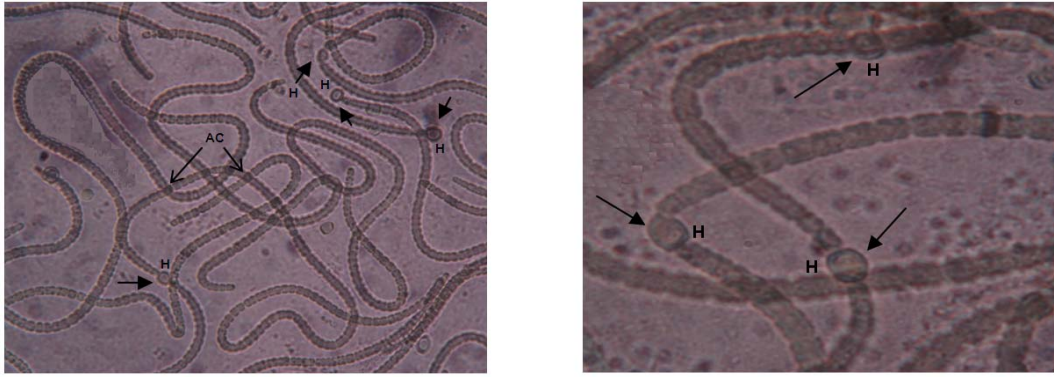


Figura 3.14. Filamentos de C37. **a.** se aprecia bajo el lente 10x la imagen expandida con filamentos ligeramente enredados con heterocistes (H) y acinetos (AC) intercalados. **b.** Bajo el lente 40x se aprecia el tamaño de los heterocistes en relación al resto de células vegetativas.

La micrografía confirmaron la morfología de la cianobacteria C37 (Figura 3.15), con tricomas ligeramente enrollados conformados por células vegetativas de 2 μm de ancho y 3,2 μm de largo de forma de barril, se notó una delicada matriz mucosa recubriendo a los filamentos, en la Figura 3.15 c. se nota la matriz de mucosa difluente que envuelve los filamentos, normalmente hialina pero en concentraciones elevadas de biomasa se apreció capas de constitución babosa que concentra las células de las microcolonias.

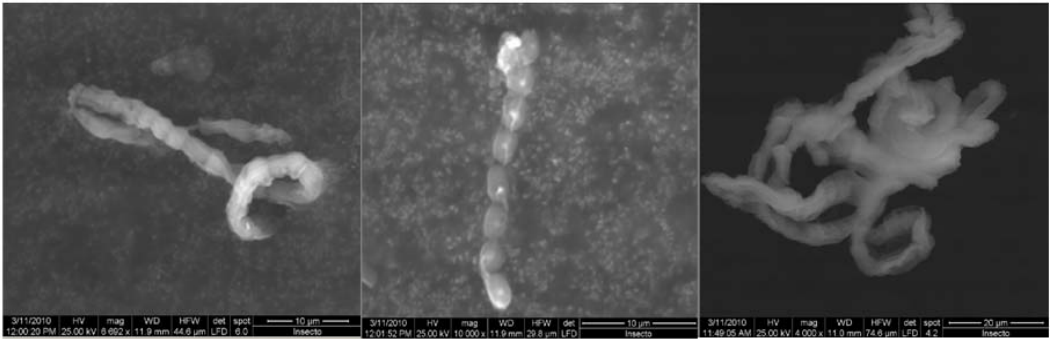


Figura 3.15 Filamentos de C37 y matriz mucilaginosa. **a.** Se aprecia un tricoma ligeramente enrollado cubierto con una delicada matriz de mucílago a una magnificación de 6692 X. **b.** Un hormogonio (8 células vegetativas) en posición lineal probablemente con vacuolas de gas en su interior a una magnificación de 10000 X. **c.** Matriz de mucílago difluente de C37 a una magnificación de 4000X.

Identificadas las características más sobresalientes de las tres cianobacterias, se les asignó a un género determinado (Tabla 3.1) con las claves del manual de Bergey's, Desickachary (1959), Komárek & Anagnostidis (1998) (Ver Anexo G).

Tabla 3.1 Resultados de la identificación de las cianobacterias mediante clave microscópica Chico (2010).

| Codificación de las cianobacterias estudiadas | Género asignado |
|--|------------------------|
| C10 | <i>Chlorogloea</i> |
| C15 | <i>Nostoc</i> |
| C37 | <i>Nostoc</i> |

3.2 Análisis de Biomasa

3.2.1 Cinética de crecimiento de *Chlorogloea* (C10).

La cinética de crecimiento para *Chlorogloea* (C10) a partir del sexto día en medio de cultivo BG11, con una concentración 4mM de nitrato de sodio y a una intensidad luminosa de 8 Kluxes, se indica en la Figura 3.16. Su máxima concentración celular fue un aproximado de 14×10^6 cel /mL en el día 24.

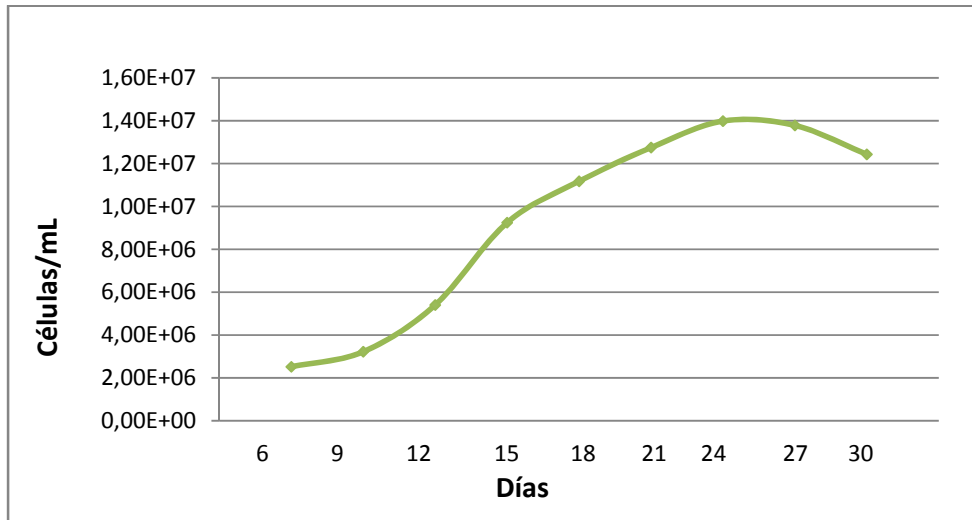


Figura 3.16 Cinética de crecimiento de *Chlorogloea* (C10) en medio BG11 con Nitrato de sodio 4mM.

3.2.2 Análisis estadístico de la concentración celular de *Chlorogloea* (C10).

La concentración celular (cel/mL) alcanzó los promedios más altos cuando se cultivó en medio BG11 en los días 21, 24 y 27, en la gráfica (Figura 3.17) el promedio de la concentración celular (representado en las barras) siguió una tendencia que representa el crecimiento celular; la Tabla 3.3 constata estadísticamente que los factores con mayor significancia fueron: medio de cultivo (medio BG11 y agua de vertiente), Tiempo (en días) y las interacciones entre estos dos.

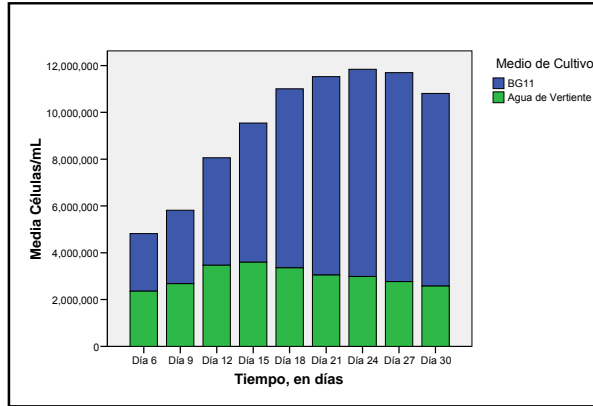


Figura 3.17 Promedio de la producción de biomasa de *Chlorogloea* (C10), en células por mililitro con respecto al tiempo y al medio de cultivo,

En la gráfica de perfil (Figura 3.18), el promedio mayor de la concentración celular fue para la concentración 4 mM de nitrato de sodio en medio BG11, mientras que con agua de vertiente, la media marginal de la concentración celular fue menor.

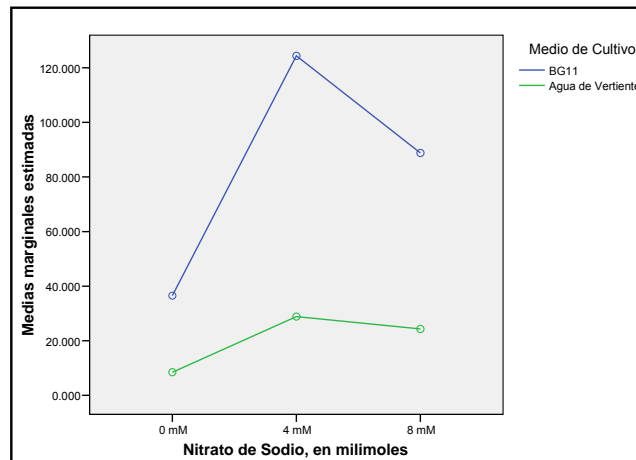


Figura 3.18 Gráfica de perfil para la interacción de los factores: medio de cultivo con nitrato de sodio.

Realizado el análisis de varianza, ANOVA, para el diseño factorial, se concluye que existe significancia para todas las fuentes de variabilidad, con excepción del factor irradiancia, lo que indica que los grupos definidos por esta variable producen células por mililitro significativamente iguales en todos sus niveles, no

así para el resto de variables que inciden significativamente en la concentración de células por mililitro (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Análisis de varianza para la variable células/mL de la cianobacteria *Chlorogloea* (C10).

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|-----------------------------------|----------------------------|-----|------------------|----------|---------------|
| Modelo corregido | 4,24074E+15 ^a | 161 | 2,63E+13 | 173,35 | 0,00 |
| Intersección | 1,09E+16 | 1 | 1,09E+16 | 71530,01 | 0,00 |
| Nitrato | 2,82E+14 | 2 | 1,41E+14 | 927,16 | 0,00 |
| Irradiancia | 3,80E+11 | 2 | 1,90E+11 | 1,25 | 0,29 |
| MCultivo | 1,48E+15 | 1 | 1,48E+15 | 9755,80 | 0,00 |
| Nitrato * Luz | 1,38E+14 | 4 | 3,44E+13 | 226,56 | 0,00 |
| Nitrato * MCultivo | 1,71E+14 | 2 | 8,56E+13 | 563,67 | 0,00 |
| Luz * MCultivo | 1,85E+13 | 2 | 9,25E+12 | 60,85 | 0,00 |
| Nitrato * Luz * MCultivo | 9,83E+13 | 4 | 2,46E+13 | 161,69 | 0,00 |
| Nitrato * Tiempo | 9,75E+13 | 16 | 6,09E+12 | 40,10 | 0,00 |
| Luz * Tiempo | 7,43E+13 | 16 | 4,64E+12 | 30,56 | 0,00 |
| Nitrato * Luz * Tiempo | 1,79E+14 | 32 | 5,58E+12 | 36,75 | 0,00 |
| MCultivo * Tiempo | 6,66E+14 | 8 | 8,33E+13 | 548,03 | 0,00 |
| Nitrato * MCultivo * Tiempo | 6,50E+13 | 16 | 4,06E+12 | 26,73 | 0,00 |
| Luz * MCultivo * Tiempo | 7,58E+13 | 16 | 4,74E+12 | 31,18 | 0,00 |
| Nitrato * Luz * MCultivo * Tiempo | 1,39E+14 | 32 | 4,33E+12 | 28,51 | 0,00 |
| Error | 4,92E+13 | 324 | 1,52E+11 | | |
| Total | 1,52E+16 | 486 | | | |
| Total corregida | 4,29E+15 | 485 | | | |

a R cuadrado = 0,989 (R cuadrado corregida = 0,983)

La prueba de Tukey realizada para el factor Nitrato de sodio (Tabla 3.3) muestra tres subconjuntos de datos, donde el nivel de 4mM tiene el mejor promedio y se sitúa en el primer subconjunto.

Tabla 3.3 Prueba de Tukey para la variable Células/mL del factor Nitrato de sodio (0 mM, 4 mM y 8 mM).

DHS de Tukey^{a,b}

| Nitrato de Sodio, en milimoles | N | Subconjunto | | |
|--------------------------------|-----|-------------|------------|-------------------|
| | | 2 | 3 | 1 |
| 0 mM | 162 | 3675537,04 | 5062592,59 | 5448827,16 |
| 8 mM | 162 | | | |
| 4 mM | 162 | | | |
| Significación | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.^a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 162

Con respecto al factor Tiempo en todos sus niveles, la prueba de Tukey indica que para el día 24, 27 y 21 se tuvieron los promedios más altos de la concentración celular y se ubican en el subconjunto 1 (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Prueba de Tukey para la variable Células/mL del factor Tiempo en días.

DHS de Tukey^{a,b}

| Tiempo, en días | N | Subconjunto | | | | | | |
|-----------------|----|-------------|------------|------------|------------|------------|---|------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 |
| Día 6 | 54 | 2411055,56 | | | | | | |
| Día 9 | 54 | | 2908518,52 | | | | | |
| Día 12 | 54 | | | 4031111,11 | | | | |
| Día 15 | 54 | | | | 4770925,93 | | | |
| Día 30 | 54 | | | | | 5405740,74 | | |
| Día 18 | 54 | | | | | 5502592,59 | | |
| Día 21 | 54 | | | | | | | 5762962,96 |
| Día 27 | 54 | | | | | | | 5848888,89 |
| Día 24 | 54 | | | | | | | 5919074,07 |
| Significación | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,933 | | 0,488 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 54

3.2.3 Cinética Crecimiento de Nostoc (C15).

La cinética de crecimiento para *Nostoc* (C15) a partir del sexto día con medio de cultivo BG11, con una concentración 4mM de nitrato de sodio a una intensidad luminosa de 8 Kluxes se indica en la Figura 3.19 con una concentración celular aproximada de 8×10^6 cel /mL en el día 30.

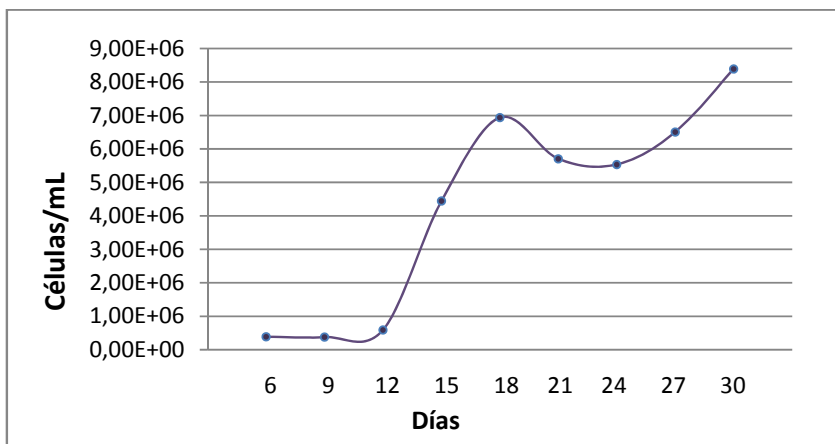


Figura 3.19 Cinética de crecimiento de Nostoc (C15) en medio BG11 con nitrato de sodio 4mM.

3.2.4 Análisis estadístico de la concentración celular de *Nostoc* (C15).

La concentración celular (cel/mL) alcanzó los promedios más altos cuando se cultivó en medio BG11 en el día 30, como se puede observar en la Figura 3.20 en azul medio BG11 y en verde para agua de vertiente.

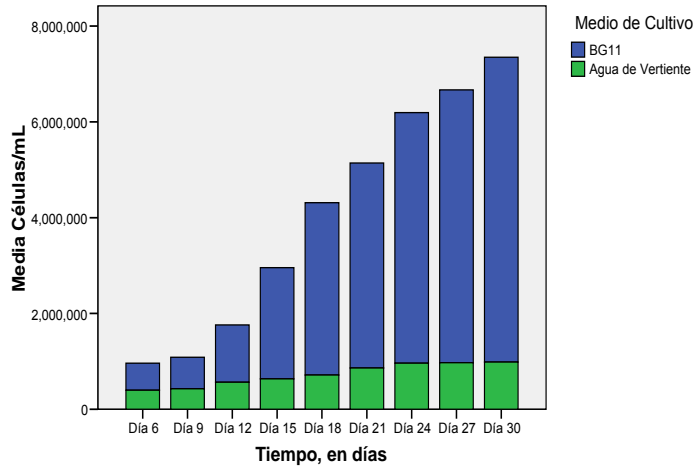


Figura 3.20 Promedio de la producción de biomasa de *Nostoc* (C15) en células por mililitro con respecto al tiempo y al medio de cultivo.

La gráfica de perfil (Figura 3.21), con respecto a los factores nitrato de sodio y medio de cultivo indica el promedio más alto de la concentración celular para la concentración 4 mM de nitrato de sodio en medio BG11, mientras que con agua de vertiente, la media marginal de la concentración celular es menor y el mayor crecimiento celular con nitrato de sodio 8 mM.

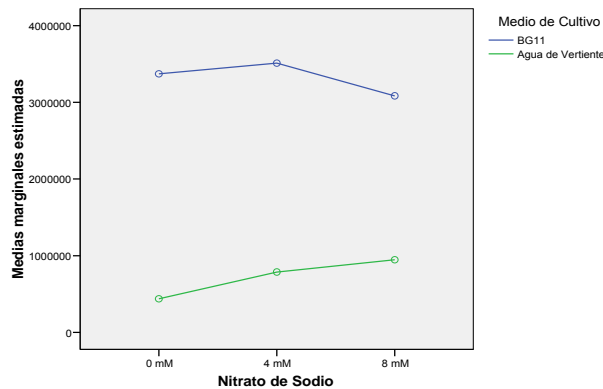


Figura 3.21 Gráfica de Perfil para la interacción de los factores Medio de cultivo con nitrato de sodio.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se observó que para todas las fuentes de variabilidad estudiadas existe significancia estadística, lo que indica que para los grupos definidos por todas las variables, se produjo una concentración de células por mililitro significativamente diferente (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Análisis de varianza para la variable Células/mL de la cianobacteria *Nostoc* (C15).

Variable dependiente: Células/mL

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|-----------------------------------|----------------------------|-----|------------------|-----------------|---------------|
| Modelo corregido | 2,30E+15 ^a | 161 | 1,43E+13 | 24,901 | 0,00 |
| Intersección | 1,99E+15 | 1 | 1,99E+15 | 3473,361 | 0,00 |
| Nitrato | 4,85E+12 | 2 | 2,43E+12 | 4,233 | 0,02 |
| Luz | 1,75E+13 | 2 | 8,77E+12 | 15,296 | 0,00 |
| MCultivo | 8,21E+14 | 1 | 8,21E+14 | 1431,744 | 0,00 |
| Tiempo | 6,53E+14 | 8 | 8,16E+13 | 142,359 | 0,00 |
| Nitrato * Luz | 6,54E+13 | 4 | 1,63E+13 | 28,509 | 0,00 |
| Nitrato * MCultivo | 1,38E+13 | 2 | 6,90E+12 | 12,042 | 0,00 |
| Luz * MCultivo | 2,96E+13 | 2 | 1,48E+13 | 25,787 | 0,00 |
| Nitrato * Luz * MCultivo | 3,76E+13 | 4 | 9,40E+12 | 16,398 | 0,00 |
| Nitrato * Tiempo | 2,01E+13 | 16 | 1,26E+12 | 2,19 | 0,01 |
| Luz * Tiempo | 3,30E+13 | 16 | 2,06E+12 | 3,599 | 0,00 |
| Nitrato * Luz * Tiempo | 5,02E+13 | 32 | 1,57E+12 | 2,738 | 0,00 |
| MCultivo * Tiempo | 4,32E+14 | 8 | 5,41E+13 | 94,302 | 0,00 |
| Nitrato * MCultivo * Tiempo | 3,13E+13 | 16 | 1,96E+12 | 3,418 | 0,00 |
| Luz * MCultivo * Tiempo | 4,22E+13 | 16 | 2,64E+12 | 4,602 | 0,00 |
| Nitrato * Luz * MCultivo * Tiempo | 4,65E+13 | 32 | 1,45E+12 | 2,537 | 0,00 |
| Error | 1,86E+14 | 324 | 5,73E+11 | | |
| Total | 4,47E+15 | 486 | | | |
| Total corregida | 2,48E+15 | 485 | | | |

a R cuadrado = 0,925 (R cuadrado corregida = 0,888)

La prueba de Tukey realizada para el factor nitrato de sodio (Tabla 3.6) muestra dos subconjuntos de datos, donde el nivel de 4mM tiene el mejor promedio y se sitúa en el primer subconjunto compartido con la concentración 8mM, con el que no existe diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 3.6 Prueba de Tukey para la variable Células/mL del factor nitrato de sodio en milimoles.

DHS de Tukey

| Nitrato de Sodio | N | Subconjunto | | |
|------------------|-----|-------------|-------------------|--|
| | 1 | 2 | 1 | |
| 0 mM | 162 | 1905545,74 | | |
| 8 mM | 162 | 2016245,74 | 2016245,74 | |
| 4 mM | 162 | | 2149945,74 | |
| Significación | | 0,387 | 0,252 | |

La prueba de Tukey realizada para el factor irradiancia (Tabla 3.7) muestra tres subconjuntos de datos, donde el nivel de 4Kluxes tiene el mejor promedio de células por mililitro y se sitúa en el primer subconjunto, que le diferencia significativamente de las medias conseguidas con 5Kluxes y 8 Kluxes en el segundo y tercer subconjunto respectivamente.

Tabla 3.7 Prueba de Tukey para la variable Células/mL del factor Irradiancia en Kluxes.

DHS de Tukey

| Irradiancia, en kluxes (1000 kluxes) | N | Subconjunto | | |
|--------------------------------------|-----|-------------|------------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 |
| 5 kluxes | 162 | 1781971,67 | | |
| 11 kluxes | 162 | | 2043819,81 | |
| 8 kluxes | 162 | | | 2245945,74 |
| Significación | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

En la prueba de Tukey para el factor tiempo (Tabla 3.8) se muestran cinco subconjuntos de datos, en donde se aprecia que las medias más altas de concentración celular fueron en los días 27 y 30, ubicados dentro del mismo grupo sin diferencia estadística.

Tabla 3.8 Prueba de Tukey para la variable Células/mL del factor Tiempo en días.

DHS de Tukey

| Tiempo, en días | N | Subconjunto | | | | |
|-----------------|----|-------------|------------|------------|------------|-------------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 |
| Día 6 | 54 | 480749,44 | | | | |
| Día 9 | 54 | 543482,78 | | | | |
| Día 12 | 54 | 880705,00 | | | | |
| Día 15 | 54 | | 1477593,89 | | | |
| Día 18 | 54 | | | 2156427,22 | | |
| Día 21 | 54 | | | 2570682,78 | | |
| Día 24 | 54 | | | | 3096560,56 | |
| Día 27 | 54 | | | | 3334105,00 | 3334105,00 |
| Día 30 | 54 | | | | | 3674905,00 |
| Significación | | ,136 | 1,000 | 0,107 | 0,787 | 0,322 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 54

b Alfa = 0,05.

3.2.5 Cinética de crecimiento de *Nostoc* (C37).

La cinética de crecimiento para *Nostoc* (C37) a partir del sexto día con medio de cultivo BG11 con una concentración 4mM de nitrato de sodio a una intensidad luminosa de 11 Kluxes, se indica en la Figura 3.22 con una concentración celular aproximada de 10×10^6 cel /mL en el día 24.

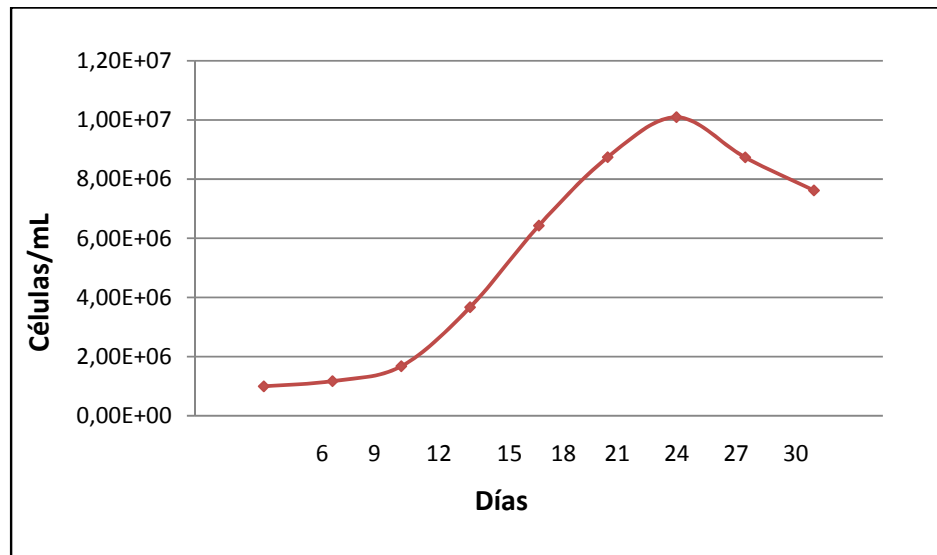


Figura 3.22. Cinética de crecimiento de *Nostoc* (C37) en medio BG11 con nitrato de sodio 4mM a 11Kluxes.

La concentración celular (cel/mL) alcanzó los promedios más altos al cultivarla en medio BG11 en los días 21, 24 y 27, se puede observar en la Figura 3.23 que el promedio de la concentración en cel/mL sigue una tendencia que representa el crecimiento celular; las barras en azul medio BG11 y en verde para agua de vertiente.

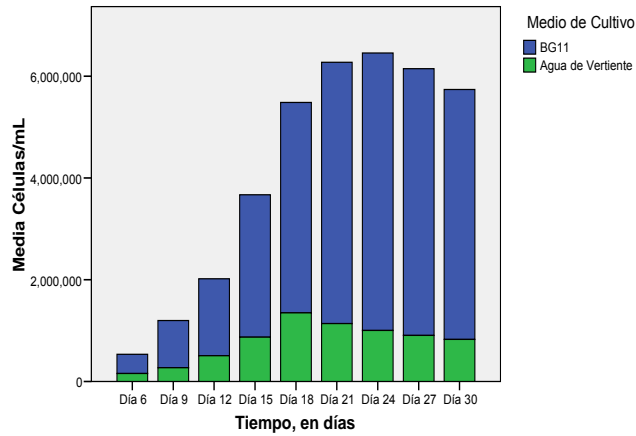


Figura 3.23. Promedio de la producción de biomasa de *Nostoc* (C37) en células por mililitro con respecto al tiempo y al medio de cultivo.

La gráfica de perfil (Figura 3.24) con respecto a los factores nitrato de sodio y medio de cultivo muestra el promedio más alto de la concentración celular para la concentración 4 mM de nitrato de sodio en medio BG11. Con agua de vertiente, a media marginal de la concentración celular es menor pero el crecimiento es ligeramente mayor con una concentración 4mM de nitrato de sodio.

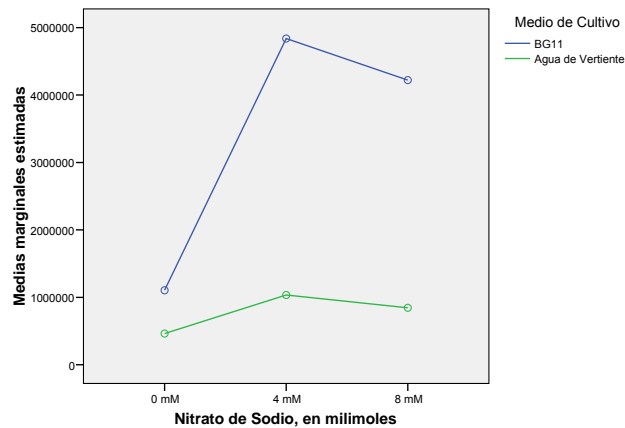


Figura 3.24 Gráfica de Perfil para la interacción de los factores medio de cultivo y nitrato de sodio.

En el análisis de varianza, ANOVA, para el diseño factorial, se concluye que para todas las fuentes de variabilidad estudiadas existe significancia estadística, lo que indica que los grupos definidos por todas y cada una de las variables produce una concentración de células por mililitro significativamente diferente (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Análisis de varianza para la variable Células/mL de la cianobacteria *Nostoc* (C37).

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|-----------------------------------|----------------------------|-----|------------------|----------------|---------------|
| Modelo corregido | 2,92E+15 | 161 | 1,82E+13 | 54,01 | 0,00 |
| Intersección | 2,11E+15 | 1 | 2,11E+15 | 6284,99 | 0,00 |
| Nitrato | 4,24E+14 | 2 | 2,12E+14 | 631,22 | 0,00 |
| Luz | 1,15E+13 | 2 | 5,76E+12 | 17,14 | 0,00 |
| MCultivo | 8,26E+14 | 1 | 8,26E+14 | 2456,69 | 0,00 |
| Tiempo | 6,03E+14 | 8 | 7,54E+13 | 224,31 | 0,00 |
| Nitrato * Luz | 2,19E+13 | 4 | 5,48E+12 | 16,31 | 0,00 |
| Nitrato * MCultivo | 2,38E+14 | 2 | 1,19E+14 | 354,12 | 0,00 |
| Luz * MCultivo | 1,66E+13 | 2 | 8,32E+12 | 24,75 | 0,00 |
| Nitrato * Luz * MCultivo | 2,10E+13 | 4 | 5,25E+12 | 15,62 | 0,00 |
| Nitrato * Tiempo | 1,36E+14 | 16 | 8,52E+12 | 25,35 | 0,00 |
| Luz * Tiempo | 2,78E+13 | 16 | 1,74E+12 | 5,17 | 0,00 |
| Nitrato * Luz * Tiempo | 7,60E+13 | 32 | 2,38E+12 | 7,07 | 0,00 |
| MCultivo * Tiempo | 3,11E+14 | 8 | 3,89E+13 | 115,67 | 0,00 |
| Nitrato * MCultivo * Tiempo | 1,05E+14 | 16 | 6,55E+12 | 19,48 | 0,00 |
| Luz * MCultivo * Tiempo | 4,22E+13 | 16 | 2,64E+12 | 7,84 | 0,00 |
| Nitrato * Luz * MCultivo * Tiempo | 6,24E+13 | 32 | 1,95E+12 | 5,80 | 0,00 |
| Error | 1,09E+14 | 324 | 3,36E+11 | | |
| Total | 5,14E+15 | 486 | | | |
| Total corregida | 3,03E+15 | 485 | | | |

R cuadrado = 0,964 (R cuadrado corregida = 0,946)

La prueba de Tukey realizada para el factor nitrato de sodio (Tabla 3.10) muestra tres subconjuntos de datos, donde el nivel de 4mM tiene el promedio más alto y se sitúa en el primer subconjunto.

Tabla 3.10 Prueba de Tukey para la variable Células/mL del factor Nitrato de Sodio en milimoles.

Células/mL
DHS de Tukey

| Nitrato de Sodio, en milimoles | N | Subconjunto | | |
|--------------------------------|-----|-------------|------------|-------------------|
| | | 2 | 3 | 1 |
| 0 mM | 162 | 784185,36 | | |
| 8 mM | 162 | | 2532844,86 | |
| 4 mM | 162 | | | 2937239,93 |
| Significación | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 162,00

b Alfa = 0,05.

En cuanto al factor Irradiancia, la prueba de Tukey agrupó a las medias conformadas por el nivel de 5 Kluxes y de 8 Kluxes, en un mismo nivel de significancia estadística, mientras que la media más alta está definida por el nivel de Irradiancia de 11 Kluxes en el subconjunto 1 (Tabla 3.11)

Tabla 3.11. Prueba de Tukey para la variable Células/mL del factor Irradiancia en Kluxes.

DHS de Tukey

| Irradiancia, en kluxes (1000 luxes) | N | Subconjunto | |
|-------------------------------------|-----|-------------|-------------------|
| | | 2 | 1 |
| 8 kluxes | 162 | 1962276,96 | |
| 5 kluxes | 162 | 1990061,90 | |
| 11 kluxes | 162 | | 2301931,28 |
| Significación | | ,903 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 162,00

b Alfa = ,05.

Cuando se aplicó la prueba de Tukey al factor Tiempo (Tabla 3.12) se muestran cinco subconjuntos de datos, en donde se aprecia que para los días 27, 21 y 24 no existe diferencia estadística en las medias para la concentración celular, siendo estas las más altas conseguidas.

Tabla 3.12. Prueba de Tukey para la variable Células/mL del factor Tiempo.

Células/mL
DHS de Tukey

| Tiempo, en días | N | Subconjunto | | | | | |
|-----------------|----|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 |
| Día 6 | 54 | 267153,96 | | | | | |
| Día 9 | 54 | 599148,41 | | | | | |
| Día 12 | 54 | | 1010111,37 | | | | |
| Día 15 | 54 | | | 1835752,63 | | | |
| Día 18 | 54 | | | | 2741832,52 | | |
| Día 30 | 54 | | | | 2869832,52 | 2869832,52 | |
| Día 27 | 54 | | | | 3074128,81 | 3074128,81 | 3074128,81 |
| Día 21 | 54 | | | | | 3136647,33 | 3136647,33 |
| Día 24 | 54 | | | | | | 3228202,89 |
| Significación | | ,076 | 1,000 | 1,000 | ,075 | ,292 | ,904 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 54,00

b Alfa = 0,05.

3.3 Cuantificación de proteína.

3.3.1 Elaboración de una curva estándar

La curva estándar de proteínas se construyó con los siguientes promedios obtenidos de las cinco repeticiones de absorbancias medidas (Tabla 3.13) para cada una de las concentraciones de BSA que se consideraron.

Tabla 3.13 Resultados de las absorbancias medidas para la construcción de la Curva Estándar.

| Concentración de BSA $\mu\text{g}/\text{ML}$ | Promedio |
|--|----------|
| 10 | 0,060 |
| 20 | 0,089 |
| 30 | 0,117 |
| 50 | 0,170 |
| 100 | 0,259 |
| 200 | 0,444 |
| 300 | 0,589 |
| 500 | 0,804 |
| 800 | 1,078 |
| 1000 | 1,190 |

A partir de los datos medidos se construyó la curva que se muestra en la Figura 3.6, la cual se aproximó a la línea de tendencia polinomial de segundo grado, cuya ecuación y R^2 se indican en la Figura 3.25.

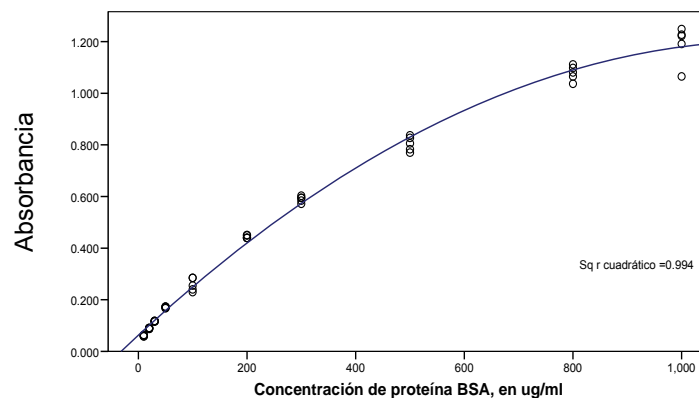


Figura 3.25. Curva Estándar y ecuación de segundo grado utilizadas para la cuantificación de proteínas en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para validar estadísticamente la curva, los datos se analizaron mediante la prueba de homogeneidad de las varianzas de Levene (Tabla 3.14). Se comprobó la validación del método con un nivel crítico de significancia de 0,061 ($p > 0,05$) aceptando la hipótesis nula de la igualdad de las varianzas poblacionales basándose en la mediana, cuyos valores son muy similares a las medias para cada caso. Además se realizó una prueba t en donde se verifica la similitud entre ensayos (Anexo H).

Tabla 3.14 Prueba de homogeneidad de varianzas de las absorbancias medidas en la elaboración de la curva estándar para cuantificar proteínas utilizando BSA.

| | | | | Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|-------------|---|-------|----|-----------------------|-----|-------|-------|
| Absorbancia | Basándose en la mediana. | en la | la | 2,033 | 9 | 40 | 0,061 |
| | Basándose en la mediana y con corregido | en la | gl | 2,033 | 9 | 5,540 | 0,211 |

3.3.2 Análisis Estadístico de la concentración de Proteína Total de *Chlorogloea* (C10).

El promedio más alto para la concentración de proteína en el caso de *Chlorogloea* (C10) se consiguió con el tratamiento en el que se utilizó medio BG11 con una concentración 4mM de nitrato de sodio a una intensidad de 11 Kluxes con una media de 79.71 $\mu\text{g/mL}$; y el promedio más bajo con agua de vertiente sin nitrato de sodio a 5 Kluxes (Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Promedios e Intervalos de confianza de la concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$) con respecto al nitrato de sodio, irradiancia y medio de cultivo.

| Nitrato de Sodio, en milimoles | Irradiancia, en kluxes (1000 luxes) | Medio de Cultivo | Media | Intervalo de confianza al 95%. | |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------|--------------------------------|-----------------|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 0 mM | 5 kluxes | BG11 | 14,485 | 10,981 | 17,988 |
| | | Agua de Vertiente | 10,431 | 6,927 | 13,935 |
| | 8 kluxes | BG11 | 24,508 | 21,004 | 28,012 |
| | | Agua de Vertiente | 22,053 | 18,550 | 25,557 |
| 4 mM | 11 kluxes | BG11 | 20,940 | 17,436 | 24,443 |
| | | Agua de Vertiente | 14,420 | 10,916 | 17,924 |
| | 5 kluxes | BG11 | 67,104 | 63,601 | 70,608 |
| | | Agua de Vertiente | 27,105 | 23,601 | 30,609 |
| 8 mM | 8 kluxes | BG11 | 72,709 | 69,205 | 76,213 |
| | | Agua de Vertiente | 39,000 | 35,496 | 42,504 |
| | 11 kluxes | BG11 | 79,718 | 76,214 | 83,221 |
| | | Agua de Vertiente | 20,268 | 16,764 | 23,772 |
| 8 mM | 5 kluxes | BG11 | 73,925 | 70,421 | 77,429 |
| | | Agua de Vertiente | 26,710 | 23,206 | 30,213 |
| | 8 kluxes | BG11 | 62,521 | 59,017 | 66,025 |
| | | Agua de Vertiente | 41,811 | 38,307 | 45,315 |
| 11 kluxes | BG11 | 75,906 | 72,402 | 79,410 | |
| | Agua de Vertiente | 43,176 | 39,672 | 46,680 | |

La interacción entre factores se aprecia en las siguientes gráficas de perfil (Figura 3.26), a) con respecto al medio de cultivo y a la concentración de nitrato de sodio, la producción de proteína es más elevada en medio BG11 con una concentración de nitrato de sodio 4mM ; b) en cuanto al tiempo, se aprecia que en medio BG11 se tiene el promedio más alto de concentración de proteína en el día 27, muy por encima de los promedios conseguidos, cuando se cultivó en agua de vertiente.

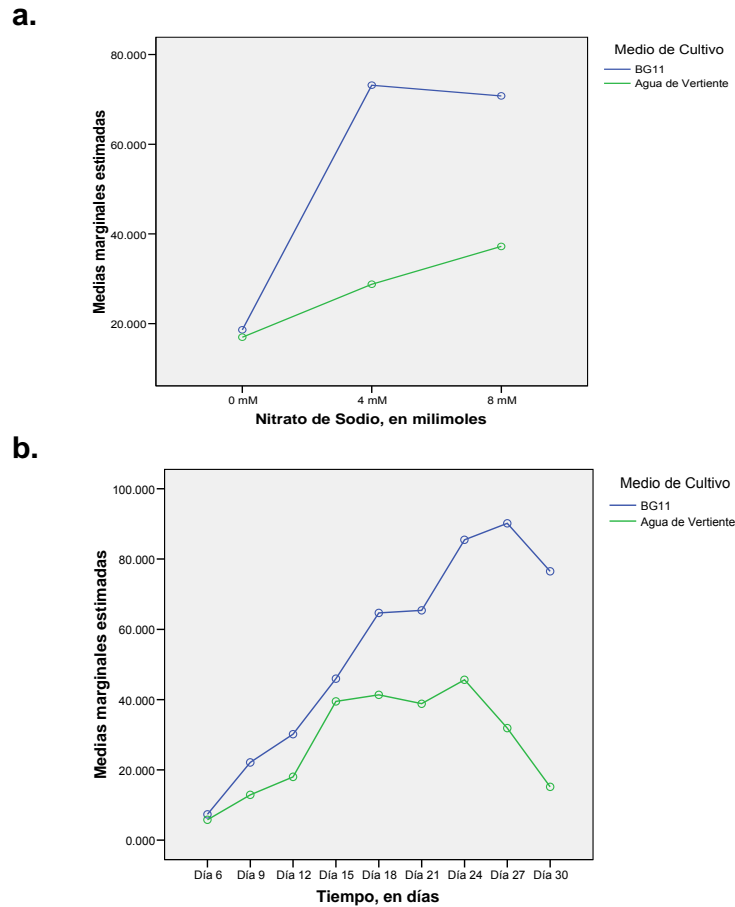
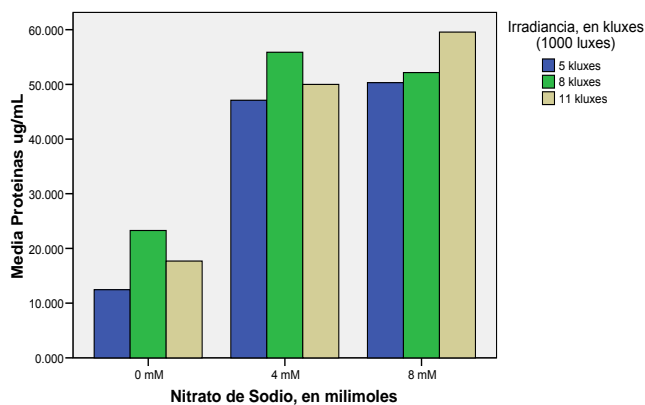


Figura 3.26. Gráficas de Perfil de la producción de proteínas en µg/mL.

a. Interacción del medio de cultivo versus nitrato de Sodio. **b.** Interacción del medio de cultivo versus el tiempo.

Las medias de la producción de proteínas con relación a la concentración de nitrato de sodio versus la irradiancia se muestra en la siguiente gráfica (Figura 3.19 a), en donde la mayor concentración de proteínas se tiene a 11 Kluxes con medio de cultivo con una concentración de nitrato de sodio 8mM. En la Figura 3.27 b. se representa la relación entre la concentración de la biomasa (en barras), la concentración de proteínas (en líneas) con respecto al medio de cultivo utilizado (BG11 y agua de vertiente). Se aprecia que existe una relación proporcional.

a.



b.

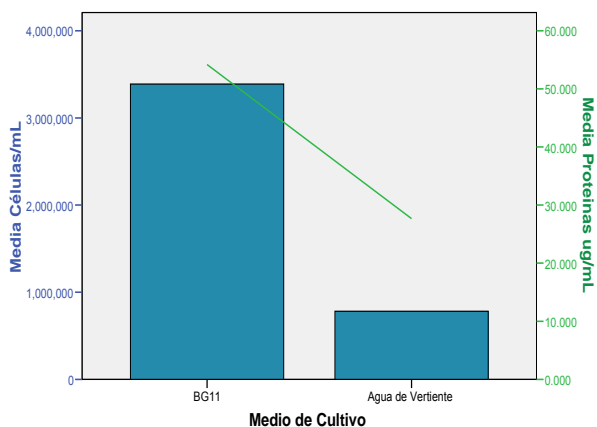


Figura 3.27. Promedio de la concentración de Proteínas

a. Irradiancia versus nitrato de sodio. b. Con relación al medio de cultivo y la concentración celular.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se comprobó que para todas las fuentes de variabilidad estudiadas existe significancia estadística, mostrando que los grupos definidos por cada una de las variables y sus interacciones dan lugar a una concentración de proteínas totales significativamente diferente para todos los factores, siendo de estos los más significativos, como indica el F, el nitrato de sodio, medio de cultivo y el tiempo (Tabla 3.16).

Tabla 3.16. Análisis de varianza para la variable proteínas de *Chlorogloea*.

Variable dependiente: Proteínas µg/mL

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|-----------------------------------|----------------------------|-----|------------------|----------------|---------------|
| Modelo corregido | 787428,248 ^(a) | 161 | 4890,859 | 57,106 | ,000 |
| Intersección | 814285,584 | 1 | 814285,584 | 9507,667 | ,000 |
| Nitrato | 130707,823 | 2 | 65353,911 | 763,078 | ,000 |
| Luz | 4656,436 | 2 | 2328,218 | 27,184 | ,000 |
| MCultivo | 85490,982 | 1 | 85490,982 | 998,200 | ,000 |
| Tiempo | 179435,501 | 8 | 22429,438 | 261,888 | ,000 |
| Nitrato * Luz | 3226,271 | 4 | 806,568 | 9,418 | ,000 |
| Nitrato * MCultivo | 40000,251 | 2 | 20000,125 | 233,523 | ,000 |
| Luz * MCultivo | 4022,799 | 2 | 2011,400 | 23,485 | ,000 |
| Nitrato * Luz * MCultivo | 6363,008 | 4 | 1590,752 | 18,574 | ,000 |
| Nitrato * Tiempo | 64064,825 | 16 | 4004,052 | 46,752 | ,000 |
| Luz * Tiempo | 61635,811 | 16 | 3852,238 | 44,979 | ,000 |
| Nitrato * Luz * Tiempo | 68653,454 | 32 | 2145,420 | 25,050 | ,000 |
| MCultivo * Tiempo | 53209,581 | 8 | 6651,198 | 77,660 | ,000 |
| Nitrato * MCultivo * Tiempo | 19559,102 | 16 | 1222,444 | 14,273 | ,000 |
| Luz * MCultivo * Tiempo | 23664,959 | 16 | 1479,060 | 17,270 | ,000 |
| Nitrato * Luz * MCultivo * Tiempo | 42737,444 | 32 | 1335,545 | 15,594 | ,000 |
| Error | 27749,029 | 324 | 85,645 | | |
| Total | 1629462,861 | 486 | | | |
| Total corregida | 815177,277 | 485 | | | |

a R cuadrado = 0,966 (R cuadrado corregida = 0,949)

La prueba de Tukey realizada para el factor nitrato de sodio (Tabla 3.17) muestra tres subconjuntos de datos, donde los promedios más altos están en el primer subconjunto perteneciente a la concentración 8mM.

Tabla 3.17 Prueba de Tukey para la variable Proteínas µg/mL del factor Nitrato de sodio (0 mM, 4 mM y 8 mM).

DHS de Tukey

| Nitrato de Sodio, en milimoles | N | Subconjunto | | |
|--------------------------------|-----|-------------|----------|-----------------|
| | | 2 | 3 | 1 |
| 0 mM | 162 | 17,80600 | | |
| 4 mM | 162 | | 50,98390 | |
| 8 mM | 162 | | | 54,00816 |
| Significación | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 162

Con respecto a la irradiancia se han agrupado los promedios en dos subconjuntos, siendo los mejores promedios conseguidos a 11 Kluxes y 8 Kluxes sin una diferencia significativa entre los promedios conseguidos con estos dos niveles (Tabla 3.18).

Tabla 3.18 Prueba de Tukey para la variable Proteínas µg/mL del factor Irradiancia (5 Kluxes, 8 Kluxes y 11 Kluxes).

DHS de Tukey

| Irradiancia, en kluxes (1000 luxes) | N | Subconjunto | |
|-------------------------------------|-----|-------------|-----------------|
| | | 2 | 1 |
| 5 kluxes | 162 | 36,62647 | |
| 11 kluxes | 162 | | 42,40453 |
| 8 kluxes | 162 | | 43,76705 |
| Significación | | 1,000 | ,382 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

La prueba de Tukey aplicada al factor tiempo, agrupa las medias de proteínas en seis subconjuntos, donde se aprecia que para el día 30 únicamente se tiene el promedio más elevado, seguido del día 27, sin diferencia estadística entre ellos (Tabla 3.19).

Tabla 3.19 Prueba de Tukey para la variable Proteínas µg/mL del factor Tiempo, medido en días.

DHS de Tukey

| Tiempo, en días | N | Subconjunto | | | | | |
|-----------------|----|-------------|----------|----------|----------|----------|-----------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 |
| Día 6 | 54 | 6,55835 | | | | | |
| Día 9 | 54 | | 17,49929 | | | | |
| Día 12 | 54 | | | 24,08089 | | | |
| Día 15 | 54 | | | | 42,71057 | | |
| Día 30 | 54 | | | | 45,84381 | | |
| Día 21 | 54 | | | | | 52,10531 | |
| Día 18 | 54 | | | | | 53,01361 | |
| Día 27 | 54 | | | | | | 61,01988 |
| Día 24 | 54 | | | | | | 65,56246 |
| Significación | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | ,709 | 1,000 | ,212 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 54

3.3.3 Análisis Estadístico de la concentración de Proteína Total de *Nostoc* (C15).

El promedio más alto para la concentración de proteína en el caso de *Nostoc* (C15) se consiguió con el tratamiento con medio BG11 sin nitrato de sodio a una intensidad de 11 Kluxes con una media de 125,395 µg/mL; y el promedio más bajo con agua de vertiente sin nitrato de sodio a 5 Kluxes (Tabla 3.20).

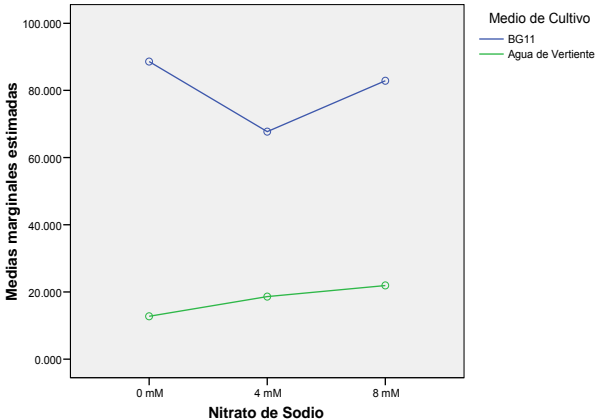
Tabla 3.20 Promedios e Intervalos de confianza de la concentración de proteínas (µg/mL) con respecto al nitrato de sodio, irradiancia y medio de cultivo.

| Nitrato de Sodio | Irradiancia, en kluxes (1000 luxes) | Medio de Cultivo | Media | Intervalo de confianza al 95%. | |
|------------------|-------------------------------------|-------------------|----------------|--------------------------------|-----------------|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 0 mM | 5 kluxes | BG11 | 54,108 | 49,259 | 58,956 |
| | | Agua de Vertiente | 12,500 | 7,652 | 17,349 |
| | 8 kluxes | BG11 | 86,246 | 81,397 | 91,094 |
| | | Agua de Vertiente | 12,403 | 7,555 | 17,252 |
| | 11 kluxes | BG11 | 125,395 | 120,547 | 130,244 |
| | | Agua de Vertiente | 13,337 | 8,489 | 18,186 |
| 4 mM | 5 kluxes | BG11 | 63,188 | 58,339 | 68,036 |
| | | Agua de Vertiente | 17,879 | 13,030 | 22,727 |
| | 8 kluxes | BG11 | 73,698 | 68,850 | 78,546 |
| | | Agua de Vertiente | 18,721 | 13,873 | 23,570 |
| | 11 kluxes | BG11 | 66,339 | 61,491 | 71,188 |
| | | Agua de Vertiente | 19,224 | 14,376 | 24,073 |
| 8 mM | 5 kluxes | BG11 | 68,527 | 63,678 | 73,375 |
| | | Agua de Vertiente | 21,090 | 16,241 | 25,938 |
| | 8 kluxes | BG11 | 110,824 | 105,976 | 115,673 |
| | | Agua de Vertiente | 18,900 | 14,052 | 23,749 |
| | 11 kluxes | BG11 | 69,273 | 64,425 | 74,121 |
| | | Agua de Vertiente | 25,796 | 20,947 | 30,644 |

La interacción entre factores se aprecia en la siguientes gráficas de perfil, en la Figura 3.28a. se observa que con respecto al medio de cultivo y a la concentración de nitrato de sodio, la producción de proteína es más elevada en medio BG11 con promedios más altos sin nitrato de sodio. En la figura 3.28b.

con respecto al tiempo se nota que en medio BG11 se tienen mejores promedios de concentración de proteína en el día 30, por encima de los promedios conseguidos en agua de vertiente.

a.



b.

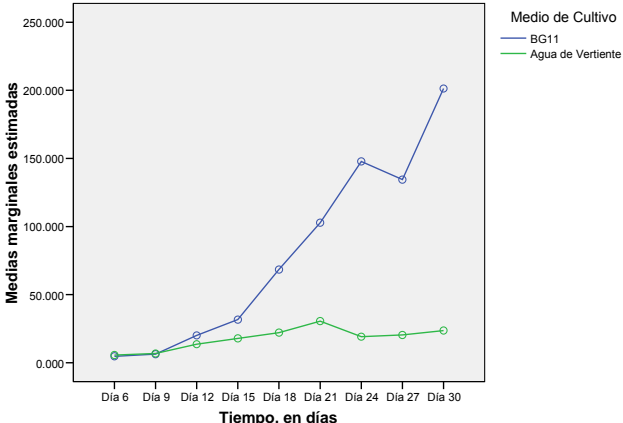
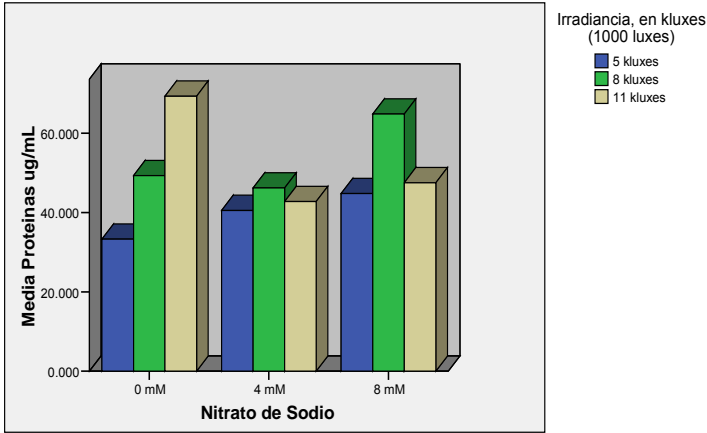


Figura 3.28. Gráficas de Perfil de la producción de Proteínas en µg/mL, a) Interacción del medio de cultivo versus nitrato de sodio, b) Interacción del medio de cultivo versus el tiempo.

Las medias de la producción de proteínas con relación a la concentración de nitrato de sodio versus la irradiancia indican mayor concentración de proteínas a 11 Kluxes con medio de cultivo sin nitrato de sodio (Figura 3.29 a.). En la Figura 3.20 b. se representa la relación entre la concentración de la biomasa (en barras), la concentración de proteínas (línea)

con respecto al medio de cultivo utilizado (BG11 y agua de vertiente), se aprecia que existe una relación proporcional.

a.



b.

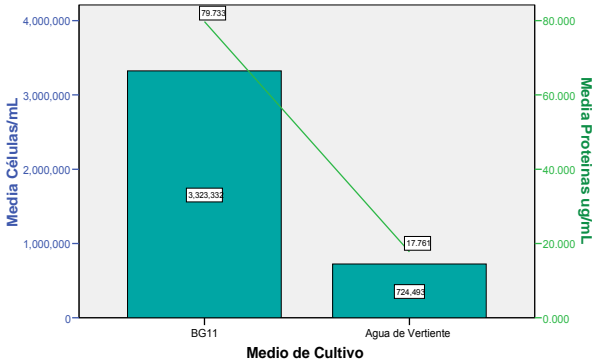


Figura 3.29. Promedio de la concentración de proteínas

a) Irradiancia versus nitrato de sodio. b) Con relación al medio de cultivo y la concentración celular.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se concluyó que para todas las fuentes de variabilidad estudiadas existe significancia estadística. Esto quiere decir que los grupos definidos por cada uno de los factores y sus interacciones dan lugar a la producción de proteínas totales significativamente

diferente. Con los F más altos de la tabla se indica las interacciones que tienen un efecto más significativo sobre la concentración de proteínas (Tabla 3.21).

Tabla 3.21 Análisis de varianza para la variable proteínas de *Nostoc* (C15).

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|-----------------------------------|----------------------------|-----|------------------|-----------------|---------------|
| Modelo corregido | 2390855,82(a) | 161 | 14850,036 | 90,558 | ,000 |
| Intersección | 1154873,172 | 1 | 1154873,172 | 7042,617 | ,000 |
| Nitrato | 7789,432 | 2 | 3894,716 | 23,751 | ,000 |
| Luz | 20566,378 | 2 | 10283,189 | 62,709 | ,000 |
| MCultivo | 466621,335 | 1 | 466621,335 | 2845,538 | ,000 |
| Tiempo | 631630,427 | 8 | 78953,803 | 481,474 | ,000 |
| Nitrato * Luz | 28352,656 | 4 | 7088,164 | 43,225 | ,000 |
| Nitrato * MCultivo | 14502,751 | 2 | 7251,375 | 44,220 | ,000 |
| Luz * MCultivo | 18682,568 | 2 | 9341,284 | 56,965 | ,000 |
| Nitrato * Luz * MCultivo | 35151,910 | 4 | 8787,978 | 53,591 | ,000 |
| Nitrato * Tiempo | 56663,124 | 16 | 3541,445 | 21,596 | ,000 |
| Luz * Tiempo | 98135,836 | 16 | 6133,490 | 37,403 | ,000 |
| Nitrato * Luz * Tiempo | 190108,606 | 32 | 5940,894 | 36,229 | ,000 |
| MCultivo * Tiempo | 461422,685 | 8 | 57677,836 | 351,729 | ,000 |
| Nitrato * MCultivo * Tiempo | 66323,906 | 16 | 4145,244 | 25,278 | ,000 |
| Luz * MCultivo * Tiempo | 60144,062 | 16 | 3759,004 | 22,923 | ,000 |
| Nitrato * Luz * MCultivo * Tiempo | 234760,168 | 32 | 7336,255 | 44,738 | ,000 |
| Error | 53130,664 | 324 | 163,984 | | |
| Total | 3598859,678 | 486 | | | |
| Total corregida | 2443986,506 | 485 | | | |

a R cuadrado = 0,978 (R cuadrado corregida = 0,967)

La prueba de Tukey realizada para el factor nitrato de sodio (Tabla 3.22) muestra dos subconjuntos de datos, donde los promedios más altos están en el primer subconjunto pertenecientes a las concentraciones de 4 mM y 8mM, sin diferencia estadística entre ellos.

Tabla 3.22 Prueba de Tukey para la variable Proteínas µg/mL del factor Nitrato de sodio (0 mM, 4 mM y 8 mM).

| Nitrato de Sodio | N | Subconjunto | |
|------------------|-----|-------------|-----------------|
| | | 2 | 1 |
| 4 mM | 162 | 43,17488 | |
| 0 mM | 162 | | 50,66493 |
| 8 mM | 162 | | 52,40157 |
| Significación | | 1,000 | ,442 |

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 162,00

En cuanto a la irradiancia se han agrupado los promedios en dos subconjuntos, siendo los mejores promedios conseguidos a 11 Kluxes y 8 Kluxes sin una diferencia significativa entre los promedios conseguidos con estos dos niveles (Tabla 3.23).

Tabla 3.23 Prueba de Tukey para la variable Proteínas µg/mL del factor Irradiancia (5 Kluxes, 8 Kluxes y 11 Kluxes).

DHS de Tukey

| Irradiancia, en kluxes (1000 luxes) | N | Subconjunto | |
|-------------------------------------|-----|-------------|-----------------|
| | | 2 | 1 |
| 5 kluxes | 162 | 39,54841 | |
| 11 kluxes | 162 | | 53,22748 |
| 8 kluxes | 162 | | 53,46549 |
| Significación | | 1,000 | ,985 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 162,00

La prueba de Tukey considerando el factor tiempo, agrupa las medias de proteínas en siete subconjuntos, donde se aprecia que para el día 30 únicamente se tiene el promedio más elevado, seguido del grupo conformado por el día 27 y 24, sin diferencia estadísticamente significativa entre estos dos días (Tabla 3.24).

Tabla 3.24 Prueba de Tukey para la variable Proteínas µg/mL del factor tiempo, medido en días.

DHS de Tukey

| Tiempo, en días | N | Subconjunto | | | | | | | |
|-----------------|----|-------------|----------|----------|----------|----------|-----------------|------------------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 |
| Día 6 | 54 | 5,18987 | | | | | | | |
| Día 9 | 54 | 6,53322 | | | | | | | |
| Día 12 | 54 | | 16,84946 | | | | | | |
| Día 15 | 54 | | | 24,78239 | | | | | |
| Día 18 | 54 | | | | 45,28170 | | | | |
| Día 21 | 54 | | | | | 66,69667 | | | |
| Día 27 | 54 | | | | | | 77,41859 | | |
| Día 24 | 54 | | | | | | 83,48372 | | |
| Día 30 | 54 | | | | | | | 112,48850 | |
| Significación | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | ,255 | 1,000 | |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 54

3.3.4 Análisis Estadístico de la concentración de Proteína total de *Nostoc* (C37).

En cuanto a la producción de proteína obtuvo el mejor promedio de concentración en $\mu\text{g/mL}$ para el tratamiento en el que se utilizó medio BG11 con nitrato de sodio (4mM) a una intensidad de 11 Kluxes con una media de 141,188 $\mu\text{g/mL}$; y el promedio más bajo con agua de vertiente sin nitrato de sodio a 11 kluxes (Tabla 3.25).

Tabla 3.25 Promedios e Intervalos de confianza de la concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) con respecto al nitrato de sodio, irradiancia y medio de cultivo

| Nitrato de Sodio, en milimoles | Irradiancia, en kluxes (1000 luxes) | Medio de Cultivo | Media | Intervalo de confianza al 95%. | |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------|----------------|--------------------------------|-----------------|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 0 mM | 5 kluxes | BG11 | 47,046 | 43,496 | 50,597 |
| | | Agua de Vertiente | 8,720 | 5,169 | 12,270 |
| | 8 kluxes | BG11 | 32,588 | 29,038 | 36,139 |
| | | Agua de Vertiente | 10,439 | 6,889 | 13,990 |
| | 11 kluxes | BG11 | 29,907 | 26,357 | 33,458 |
| | | Agua de Vertiente | 6,278 | 2,728 | 9,829 |
| 4 mM | 5 kluxes | BG11 | 120,003 | 116,453 | 123,554 |
| | | Agua de Vertiente | 29,224 | 25,674 | 32,775 |
| | 8 kluxes | BG11 | 111,958 | 108,408 | 115,508 |
| | | Agua de Vertiente | 28,385 | 24,834 | 31,935 |
| | 11 kluxes | BG11 | 141,188 | 137,637 | 144,738 |
| | | Agua de Vertiente | 28,941 | 25,390 | 32,491 |
| 8 mM | 5 kluxes | BG11 | 110,575 | 107,025 | 114,126 |
| | | Agua de Vertiente | 18,918 | 15,368 | 22,469 |
| | 8 kluxes | BG11 | 53,250 | 49,699 | 56,800 |
| | | Agua de Vertiente | 24,086 | 20,536 | 27,636 |
| | 11 kluxes | BG11 | 102,578 | 99,028 | 106,128 |
| | | Agua de Vertiente | 29,925 | 26,374 | 33,475 |

La interacción entre factores (Figura 3.21), con respecto al medio de cultivo y la irradiancia indica que la producción de proteína es más elevada en medio BG11 sin embargo se tienen mejores promedios para 5 y 11 Kluxes (Figura 3.21a). En cuanto al tiempo se nota que la máxima producción de proteína se obtiene en el día 27, con el medio de cultivo BG11 (Figura 3.21b).

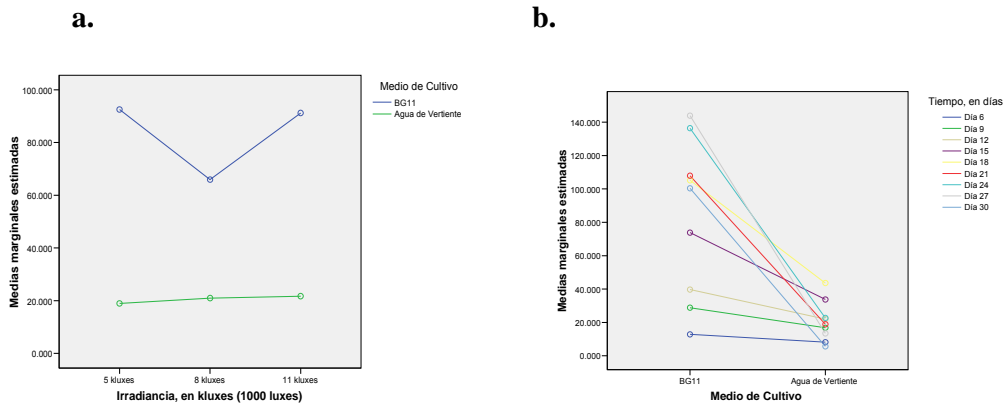


Figura 3.21. Gráficas de Perfil de la producción de Proteínas en µg/mL, **a.** Interacción del Medio de cultivo versus la Irradiancia. **b.** Interacción del Tiempo versus el Medio de Cultivo.

Cuando analizamos las medias de la producción de proteínas con relación a la concentración de nitrato de sodio versus la irradiancia se nota claramente que la mayor concentración de proteínas se tiene a 5 Kluxes con medio de cultivo con 8 mM (Figura 3.30).

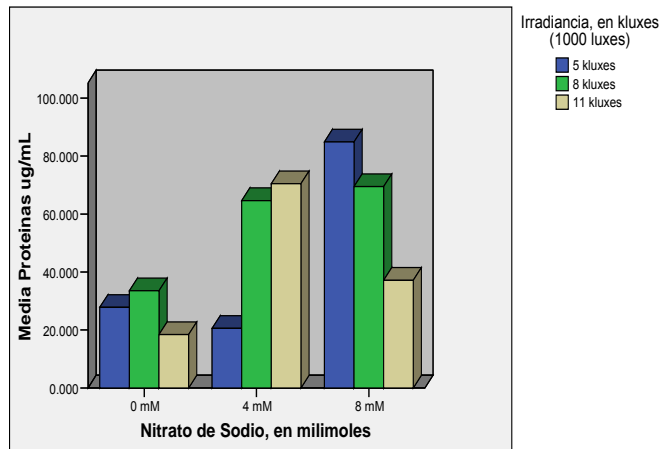


Figura 3.30 Gráfica de la producción de Proteínas en µg/mL, con respecto a la concentración de Nitrato de Sodio en relación a la Irradiancia

Otro de los factores más significativos en la producción de proteínas es el tiempo, en la gráfica inferior se destaca que la mayor concentración de proteína se tiene en los días 18, 27 y 24 respectivamente, en todos los casos coincide que se obtienen mejores resultados con el medio de cultivo 4mM (Figura 3.31).

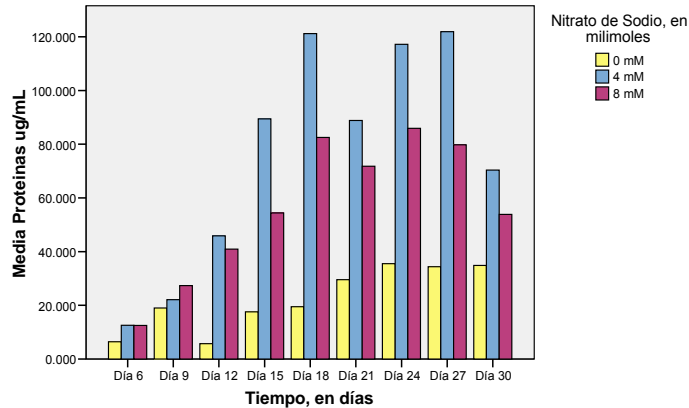


Figura 3.31 Gráfica de la producción de Proteínas en $\mu\text{g/mL}$, con respecto al Tiempo y a la concentración de nitrato de sodio.

La producción de proteínas (línea) tiene una relación proporcional con la concentración de células por mililitro (barras), para los dos medios de cultivo utilizados. Como se puede apreciar en la siguiente gráfica, no obstante, en agua de vertiente, la producción de proteínas es inferior a la barra que indica la concentración celular (Figura 3.32).

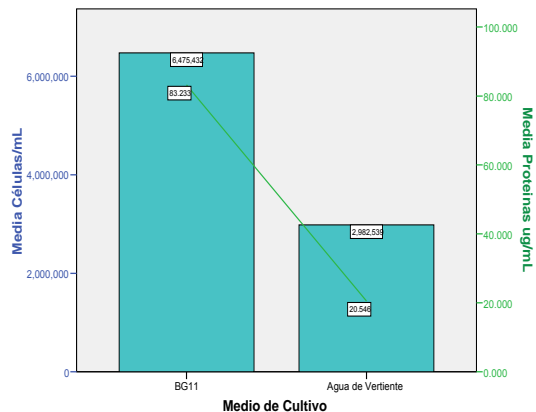


Figura 3.32 Gráfica de la producción de proteínas en $\mu\text{g/mL}$, en relación a la concentración de células por mililitro.

Al igual que en el caso de la biomasa, se aplicó la prueba de Levene para contrastar la hipótesis de que los grupos definidos por los factores que son objeto de este estudio, proceden de poblaciones con la misma varianza, (Anexo F) y considerando la robustez de la prueba ANOVA, se dio paso a considerar los resultados que originó.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se concluyó que para todas las fuentes de variabilidad estudiadas existe significancia estadística, mostrando que los grupos definidos por cada una de las variables y sus interacciones dan lugar a la producción de proteínas totales significativamente diferente en todos los niveles (Tabla 3.26).

Tabla 3.26 Análisis de varianza para la variable Proteínas de *Nostoc sp.* (C37).

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|-----------------------------------|----------------------------|-----|------------------|-----------------|---------------|
| Modelo corregido | 1781115,407(a) | 161 | 11062,829 | 125,805 | ,000 |
| Intersección | 1308561,755 | 1 | 1308561,755 | 14880,740 | ,000 |
| Nitrato | 242536,543 | 2 | 121268,271 | 1379,042 | ,000 |
| Luz | 17345,552 | 2 | 8672,776 | 98,625 | ,000 |
| MCultivo | 477445,618 | 1 | 477445,618 | 5429,430 | ,000 |
| Tiempo | 276974,423 | 8 | 34621,803 | 393,713 | ,000 |
| Nitrato * Luz | 17612,154 | 4 | 4403,039 | 50,071 | ,000 |
| Nitrato * MCultivo | 92457,600 | 2 | 46228,800 | 525,706 | ,000 |
| Luz * MCultivo | 19421,905 | 2 | 9710,952 | 110,431 | ,000 |
| Nitrato * Luz * MCultivo | 16455,927 | 4 | 4113,982 | 46,783 | ,000 |
| Nitrato * Tiempo | 92370,180 | 16 | 5773,136 | 65,651 | ,000 |
| Luz * Tiempo | 26789,495 | 16 | 1674,343 | 19,040 | ,000 |
| Nitrato * Luz * Tiempo | 98788,925 | 32 | 3087,154 | 35,107 | ,000 |
| MCultivo * Tiempo | 234863,975 | 8 | 29357,997 | 333,854 | ,000 |
| Nitrato * MCultivo * Tiempo | 59007,846 | 16 | 3687,990 | 41,939 | ,000 |
| Luz * MCultivo * Tiempo | 35654,706 | 16 | 2228,419 | 25,341 | ,000 |
| Nitrato * Luz * MCultivo * Tiempo | 73390,559 | 32 | 2293,455 | 26,081 | ,000 |
| Error | 28491,459 | 324 | 87,937 | | |
| Total | 3118168,622 | 486 | | | |
| Total corregida | 1809606,866 | 485 | | | |

a R cuadrado = 0,984 (R cuadrado corregida = 0,976)

La prueba de Tukey realizada para el factor nitrato de sodio (Tabla 3.27) muestra tres subconjuntos de datos, donde el nivel de 4mM tiene el mejor promedio y se sitúa en el primer subconjunto.

Tabla 3.27 Prueba de Tukey para la variable Proteínas µg/mL del factor Nitrato de sodio (0 mM, 4 mM y 8 mM).

| Nitrato de Sodio, en milimoles | N | Subconjunto | | |
|--------------------------------|-----|-------------|----------|-----------------|
| | | 2 | 3 | 1 |
| 0 mM | 162 | 22,49652 | | |
| 8 mM | 162 | | 56,55534 | |
| 4 mM | 162 | | | 76,61645 |
| Significación | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 162

En lo que respecta al factor de la irradiancia, la prueba de Tukey muestra dos subconjuntos en donde el promedio más alto de producción de proteínas corresponde al generado a la intensidad de 11 Kluxes, conjuntamente con el generado a una intensidad de 5 Kluxes (Tabla 3.28).

Tabla 3.28 Prueba de Tukey para la variable Proteínas µg/mL del factor Irradiancia (5 Kluxes 8 Kluxes, 11 Kluxes).

DHS de Tukey^{a,b}

| Irradiancia, en kluxes (1000 luxes) | N | Subconjunto | |
|-------------------------------------|-----|-------------|-----------------|
| | | 2 | 1 |
| 8 kluxes | 162 | 43,45099 | |
| 5 kluxes | 162 | | 55,74790 |
| 11 kluxes | 162 | | 56,46942 |
| Significación | | 1,000 | ,768 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 162

En cuanto a la prueba de Tukey para el tiempo se ve que los promedios más altos de la producción de proteínas se tienen al día 24, 27 y 18 respectivamente, agrupados en un solo subconjunto sin una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Tabla 3.29).

Tabla 3.29 Prueba de Tukey para la variable Proteínas µg/mL del factor Tiempo.

Proteínas µg/mL

DHS de Tukey

| Tiempo, en días | N | Subconjunto | | | | | |
|-----------------|----|-------------|----------|----------|----------|----------|-----------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 |
| Día 6 | 54 | 10,49464 | | | | | |
| Día 9 | 54 | | 22,80939 | | | | |
| Día 12 | 54 | | | 30,84179 | | | |
| Día 30 | 54 | | | | 53,04055 | | |
| Día 15 | 54 | | | | 53,78611 | | |
| Día 21 | 54 | | | | | 63,40418 | |
| Día 18 | 54 | | | | | | 74,40003 |
| Día 27 | 54 | | | | | | 78,68523 |
| Día 24 | 54 | | | | | | 79,54303 |
| Significación | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | ,105 |

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 54

b Alfa = 0,05.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

La determinación de las cianobacterias mediante clave microscópica, en condiciones naturales, es generalmente complicada y los criterios que se emplean para las especies se basan en caracteres observables que habitualmente presentan una elevada variabilidad (Alba-Lois *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente trabajo se utilizaron los lineamientos disponibles para establecer una identificación confiable, la clave de Bergey's sirvió para establecer características generales; y con las claves de Komárek & Anagnostidis, 1998 y Desickachary, 1959, se señalaron características específicas con información más detallada para cada género; además de ser las más utilizadas en publicaciones similares (Argañaraz *et al.*, 2005; De Domitrovic *et al.*, 2005).

La separación del género *Nostoc* y *Anabaena* ha sido discutida en los últimos años (Henson *et al.*, 2002; Tamas *et al.*, 2000), existen muchas características similares entre estos dos géneros que complica su diferenciación, por eso se ha tomado como referencia el ciclo de vida particular que presenta *Nostoc* para poder establecer su diferencia de *Anabaena*.

Espíndola (2010) reporta el crecimiento de la cianobacteria C15 en cuatro fases, que ratifican los datos respecto a la cianobacteria de esta investigación, esta peculiaridad permitió aseverar que se trata de *Nostoc*, muy probablemente de la cepa *Nostoc commune* por la semejanza encontrada en bibliografía C15 y C37 perteneciendo al mismo género presentaron características morfológicas que les distinguen entre ellas, pero también con similitudes generales que les sitúan dentro del mismo grupo.

Los estudios de filogenia de las cianobacterias han demostrado que las relaciones genéticas a veces generan conflicto con la clasificación morfológica (Lyra *et al.*, 2001; Itean *et al.*, 2002; Gugger & Hoffmann, 2004). De hecho, la comparación morfológica con los datos genéticos se ha visto entorpecida por la escasez de cultivos de varias morfoespecies de cianobacterias y datos morfológicos poco adecuados de cepas ya secuenciadas, además de que

algunas cepas podrían perder características importantes como las vesículas de gas y la forma de la colonia durante un largo cultivo en el laboratorio (Lehtimäki *et al.*, 2000; Gugger *et al.*, 2002, Papaefthimiou *et al.*, 2008) lo que hace más difícil la identificación.

La cantidad de exopolisacáridos en los cultivos de las tres cianobacterias, posiblemente se debió a la escasez de nitrógeno en que se desarrollaron, estas condiciones de diazotrofia, estimulan la síntesis y liberación de exopolisacáridos solubles y capsulares. Tal como ha sido descrito en *Limnothrix* sp., *Oscillatoria* sp., *Nostoc* LAUN 0015, *Phormidium* sp., y en *Cyanothece* (De Philippis *et al.*, 1993; De Philippis y Vincenzini, 1998; Ortega *et al.*, 2004; Fuenmayor, 2005; Rosales, 2007; Jonte, 2008), reportados por Piña (2009).

Para una identificación más específica y para poder ubicar a las cianobacterias de este trabajo dentro de una especie sería necesario realizar pruebas como perfiles proteínicos SDS-PAGE, secuenciación en base a la subunidad 16S rRNA, RFLP's y fingerprinting genómico para identificar polimorfismos y ubicar las cepas dentro de la especie correcta, la caracterización con respecto a la producción proteínica y crecimiento que aquí se presenta, deja un importante precedente de cianobacterias prometedoras en un nivel industrial que deberían ser consideradas para futuros análisis a nivel molecular.

Las tres cianobacterias que sirvieron para este trabajo de investigación presentaron heterocistos en el medio diferencial carente de nitrato de sodio. En el caso de *Chlorogloea* (C10) fue de significativa importancia la identificación de las estructuras heterocísticas, situándola en este género mediante las claves de Komárek y Anagnostidis 1989 y con la clasificación de Rippka (1979) la subsección I de las cianobacterias unicelulares.

Hasta recientemente, la capacidad para la fijación de nitrógeno entre las algas verde azules (cianobacterias) se consideró invariablemente asociada con la habilidad de formar heterocistos, los cuales no son producidos por

cianobacterias unicelulares como es el caso de las Chroococales con la excepción de *Chlorogloea fritschii*, un organismo cuya asignación a las Chroococales es aún controversial (Stanier *et al.*, 1971), no obstante, existen varias publicaciones con respecto a la presencia de estas estructuras en *Chlorogloea* (Fay, 1965; Peat y Whitton 1967; Evans H y G, Britton, 1983). En esta investigación se vio que puede mostrarse como pseudofilamentosa y en colonias de células independientes agrupadas en relación a la edad del cultivo.

Es importante subrayar que la cuantificación de células por mililitro mediante la técnica de conteo con cámara de Neubauer está sujeta al error del ojo del investigador, mientras que la cuantificación de biomasa mediante turbidez o peso seco puede verse afectada por la descomposición de fuentes orgánicas o minerales (Piña, 2009), es decir, materia muerta; es por eso que se precisó la concentración celular mediante una correlación de los datos de las absorbancias medidas, y así con la creación de un modelo para cada cianobacteria se aproximó con mayor exactitud la concentración celular de cada una.

Con respecto a la concentración de biomasa en los tres tipos de cianobacterias que se estudiaron, se aprecia una importante significancia del medio de cultivo que se utilizó. Los mejores resultados se obtuvieron para el medio BG11 mientras que para el agua de vertiente la concentración de biomasa fue baja, además de presentar una coloración pálida; las causas apuntan directamente a la composición del agua de vertiente que se utilizó, que en comparación con el medio BG11 tiene deficiencia en metales de gran importancia para el desarrollo de las cianobacterias como es el caso del Molibdeno, presente en el BG11 como molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Así mismo, se puede constatar la necesidad de metales importantes para el desarrollo y la síntesis de proteínas (Wolk, 1973), se tiene reportes de la importancia de elementos como hierro y calcio, como agentes quelantes y el molibdeno como cofactor, por estar contenido en el Mo-Fe de la nitrogenasa, el cual actúa como aceptor de electrones, de gran importancia para la fijación del

nitrógeno y la regulación de la síntesis de la nitrogenasa (Devlin, 1982). Además en varias publicaciones se menciona al calcio en la fijación de nitrógeno atmosférico como protector de la nitrogenasa contra una inactivación por O₂ (Giráldez, 1997; De Philippis *et al.*, 1998; Brill *et al.*, 1974; Kennedy and Postgate, 1977).

El agua de vertiente proviene de una fuente muy cercana al Pasochoa, lugar donde se ha reportado minerales de origen volcánico (IEDECA, 2008), que le proporcionan una composición rica en macronutrientes como: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, y micronutrientes como el zinc, cobre, calcio y molibdeno, sumado a esto, la poca presencia humana hace que esta agua sea de muy buena calidad. Tomando en cuenta esto se decidió no suplementar al medio de cultivo con metales adicionales en perspectiva de probar el crecimiento microalgal masivo con un medio de cultivo que pueda ser aprovechado manteniendo su composición original de minerales que las cianobacterias necesitan en una cantidad mínima y que sea de fácil acceso en perspectiva a su utilización con fines prácticos.

Los análisis de la composición del agua de vertiente que estuvieron disponibles no incluyeron al molibdeno (Anexo D) sin embargo las concentraciones de macro y micro nutrientes de esta agua permitieron que las cianobacterias se adaptaron y crecieran.

Con respecto a las pruebas de homogeneidad del análisis estadístico se conoce que en todo experimento siempre habrá un remanente de variabilidad debida a causas comunes o aleatorias que provocan la variabilidad natural del proceso (Gutiérrez *et al.*, 2008).

La prueba de Levene consiste en llevar a cabo un análisis de varianza de un factor utilizando como variable dependiente la diferencia en valor absoluto entre cada puntuación individual y la media (o la mediana, o la medida recortada) de su grupo. La significancia asociada al estadístico de Levene permitió contrastar la hipótesis de homogeneidad de varianzas: en este trabajo

los resultados arrojaron que para las tres cianobacterias, el valor crítico es menor que 0,05 y, por lo tanto, se podría rechazar la hipótesis de homogeneidad.

Considerando la extensión del diseño experimental, el número de repeticiones por tratamiento no ameritó el realizar pruebas no paramétricas. La robustez de la prueba ANOVA mostró su pertinencia.

En lo que se relaciona con la cinética de crecimiento y la producción de proteínas de las tres cianobacterias, como era de esperarse, los resultados indican diferencias en los tratamientos aplicados. Todos los factores y sus interacciones resultaron ser significantes: el medio de cultivo, la concentración de nitrato de sodio, el tiempo y la irradiancia, exceptuando este último en el crecimiento de C10, asignada al género *Chlorogloea*, en donde la intensidad luminosa no desempeñó un papel significativo en su desarrollo y llegó a ser la cianobacteria con la máxima concentración de células por mililitro con alrededor de 14×10^6 cel/mL en el tratamiento con medio de cultivo BG11 con una concentración 4mM de nitrato de sodio a 8 Kluxes en el día 24.

En trabajos parecidos (Jonte *et al.*, 2003; Loreto *et al.*, 2003) se puede constatar que las microalgas crecen mejor con mayores niveles de nitrato de sodio, sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta particularidad no se rige a todos los cultivos microalgales, que presentan necesidades nutricionales variadas dependiendo de la especie a la que pertenezca. Dentro de cada especie, los requerimientos también varían en función de las condiciones ambientales como luz, temperatura y pH (Abalde, 1995; Jonte *et al.*, 2003; Saswati y Prasanna, 2007; Rajaniemi, 2005) es así que los resultados indican diferencias entre cada tipo de cianobacteria para conseguir mayor crecimiento y producción de proteínas; se debe enfatizar que en medio de cultivo carente de nitrato de sodio se observó un importante crecimiento de biomasa, en condiciones diazotróficas.

Cuando se construyó la curva de crecimiento en C15 se observa un decrecimiento para el día 21 con una aparente fase estacionaria que repunta en el día 27, este fenómeno puede explicarse por el hecho de que la cianoficina normalmente se acumula durante la fase estacionaria inducida por una falta de nutrientes aparte del nitrógeno y desaparece cuando el crecimiento se equilibra (Allen, 1984; Simón, 1987) también se acumula cuando las células carentes o repletas de nitrógeno tienen acceso a una fuente de nitrógeno utilizable (Brownel, 1967; Allen & Hutchison, 1980; Lawry & Simon, 1982;). En estudios similares a las células carentes de nitrógeno a las que se les proporcionó una fuente nitrógenada, se pudo ver que la cianoficina aumentó temporalmente, y el crecimiento no recomenzó hasta que la cianoficina se degradó de nuevo (Allen & Hutchison, 1980). Esto demostró que la cianoficina tiene un metabolismo dinámico bajo algunas condiciones y simplemente no se metaboliza durante el exponencial a la transición de la fase estacionaria, esta proteína es la responsable de frenar o estimular el metabolismo de las células que claramente puede verse con variaciones en las curvas de crecimiento.

La intensidad luminosa a la que se obtuvo mayor concentración de proteínas fue la de 11 Kluxes, se atribuye al hecho de que en fase exponencial las células aceleran su maquinaria fotosintetizadora y se ven beneficiadas con mayor cantidad de luz en el entorno (Raps *et al.*, 1983).

En el caso del crecimiento de *Chlorogloea* (C10) la intensidad lumínica no tuvo un efecto estadísticamente significativo, mas no fue así en lo que respecta a la producción de proteínas, en donde si tuvo incidencia, es decir que el metabolismo celular dirigido a la producción de proteínas se ve modificado con la intensidad de luz, mas no se afecta el crecimiento celular. Oh y Rhee (1991) sugieren que la demanda de luz para la fotosíntesis y para el crecimiento no es la misma, ya que existen otros factores que también participan como la respiración y el metabolismo basal.

Jonte *et al.*, 2003, registraron un incremento progresivo en el contenido de proteínas, a medida que aumentaba la intensidad luminosa al igual que en

Fábregas, 2002. Se anota que la influencia de la luz varía de un género a otro e incluso entre especies, es así que cada cepa tiene un rango óptimo de crecimiento en función de la irradiancia.

Se destaca además que la asimilación de nitrógeno es dependiente de la luz por la necesidad de la intervención de ATP que se obtiene en la fotosíntesis para el transporte activo de nitrato (Rajasekarán *et al.*, 1981) En estudios similares, se ha reportado la influencia de la irradiancia en el contenido de proteínas.

En Loreto *et al.*, 2003 han encontrado mayor contenido de proteínas a $156 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (aprox. 11000 luxes), además destacan que la incorporación del nitrato en microalgas y cianobacterias es dependiente de la fotofosforilación y de la irradiancia (Tischner & Lorenzen, 1979). De tal manera que, la velocidad de transporte de este nutriente pueda estar influida a una determinada intensidad luminosa.

Con respecto al medio de cultivo en la producción de proteínas se tiene mejores resultados con BG11. Esto se explica porque la suficiente concentración de nutrientes en el medio que permite la asimilación eficiente de nitrógeno para la síntesis de proteínas, lo que no sucede con el agua de vertiente.

Llama la atención que en *Nostoc* (C15) se tiene el promedio más alto de producción de proteínas cuando se cultivó en medio BG11 sin nitrato de sodio. Según se reporta en Thomas (1984), la deficiencia de sodio en el medio de cultivo resulta en una significativa reducción en el contenido de nitrógeno total y en compuestos a base de nitrógeno, especialmente aminoácidos y proteínas, sin embargo, la actividad de dos enzimas clave involucradas en la asimilación de NH_4^+ y la síntesis de otros aminoácidos, como la glutamina sintetasa y aminotransferasa, son independientes de la presencia de Na^+ , además, la tasa de incorporación de aminoácidos dentro de las proteínas y por

lo tanto su síntesis proteica en cultivos con deficiencia de Na^+ , se ve mejorada como ya ha sido reportado en *A. torulosa*.

La concentración de nitrato influyó en la producción de proteínas de todas las cianobacterias y además muy ligado a este factor está la etapa de su desarrollo en la que se encuentran, es así que coinciden los valores más altos en los tres microorganismos en los días finales de su etapa exponencial y en la estacionaria debido a la deficiencia de nitrógeno, y a la necesidad de movilizar el nitrógeno existente hacia rutas metabólicas esenciales para la síntesis de macromoléculas proteicas (Alison, 1990).

De las tres cianobacterias la concentración de proteínas mas alta conseguida con *Nostoc* (C37) supera la cuantificación de proteínas en otros estudios de cultivos microalgales similares (Quevedo et al., 2008, Loreto y Morales, 2003).

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

5.1 Las cianobacterias de este estudio se asignaron a los géneros *Chlorogloea*, perteneciente a la familia Entophysalidaceae orden de las Chroococcales y, las otras dos, a *Nostoc* de la familia Nostocaceae del orden de las Nostocales, por la clasificación tradicional Komárek & Anagnostidis, 1989; Desikachary, 1959 y la subsección I de la clasificación bacteriológica Rippka *et al.*, 2001 en el manual de Bergey's

5.2 Las máximas concentraciones celulares que se alcanzaron para cada cianobacteria fueron: *Chlorogloea* (C10) 14×10^6 cel /mL, *Nostoc* (C15) 8×10^6 cel/mL y *Nostoc* (C37) 10×10^6 cel /mL.

5.3 El promedio de concentración de proteínas más alto para *Chlorogloea*. Se consiguió con el tratamiento que utilizó medio BG11 con una concentración 4mM de nitrato de sodio a una intensidad de 11 Kluxes con una media de 79,718 $\mu\text{g/mL}$.

5.4 El promedio de concentración de proteínas más alto para *Nostoc* (C15) se consiguió con el tratamiento que utilizó medio BG11 sin nitrato de sodio a una intensidad de 11 Kluxes con una media de 125,395 $\mu\text{g/mL}$.

5.5 El promedio de concentración de proteínas más alto para *Nostoc* se consiguió con el tratamiento que usó medio BG11 con nitrato de sodio (4mM) a una intensidad de 11 Kluxes con una media de 141,188 $\mu\text{g/mL}$.

5.6 Todos los factores que se utilizaron así como sus interacciones demostraron ser estadísticamente significantes para determinar la concentración de biomasa y la producción de proteínas en las tres cianobacterias, con la excepción de la irradiancia en el caso de *Chlorogloea* (C10).

5.7 El agua de vertiente presenta serias limitaciones para el crecimiento de las tres cianobacterias, que, si bien lograron adaptarse, su producción de biomasa y proteínas totales es notablemente menor que en el medio de cultivo BG11, atribuyendo este hecho a la escasez de metales fundamentales en su composición.

CAPITULO 6. RECOMENDACIONES

Las asociaciones cianobiontes que desempeñan las cianobacterias epífitas de este trabajo en el equilibrio del ecosistema de los bosques de *Polylepis pauta* podría ser motivo de un trabajo amplio.

Sería conveniente realizar una caracterización molecular de las tres cianobacterias descritas en este trabajo para aseverar la especie a la que pertenecen.

Según las observaciones realizadas, las tres cianobacterias presentan una notable capa mucilaginoso que las recubre, esto es un claro indicio de la presencia de exopolisacáridos que podrían cuantificarse en un trabajo posterior.

La producción proteica de las tres cianobacterias podría ser aprovechada en alimentación animal o humana una vez que se realicen pruebas de toxicidad en *Daphnia magna* o pullex, *Hydra attenuata* o Artemia y su actividad hemolítica.

Sería importante probar el crecimiento de las cianobacterias suplementando el agua de vertiente con metales traza de la composición del medio BG11 que son básicos para su crecimiento y así abaratar los costos que implica un cultivo microalgal masivo.

Las cianobacterias podrían ser masificadas utilizando medios mixotróficos o heterotróficos como medio de cultivo y así se evitaría el suministro de luz, sin embargo podrían ocurrir problemas con la contaminación de otro tipo de microorganismos, por lo tanto es necesario realizar ensayos sobre este tema.

Es notorio que los factores ambientales influyen considerablemente en el desarrollo y metabolismo microalgal, en este caso se notó que se conseguía un crecimiento mejor al inocular las cianobacterias en medio de cultivo frío (5-6°C aprox.)

CAPITULO 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abalde J., Cid A., Fidalgo P., Torres E. y Herrero C. (1995). Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Monografía N° 26. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de la Coruña. España. 210 pp.
2. Alba-Lois, L., Rodarte, B., Osorio, K., Segal, C., Leon-Tejera, H., Montejano, G (2008). Caracterización Molecular de Cianobacterias de la Región Central de México. Facultad de Ciencias, UNAM. Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, DF, México. CP.
3. Alison H. Mackerras, Nola M. De Chazal and Geoffrey D. Smith. (1990). Transient accumulations of cyanophycin in *Anabaena cylindrica* and *Synechocystis*, Australia.
4. Allen, M., Aron, D. (1955). Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* lemm. Plant physiology. 30(4): 366–372.
5. Allen, M . M. & Hutchison (1980). Nitrogen limitation and recovery in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. Archives of Microbiology 128, 1-7.
6. Allen, M. M. (1984). Cyanobacterial cell inclusions. Annual Review of Microbiology 38, 1-25.
7. Anagnostidis, K. y Komárek, J. (1985). Modern approach to the classification system of cyanophytes 1-Introduction. Archiv für 8 Hydrobiologie/Supplement band 71, Algological Studies 38/39: 291-302.

8. Anand, N. (1988). Culture studies and taxonomy of blue-green algae certain identification problems. Arch.Hydrobiol.Suppl. 80, 141–147.
9. Argañaraz, G., Parodi, E., Cáceres, E. (2005). Caracterización citomorfométrica de *Anabaena circinalis* (Cyanophyta) en una proliferación masiva en el embalse Paso de las Piedras (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Bol. Soc. Argent. Bot. v.40 n.1-2.
10. Baker, P. D. & L. D. Fabro. (1999). A guide to the identification of Common Blue-green Algae (Cyanoprokariotes) in Australian Freshwaters. Cooper. Res. Centre Freshwater Ecol., Ident. Guide No. 25.
11. Baker, P. D. (1991). Identification of Common Noxious Cyanobacteria. Part I. Nostocales. U. W. R. A. of Australia, Res. Report 29.
12. Behrens PW (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. Apt KE, J. Phycol. 35: 215-226.
13. Benemann J.C., Van Olst J.C., Massingill M.J., Weissman J.C., Brune D.E. (2002). The controlled Eutrophication Process: Using Microalgae for CO2 Utilization and Agricultural Fertilizer Recycling.
14. Bisby FA, Roskov YR, Orrell TM, Nicolson D, Paglinawan LE, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, Baillargeon G., eds (2009). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2009 Annual Checklist Taxonomic Classification. DVD; Species 2000: Reading, UK.

15. Boone, D. Castenholz, R. (2001). The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Editorial Springer.
16. Bourrelly, P. (1985). Les Algues d'Eau Douce. III. Les Algues Bleues et Rouges, les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines, 2nd Ed.- N. Boubée & Cie, Paris.
17. Bozzola John J. (2007). Conventional Specimen Preparation Techniques for Scanning, en Kuo, J. (2007). Electron Microscopy Methods and Protocols second edition. 1-11 pp.
18. Brill, W. J., Stenier, A, y V K Shah, (1974). Effect of molybdenum starvation and tungsten on the synthesis of nitrogenase components in *Klebsiella pneumoniae* J. Bacteriology 118:986-989.
19. Brownell, P.F. And D. J. D. Nicholas. (1967). Some Effects of Sodium on Nitrate Assimilation and N₂ Fixation in *Anabaena Cylindrica* Plant Physiol. 42, 915-921.
20. Bryant, D.A. (1986). The cyanobacterial photosynthetic apparatus comparison to those of higher plants and photosynthetic bacteria. In: Plant, T. & Li, W.K.W. Ed. Photosynthetic picoplankton. Call. Bull. Fish. Aquat. Sci. 214:71-120.
21. Capone, D. G., J. P. Zehr, H. W. Paerl, B. Bergman, and E. J. Carpenter. (1997). *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. Science 276:1221-1229.

22. Codd, G and Bell, S (1996). The Occurrence and Fate of Blue-Green Algal Toxins. National Rivers Authority R & D Report No. 29. HMSO, London, 30 pp.
23. Coutteau, P., Sorgeloos, P & Lavens, P (1994). Progress in use of live food in larviculture of marine fish. *Aquaculture* 124, 283.
24. Darley, W.M. (1987). *Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico*. 236 pp. Limusa S.A., México.
25. De Domitrovic, Z., Forastier y Marina E. (2005). Cyanophyceae (Cyanobacteria) del nordeste argentino: distribución y diversidad. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Resumen: B-038.
26. De Philippis R., Margheri M., Pelosi E. y Ventura S. (1993). Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *Journal of Applied Phycology* 5: 387-394.
27. De Philippis, R., Vincencini, M. (1998). Exocellular Polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 151-175.
28. Desikachary, T.V. (1959). *Cyanophyta*. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.
29. Devlin R. (1982). *Fisiología Vegetal*. Ediciones OMEGA, S.A., Cuarta Edición. Barcelona. 517 pp.

30. Drouet F. (1981). Summary of the classification of blue- green algae. *Beih. Nova Hedwigia*, 66: 135-209.
31. Dubinsky, Z., Falkowski, P.G. & Wyman, K. (1986). Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiol.* 27:1335-1349.
32. Espíndola, A. (2009). Remoción de arsénico de un medio líquido a nivel de laboratorio mediante la utilización de un consorcio y una cepa axénica de cianobacterias en suspensión aisladas a partir de las hojas de *Polylepis pauta* de bosques nativos del páramo de Papallacta, Ecuador. Tesis de Grado. 46 pp.
33. Evans EH, Foulds I, Carr NG (1976). Environmental conditions and morphological variation in the blue-green alga *Chlorogloea fritschii*. *J Gen Microbiol* 92:147-155.
34. Evans H y G, Britton, (1983). Relationship between growth conditions, cell morphology and carotenoid composition of the Cyanobacterium *Chlorogloeopsis (Chlorogloea) fritschii*, and carotenoid compositions of photosystem 1 and photosystem 2 preparations *Archives of Microbiology* 135:284-286.
35. Fábregas J., Maseda A., Domínguez, A., Ferreira M., Otero A. (2002). Changes in the cell composition of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana* during a light: dark cycle. *Biotechnology Letters* 24: 1699-1703.

36. Fabregas, J., Herrero, C., Veiga, M. (1984). Effect of Oil and Dispersant on Growth and Chlorophyll a Content of the Marine Microalga *Tetraselmis suecica*, J. Appl. Environ. Microbiol., Vol 47:2, p. 445-447.
37. Fábregas, J., Morales, E., Arán, J., Otero, A. (1998). Germinated Solanum tuberosum: An agricultural product for marine microalgae culture. Biosource Technology 66: 19-24.
38. Fábregas, J., Morales, E., García, D., Cabezas, B., Otero, A. (1997). Short Communication, Bioresource Technology 59. 263-266. Elsevier Science Limited.
39. Fábregas, J., Patiño, O., Morales, E., Cordero, B., Otero A. (1995). Optimal Renewal Rate and Nutrient Concentration for the Production of the Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum* in Semicontinuous Cultures. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 62. No 1.
40. Fay, P. (1964a). Heterotrophy and Nitrogen Fixation in *Chlorogloea fritschii* J. Gen Microbiol. 39, 11-20 pp.
41. Fay, P., H. D. Kumar, and E. Fogg. (1964b). Cellular factors affecting nitrogen fixation in the blue-green alga *Chlorogloea fritschii*. J. Gen. Microbiol. 35:351-360.
42. Fay, P. (1965). Heterocyst structure in *Chlorogloea fritschii*. Archives of Microbiology, J. Gen Microbiol. Volume 58, Number 4. Gen Microbiology, 98, 551.

43. Flores, E and Herrero, A. (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cianobacteria Biochemical Society Transactions. Microbiol. Lett., 221, 155–159. Volume 33, part 1.
44. Flores, E, Vazquez-Bermudez, M.F., Herrero, A. (2003). Carbon supply and 2-oxoglutarate effects on expression of nitrate reductase and nitrogen-regulated genes in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 FEMS Microbiol. Lett., 221, 155–159.
45. Flores, E., Frías, J.E., Rubio LM., Herrero A. (2005). Photosynthetic nitrate assimilation in cianobacteria. Photosynth. Res. 83:117-133.
46. Freiberg, E., Koch, A. (1999). Cyanobacteria in the phyllosphere of canopy and understory leaves in five Ecuadorean rain forest. 12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Tropenökologie, Universität Ulm, 17 P-3.3, 72 pp.
47. Fuenmayor, G. (2005). Cultivo de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. para la producción de pigmentos y exopolisacáridos. Evaluación de toxicidad sobre Artemia. Trabajo Especial de maestría para optar título de Magíster Scientarium en Microbiología. Universidad del Zulia. Venezuela. 120 pp.
48. García-Fernandez JM, De Marsac NT, Diez J (2004). StreamLined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. Microbiol Mol Biol Rev 68: 630–638.

49. Geitler, L. (1932). Cyanophyceae.- In: Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Osterreich und der Scheweiz 14:1-1196,Akad. Verlagses., Leipzig.
50. Giráldez, N. (1997). Relación entre el calcio y la tolerancia a pHs extremos ácidos en la cianobacteria *Anabaena sp.* PCC7120. Memorias presentadas para optar al Grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología.
51. Glazer, N. and Nikaido, H. (2007). Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology, Second Edition 10 pp.
52. Guerrero, M. (1992). Productos y usos prácticos de cianobacterias (algas verde-azuladas). IV Congreso Nacional y I Congreso Hispano-Luso de Biotecnología. Santiago de Compostela, España.
53. Gugger, M. F. & Hoffmann, L. (2004). Polyphyly of the true branching cyanobacteria (*Stigonematales*). Int J Syst Evol Microbiol 54, 349–357.
54. Gugger, M., Lyra, C., Henriksen, P., Coute, A., Humbert, J.-F. & Sivonen, K. (2002). Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. Int J Syst Evol Microbiol 52, 1867–1880.
55. Gupta, S., Agrawal S.C. (2007). Survival and reproduction in some algae under stress conditions. Folia Microbiol. 52, 603–618.
56. Gupta, S., Agrawal, S.C. (2006a). Survival of blue-green and green algae under stress conditions. Folia Microbiol. 51, 121–128.

57. Gupta, S., Agrawal, S.C. (2006b). Motility in *Oscillatoria* salina as affected by different factors. *Folia Microbiol.* 51, 565–572.
58. Gutiérrez, H., De la Vara, R. (2008). *Análisis y Diseño de Experimentos*. Segunda edición. Mc Graw Hill. México.
59. Henson, B. J., Watson, L. E. & Barnum, S. R. (2002). Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *nifD* sequences. *Curr Microbiol* 45, 161–164.
60. Herbert, D., Phipps, P., Strange. R. (1971). Chemical analysis of microbial cells. En: *Methods in Microbiology* vol 5B eds J. Norris & D. Ribbons, Academic Press, London. p. 209-344.
61. Herrero, A & E. Flores (2008). *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution* Caister Academic Press.
62. Herrero, A., Muro-pastor, A., y Enrique Flores. Minireview. (2001). *Journal of Bacteriology*, Jan. 2001, p. 411–425.
63. Houmar, J. (1994). Gene transcription in filamentous cyanobacteria. *Microbiology* 140: 433-441.
64. IEDECA: Instituto de Ecología y Desarrollo de las Comunidades Andinas (2008). *Estudios de Biodiversidad de los Páramos*.
<http://www.pab.ec/document/Estudio%20de%20Biodiversidad%20de%20Ios%20Paramos%20de%20Simiatug.pdf>.

65. Itean, I., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N. & Herdman, M. (2002). rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. *Microbiology* 148, 481–496.
66. Jonte, L., Rosales, N., Briceño, B., Morales, E. (2003). La salinidad y la irradiancia modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis* minúscula en cultivos discontinuos. *Revista multiciencias* Vol 3 N° 001.
67. Kaixian, Q., and M. A. Borowitzka. (1993). Light and nitrogen deficiency effects on the growth and composition of *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotech.* 38:93–103.
68. Kennedy, C And Postgate, J (1977). Expression of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes in nitrate reductase mutants of *Escherichia coli*.
69. Koch, A. Naranjo, Villacis, N. Factos, A. García, M. (2008). Aislamiento, purificación y caracterización de cianobacterias procedentes de bosques nativos de *Polylepis pauta* para su aplicación en reforestación, recuperación de suelos y extracción de metabolitos primarios y secundarios *Revista Ciencia*.
70. Komárek J. & Anagnostidis K. (1998). Cyanoprokaryota 1. Teil: *Chroococcales*. - In: Ettl H., Gärtner G., Heynig H. & Mollenhauer D. (Eds): *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548 pp.

71. Komárek, J. & K. Anagnostidis. (1989). Modern approach to the classification system of Cyanophyta. 4. Nostocales. Arch. Hydrobiol. 82 (Suppl. Algological Studies 56): 247-345.
72. Komárek, J. (1958). Die taxonomische Revision der planktischen Blaualgen der Tschechoslowakei. In: Algologische Studien, 10-206. Academia, Praha.
73. Kosaric, N., Nguyen, H., Bergougnou, M. (1974). Growth of *Spirulina maxima* algae in effluents from secondary waste-water treatment plants, J. Biotechnology and Bioengineering, págs 881 – 896.
74. Laboratorios Almar (2004). Productos: Spirulina. Laboratorios Almar. www.geocities.com/labalmar/spirulina.html#9.
75. Lau, P., Tam, N., Wong, Y. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater, J. Environmental Pollution 89, 59-66 pp.
76. Lawry, N. H. & Simon, R. D. (1982). The normal and induced occurrence of cyanophycin inclusion bodies in several blue-green algae. Journal of Phycology 18, 391-399.
77. Lawry, N. H. & Simon, R. D. (1982). The normal and induced occurrence of cyanophycin inclusion bodies in several blue-green algae. Journal of Phycology 18, 391-399.
78. Lehtimäki, J., Lyra, C., Suomalainen, S., Sundman, P., Rouhiainen, L., Paulin, L., Salkinoja-Salonen, M. & Sivonen, K. (2000). Characterization of

Nodularia strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 1043–1053.

79. López- Muñoz., Fidalgo, A. y Herrero, C. (1990). Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes intensidades de luz. *Actas III Congreso Nac. Aquicult*: 657-662.
80. Lorenz RT, Cysewski GR (2000). Commercial potential of *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18: 160-167.
81. Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J., Morales, E. (2003). Pigment and protein production of the cyanobacterium *Anabaena* pcc 7120 in relation to nitrogen concentration And irradiance. *Gayana Bot.* 60(2): p. 83-89.
82. Loreto, C., Morales, E. (2003). Productividad de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en cultivos semicontinuos. *Bol. Centro Invest. Biol.* v.37 n.1
83. Lowry, O., Rosebroug, H., Farr , A., Randall. R., (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry* 193, p. 265-275.
84. Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie C., Sundman, P., Paulin L., Silvonon K. (2001). Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Internat.J.Syst.Evol.Microbiol.* 51, 513–526.

85. Mackerras, A., De Chazal, N., Smith, G. (1990). Transient accumulations of cyanophycin in *Anabaena cylindrica* and *Synechocystis* 6308. *Journal of General Microbiology* (1990), 136, 2057-2065.
86. Mann, N. (1994). Protein phosphorylation in cyanobacteria. *Microbiology* 140: 3207-3215.
87. Mannan, R.M and Pakrasi H. B. (1993). Dark Heterotrophic Growth Conditions Result in an Increase in the Content of Photosystem II Units in the Filamentous Cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Plant Physiology* , vol 103, Issue 3 971-977.
88. Marsh, J. & D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7: 574-576.
89. Mishra, A. 1997. Regulation of cellular constituents, heterocyst development, photosynthetic O₂ evolution and enzyme activities of *Anabaena sp.* PCC 7120 by nitrogen sources. *Cytobios* 89: 173-182.
90. Mundt S., S. Kreitlow, A. Nowotny Y U. Efmert. 2001. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203: 327-334.
91. Nalewajko, C., Murphy T.P. (2001). Effects of temperature, and availability of nitrogen and phosphorus on the abundance of *Anabaena* and *Microcystis* in Lake Biwa, Japan: an experimental approach. *Limnology* 2, 45-48.

92. Nayak, S., Prasanna, R., Prasanna, B., Sahoo, D. (2007). Analysing diversity among Indian isolates of *Anabaena* (*Nostocales*, Cyanophyta) using morphological, physiological and biochemical characters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Science Business Media B.V.
93. Oh, H., Rhee, G. (1991). A comparative study of microalgae isolated from flooded rice paddies: Light-limited growth, C fixation, growth efficiency and relative N and P requirements. *Journal of Applied Phycology* 3: 211-220.
94. Olaizola, M. (2000). Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000 liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 12: 499-506.
95. Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace, *Biomolecular Engineering*. USA 459_466.
96. Ortega J., Rivas R., Andrade C., Zambrano H. y Morales E. (2004). Cultivos no salinos de las cianobacterias *Limnothrix* y *Oscillatoria* exhiben toxicidad sobre Artemia. X Jornadas Nacionales de Investigación Científica. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela. 46 pp.
97. Otero, A.; García, D.; Morales, E.; Arán, J.; Fabregas J. (1997). Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentanoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuous cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 26: 171-177.

98. Papaefthimiou, D., Hrouzek, P., Mϋgnai, M., Lukesova, A., Turicchia, S., Rasmussen, U., Ventura, S. (2008). Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 58 553-564.
99. Pattnaik, U. & P. Singh. (1978). Effect of nitrate nitrogen on the growth, heterocysts differentiation and nitrogen fixation in rice field blue-green alga *Gloeotrichia* sp. *Archives of Hydrobiology / Algological Studies* 20: 318-327.
100. Peat, A y B, Whitton. (1967). Environmental effects on the structure of the blue-green alga, *Chlorogloea fritschii*. *Archives of Microbiology*. p. 155-180.
101. Pereira, I., Moya, M., Reyes, G., Kramm, V. (2005). Un catastro de cianobacterias heterocisticas fijadoras de nitrógeno en los campos arroceros de Chile; *Gayana Bot.* 62(1): 26-32.
102. Piña Vazquez, Jorge Luis. (2009). Producción de la cianobacteria *Anabaena* sp. en función de las fuentes nitrogenadas Urea, Amonio y Nitrato en cultivos discontinuos. Trabajo Especial de Grado. Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, División de Estudios Básicos Sectoriales, Departamento de Biología, Maracaibo, Venezuela. 88 p.
103. Quevedo, C., Morales, S., Acosta, A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la produccion de

proteína microalgal. *Vitae*, Revista de la facultad de Química Farmacéutica ISSN 0121-4004 Vol. 15 N° 1.

104. Rajaniemi, P; Hrouzek, P; Kastovska K; Willame R; Rantala, A; Hoffmann, Komárek, J y Sivonen K. (2005), Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 11–26.
105. Rajasekaran, T., Somasekaran, T., Venkatamaran, L. (1981). Standardized procedures for pilot plant scale. Cultivation of *Spirulina platensis* under Indian condition. *Archives of Hidrobiology* 22: 114-126.
106. Rajesh, P; Rastogi y Rajeshwar, P; Sinha. (2009). Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances* Volume 27, Issue 4, July-August 2009, 521-539 pp.
107. Raps, S; Wyman, K; Siegelman, H; Falkowski, P. (1983). Adaptation of the Cyanobacterium *Mycricystis aeruginosa* to Light Intensity. *Plant Physiology* 829-832.
108. Reddy K., Soper B., Tang J. y Bradley R. (1996). Phenotypic variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12:311-318.

109. Rippka, R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.*, 167, 3-27.
110. Rippka, R; Castenholz, R; Iteman, I; Herdman, M. (2001). Anabaena. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Boone, D. R. and Castenholz, R. W. (Eds.). Vol. 1, 2 nd Edition, Springer, New York, 566-567 pp.
111. Rippka, Rosmarie, Josette Deruelles, John B. Waterbury, Michael Herdman & Roger Y. Stanier (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* Vol. 111 1-61 pp.
112. Rocap G, *et al.*, (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424:1042–1047.
113. Rocap G., Larimer F.W., Lamerdin J., Malfatti S., Chain P., Ahlgren N.A., Arellano A., Coleman M., Hauser L., Hess W.R., Johnson Z.I., Land M., Lindell D., Post A.F., Regala W., Shah M., Shaw S.L., Steglich C., Sullivan M.B., Ting C.S., Tolonen A., Webb E.A., Zinser E.R., Chisholm S.W. (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation - *Nature*, 424 (6952): 1042-1047.
114. Rosales N. (2007). Evaluación de la actividad biológica de extractos de la cianobacteria *Nostoc* LAUN 0015, en condiciones de laboratorio. Trabajo Especial de maestría para optar título de Magister Scientiarum en Microbiología. Universidad del Zulia. Venezuela. 101 pp.

115. Sanders, W. B. (2004). Bacteria, algae, and phycobionts: maintaining useful concepts and terminology. *The Lichenologist* 36(5):269-275. United Kingdom.
116. Santamaría, L., Koch, A., (1990). Análisis comparativo de la fijación de nitrógeno de cianobacterias aisladas del Atacazo y del Pasochoa. Tesis de Licenciatura, Departamento de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
117. Sasson A (1997). Cultivation of *Spirulina*. *Microalgal biotechnologies: recent developments and prospects for developing countries*. 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnol. Conf. / 3rd Asia-Pacific Conf. Algal Biotechnol. Phuket, Tailandia. pp 11-31.
118. Saswati N, Prasanna R. (2007). Analysing diversity among Indian isolates of *Anabaena* (Nostocales, Cyanophyta) using morphological, physiological and biochemical characters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. India.
119. Simon, R. D. (1987). Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies. In *the Cyanobacteria*, pp.199-225. Edited by P. Fay & C. Van Baalen. Amsterdam & New York : Elsevier.
120. Spoehr H. y Milner H. (1949). The Chemical composition of *Chlorella*: Effect of environmental condition. *Plant Physiology*. Vol 24: 120.
121. Stanier, R. Y. & Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology* 31: 225–274.

122. Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel, M y Cohen- Bazire. (1971). Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococales). Bacteriological Reviews p. 171-205 Vol. 35, No 2.
123. Starmach (1966). Cyanophyta-Sinice, Glaucophyta-Glaukofity. Flora slodkow. Polski 22: 1-808.
124. Stulp B.K., Stam W.T. (1984). Growth and morphology of *Anabaena* strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) in cultures under different salinities. Brit. Phycol. J. 19, 281–286.
125. Stulp, B.K. (1982). Morphological variability of *Anabaena* strains (Cyanophyceae) under different culture conditions. Arch. Hydrobiol. Suppl. 63, 165–176.
126. Tamas, I., Svircev, Z. & Andersson, S. G. (2000). Determinative value of a portion of the nifH sequence for the genera Nostoc and Anabaena (cyanobacteria). Curr Microbiol 41, 197–200.
127. Thomas, J; Kumar, S. (1984). Sodium Requirement and metabolism in nitrogen-fixing cianobacteria. Journal Bioscience pp. 771-794.
128. Tischner, R. & H. Lorenzen. (1979). Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. Planta 146: 287.
129. Tischner, R. & H. Lorenzen. 1979. Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. Planta 146: 287.

130. Volkman, J., Jeffrey, S., Nichols, P., Rogers, G & Garland, C. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128, 219-240.
131. Vonshak, J. (1986). Laboratory Techniques for the cultivation of microalgae en: Richmann, A. (ed.) *Handbook of microalgal mass culture*. Edit. CRC Press Inc. Boca Ratón. Florida, pp 117-145.
132. Whitton, B.; Potts, M. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academy Publisher. Netherlands pp: 466.
133. Whitton, B.A and Pat, A. (1967). Heterocyst Structure in *Chlorogloea fritschii*. *Archiv fur Mikrobiologie* 58, 324 - 338. Department of Botany, University of Durham, England.
134. Wolk, P. *Physiology and Cytological Chemistry of Blue-Green Algae* MSU/AEC Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48823 *Bacteriological Reviews*, Mar. 1973, p. 32-101.
135. Yongmanitchai, W., and O. P. Ward. (1992). Growth and eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in batch and continuous culture systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69:584–590.
136. Yu, H., Shiru J., Dai, Y. (2008). Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Journal of Applied Phycology* 10811-008-9341-5.

137. Yun, Y. S., J.M. Park. 2001. Attenuation of monochromatic and polychromatic lights in *Chlorella vulgaris* suspensions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 765-770.
138. Zapomělová, E., Hrouzek, P., Řeháková, K., Šabacká, M., Stibal, L., Caisová, J., Komárková, A., Lukešová. (2008). Morphological Variability in Selected Heterocystous Cyanobacterial Strains as a Response to Varied Temperature, Light Intensity and Medium Composition Folia Microbiol. 53 (4), 333–341.
139. Zapomělová, E; Hrouzek, P; Řeháková, K; Šabacká, M. Stibal, L. Caisová, J. Komárková, A. Lukešová. (2008). Morphological Variability in Selected Heterocystous Cyanobacterial Strains as a Response to Varied Temperature, Light Intensity and Medium Composition Folia Microbiol. 53 (4), 333–341.

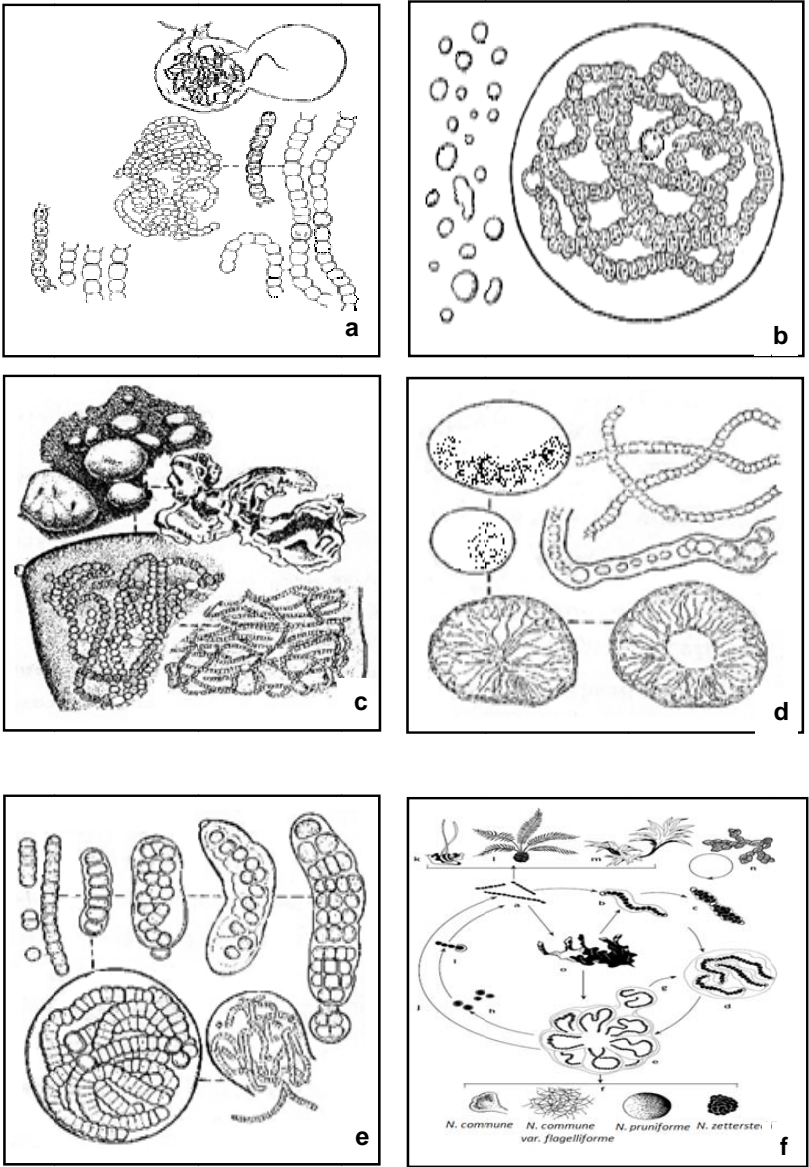
ANEXOS

ANEXO A. Tipos, origen y propiedades de las toxinas de cianobacterias (Codd GA and Bell SG, 1996 modificado por Pereira *et al.*, 2005).

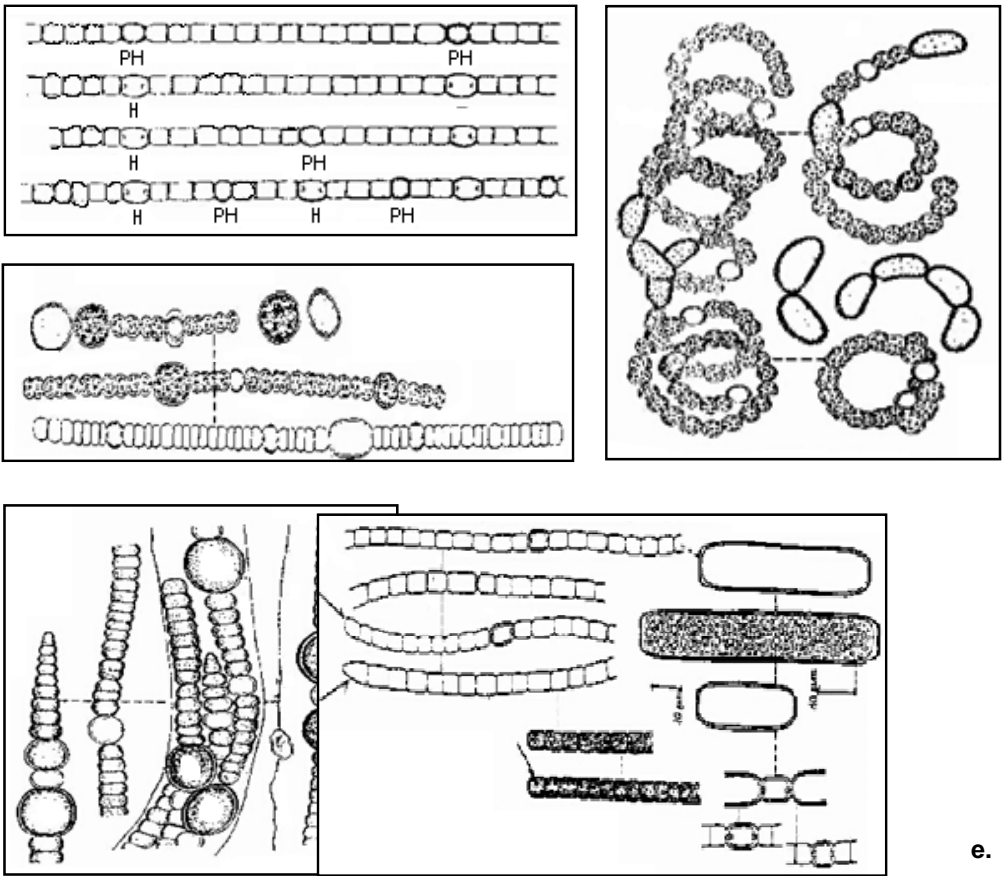
| Toxina | Géneros productores | Estructura molecular | Número de variantes |
|--|--|--|---------------------|
| NEUROTOXINAS | | | |
| Anatoxina-a | <i>Anabaena, Microcystis , Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon</i> | Alcaloide, Amina secundaria | 1 |
| Homoanatoxina-a | <i>Phormidium</i> | Amina Secundaria Alcaloide | 1 |
| Toxinas PSP, "Paralitic Shellfish Poisoning" (Saxitoxinas, neo- saxitoxinas, toxinas GTX) | <i>Aphanizomenon, Anabaena</i> | Alcaloides | Al menos 8 |
| Anatoxina-a (s) | <i>Anabaena</i> | Éster de guanidina metil fosfato | 1 |
| HEPATOTOXINAS | | | |
| Nodularina | <i>Nodularia</i> | Pentapéptido cíclico | 6 |
| Microcistinas | <i>Microcystis, Anabaena, Nostoc, Oscillatoria</i> | Hapapéptido cíclico | >50 |
| Cilindrospermosina | <i>Cylindrospermopsis, Umezakia</i> | Alcaloide cíclico guanidina | 1 |
| ENDOTOXINAS | | | |
| LPS | Muchos géneros | Lipopolisacárido | >3 |

ANEXO B. (Pag.1) Esquema de las cianobacterias relacionadas con el estudio.

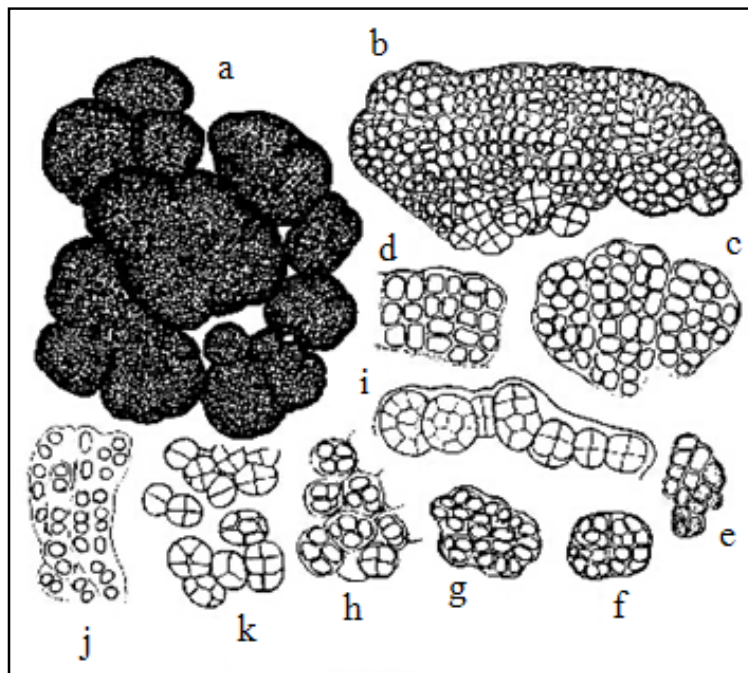
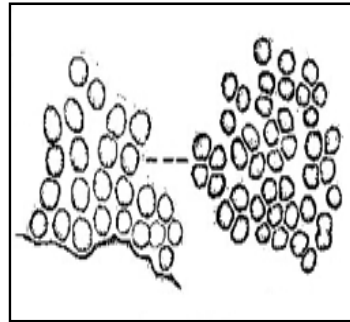
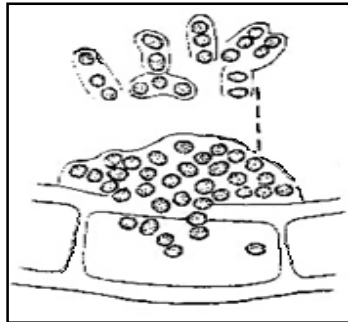
Formación de acinetos apoheterocíticos de diferentes especies de *Nostoc*. **a.** *N. paludosu* **b.** *N. kihlmanii* **c.** *N. commune* **d.** *N. puniforme* **e.** *N. edaphicum*. **f.** Ciclo de vida de *Nostoc*. Anagnostidis, K. y Komárek, J. (1985).



(Pg.2) Tricomas metaméricos en algunos tipos de Anabaena. **a.** Esquema comparativo de los tricomas con sus heterocistos (H) y paraheterocistos (PH). **b.** *A. viguieri*. **c.** *A. perturbete* **d.** *A. subcylindrica*. **e.** *A. solitaria*. (Kómarek, 1975).



(pg.3) Formas comunes de algunos géneros de *Chlorogloea*. **a.** *C. tuberculosa*.
b. *C. purpúrea*. **c.** *C. microcystoides* durante su desarrollo (Geitler, 1932).



ANEXO C Preparación de medio de cultivo BG11

Líquido.

Para preparar el medio BG11, previamente se tiene la solución de metales traza y de los macroelementos por separado cuya composición se indica en los siguientes cuadros.

Cuadro 2.2. Solución de metales traza del medio de cultivo BG11 (Rippka et al. 1979).

| Metales traza | mg/L |
|---|-------|
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.39 |
| H ₃ BO ₃ | 2.8 |
| Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O | 0.049 |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 1.8 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.2 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.079 |

Cuadro 2.3. Macroelementos del medio de cultivo BG11 (Rippka et al. 1979).

| Componente | g/L |
|---------------------------------------|-------|
| NaNO ₃ | 1.5 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.03 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.075 |
| CaCl ₂ | 0.036 |
| Ácido cítrico | 0.006 |
| Citrato amónico férrico | 0.006 |
| Na ₂ CO ₃ | 0.02 |
| EDTA – Na ₂ | 0.001 |

A los macroelementos se le añade 1 mL de la solución de metales traza, en 1 L de agua destilada. Se puede agitar la disolución de los componentes del medio de cultivo mediante la aplicación de agitación magnética, pero no se debe suministrar calor, se dispensa y esteriliza el medio de cultivo a 121°C y 15 psi de presión durante 15 minutos (Koch *et al*, 2008).

Sólido

Disolver los componentes del Cuadro 2 conjuntamente con 1 mL de la solución de metales traza del Cuadro1, en 500 mL de agua destilada. Se puede agilitar la disolución de los componentes del medio de cultivo mediante la aplicación de agitación magnética, pero no se debe suministrar calor.

- En otro recipiente, se disuelve 12.5 g de bacto agar en 500 mL de agua destilada, con la ayuda de agitación magnética y suministro de calor.
- Esterilizar ambas soluciones a 121°C y 15 psi de presión durante 15 minutos.
- Enfríe las soluciones a aproximadamente 50 °C, mézclelas y dispense el medio de cultivo en cajas petri estériles (Koch *et al*, 2008).

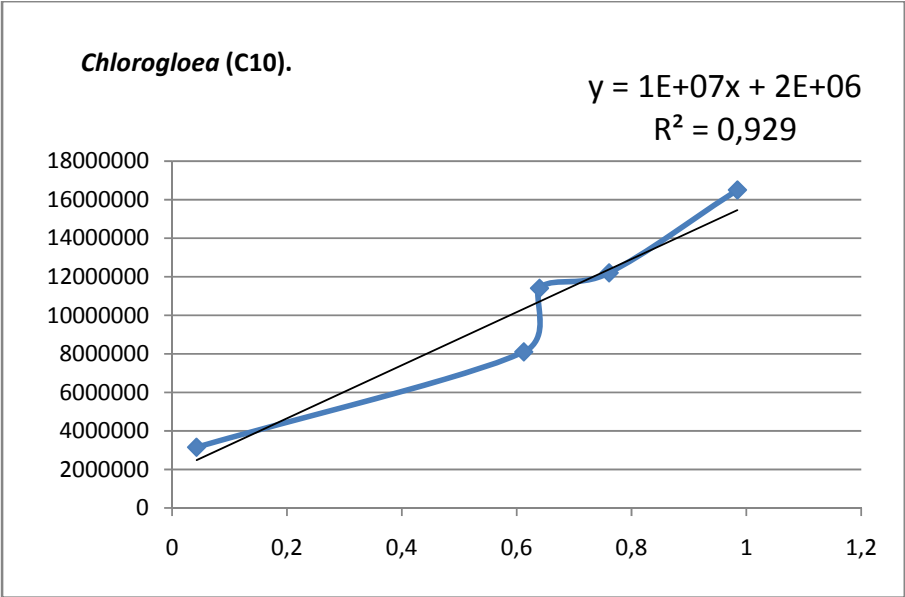
ANEXO D. Componentes del Agua de Vertiente a Utilizar*

| Parámetros | Resultados (ppm) |
|--|------------------|
| Amonio (mg NH ₄ ⁺ /l) | 0,01 |
| Bicarbonatos (mg HCO ₃ ⁻ /l) | 59,5 |
| Carbonatos (mg CO ₃ ²⁻ /l) | 0 |
| Calcio (mg Ca ²⁺ /l) | 9,6 |
| Cloruros (mg Cl ⁻ /l) | 1,6 |
| Cobre (mg Cu ⁺ /l) | 0,03 |
| Dureza total (mg CaCO ₃ /l) | 38 |
| Fosfatos (mg PO ₄ ³⁻ /l) | 0,43 |
| Magnesio (mg Mg ²⁺ /l) | 3,4 |
| Manganeso (mg Mn ²⁺ /l) | <0,001 |
| Nitratos (mg NO ₃ ⁻ /l) | 20,7 |
| Nitrógeno total (mg NTK/l) | 1,4 |
| Potasio (mg K ⁺ /l) | 2,9 |
| Salinidad (g/kg) | 33,5 |
| Sulfatos (mg SO ₄ ²⁻ /l) | 1 |
| Zinc (mg Zn ²⁺ /l) | 0,05 |
| Sodio (mg Na ⁺ /l) | 8,87 |

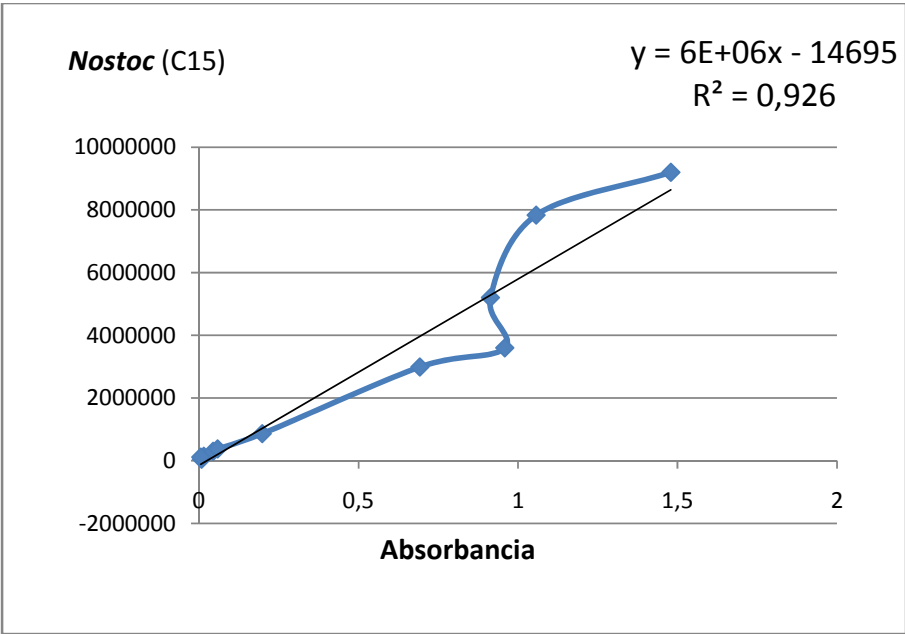
* Resultados del Análisis del Agua realizado en el laboratorio de Aguas y Microbiología y Metalurgia Extractiva de la Escuela Politécnica Nacional.

ANEXO E. Correlación de los datos de absorbancia y conteo celular.

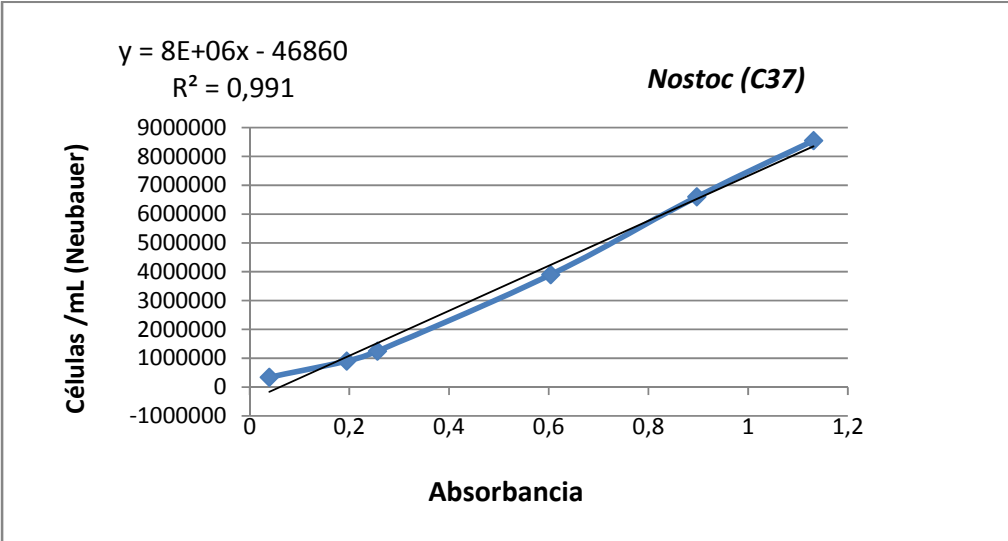
***Chlorogloea* (C10).**



***Nostoc* (C15)**



Nostoc (C37)



ANEXO F Prueba de Levene para la homogeneidad de las varianzas

A partir de los datos tomados para el crecimiento de cada una de las tres cianobacterias mediante turbidez y recuento celular, se estableció un modelo de cuantificación de células por mililitro, mediante la correlación de los dos grupos de datos. A partir de los datos de concentración celular obtenidos, se procedió al análisis estadístico con relación a la biomasa (cel/mL) obtenida a lo largo de la medición.

Se aplicó la prueba de Levene para contrastar la hipótesis de que los grupos definidos por los factores que son objeto de este estudio en cada una de las tres cianobacterias, proceden de poblaciones con la misma varianza, y considerando la robustez de la prueba Anova, se dio paso a considerar los resultados que originó.

Para cada una de las cianobacterias se analizó la concentración de cel/mL tomando en cuenta los diferentes niveles de los factores en que fueron cultivadas

BIOMASA

Chlorogloea (C10)

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)

Variable dependiente: Células/mL

| F | gl1 | gl2 | Significación |
|-------|-----|-----|---------------|
| 4,468 | 161 | 324 | ,000 |

Nostoc (C15)

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)

Variable dependiente: Células/mL

| F | gl1 | gl2 | Significación |
|-------|-----|-----|---------------|
| 7,802 | 161 | 324 | ,000 |

Nostoc (C37)

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)

Variable dependiente: Células/mL

| F | gl1 | gl2 | Significación |
|-------|-----|-----|---------------|
| 7,493 | 161 | 324 | ,000 |

PROTEINAS

Chlorogloea (C10)

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)

Variable dependiente: Proteínas µg/mL

| F | gl1 | gl2 | Significación |
|-------|-----|-----|---------------|
| 4,558 | 161 | 324 | ,000 |

Nostoc (C15)

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)

Variable dependiente: Proteínas µg/mL

| F | gl1 | gl2 | Significación |
|-------|-----|-----|---------------|
| 5,434 | 161 | 324 | ,000 |

Nostoc (C37)

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)

Variable dependiente: Proteínas µg/mL

| F | gl1 | gl2 | Significación |
|-------|-----|-----|---------------|
| 4,254 | 161 | 324 | ,000 |

ANEXO G Claves Microscópicas

Clave Microscópica *Nostoc vaucher*.

Tallos mucilaginosos gelatinosos o coriáceos, al principio globosos, luego oblongos al final, folioso, filiforme, bulloso, sólido o hueco, sin adhesiones, la periferia densa y de color opaco, de filamentos flexibles, curvada o enredada; la matriz es a veces distinta, generalmente difluente, de tricoma toruloso (de cuerpo cilíndrico; hinchado y estrecho por intervalos); de células hendidas, esféricas, cilíndricas o de forma de barril; heterocistos intercalados, y en condiciones juveniles terminales; esporas esféricas u oblongas, formadas centrífugamente en series entre los heterocistos (Desickachary, 1959).

Clave de las especies.

- 1. Tallos unidos, maculiformes, filamentos retorcidos.....1. *N. maculiforme* (p. 374)
- 1. Tallos no maculiformes.....2
 - 2. Tallos sin una pared externa firme, más o menos suaves y sin forma.....3
 - 2. Tallos con una pared firme.....15
- 3. Tricomas muy densamente enrollados apenas vistos 2.4-4.4 μ de ancho 2. *N. punciforme* (p. 374).
- 3. Tricomas menos densamente enrollados en su mayoría claramente visible.....4
 - 4. Tallos microscópicamente pequeños.....5
 - 4. Tallos macroscópicos.....6
- 5. Tricomas 2.5-3 u de ancho, relativamente densamente dispuestos....3 *N. entophyllum* (p 375)
- 5. Tricomas 3.3-5 u de ancho, laxos (sin tensión).....4. *N. palodosum* (p. 375)
 - 6. Acuático.....7
 - 6. Subaéreo.....11
- 7. Tricomas densamente arreglados enrollados.....5. *N. linkia* (p. 377)
- 7. Tricomas no arreglados densamente8
 - 8. Esporas esféricas.....6. *N. piscinale* (pg. 377)
 - 8. Esporas más largas que anchas.....9
- 9. Células cilíndricas.....10
- 9. Células un poco mas largas que anchas.....7. *N. rivulare* (p. 379)
 - 10. Heterocistos 7-8 μ de ancho, esporas 6-7 x 10-12 u 8. *N. spongiaeforme*
 - 10. Heterocistos 6 μ de ancho. Esporas 6 X 8-10u.....9. *N. carneum* (p. 381)

| | |
|---|---------------------------------------|
| 11. Células cilíndricas..... | 10. <i>N. elliposporum</i> (p. 383) |
| 11. Células de forma de barril, mas cortas o mas largas que anchas..... | 12 |
| 12. Tricomas 2.2-3 u de ancho..... | 13 |
| 12. Tricomas 3.5-5 u de ancho..... | 14 |
| 13. Esporas oblongas..... | 11. <i>N. humifusom</i> (pg. 84) |
| 13. Esporas esféricas..... | 12. <i>N. calcicota</i> (p. 384) |
| 14. Tricomas paralelos, esporas 6x 8 μ | 13. <i>N. passerinianum</i> (p. 385) |
| 14. Tricomas con modo no definido arreglo..... | 14. <i>N. moscorum</i> (p. 385) |
| 15. Subaereas..... | 16 |
| 15. Acuáticas..... | 17 |
| 16. Tallo muy largo, llano, membranoso..... | 15. <i>N. commune</i> (p. 387) |
| 16. Tallo pequeño de 1mm o que alcanzan un máximo de 1 cm, mas o menos esférico, Tricomas de 5 a 8u de ancho..... | 16. <i>N. microscopicum</i> (p.387) |
| 17. Tricomas no dispuestos radialmente..... | 18 |
| 17. Tricomas dispuestos radialmente..... | 21 |
| 18 Tallos arrugados en la superficie..... | 17. <i>N verrucosum</i> (p.388) |
| 18. Tallos lisos en la superficie..... | 19 |
| 19. Heterocistos de aprox. 10u de ancho..... | 18. <i>N. coeruleum</i> (p. 388) |
| 19. Heterocistos más estrechos..... | 20 |
| 20. Colonias adultas de varios cm de diámetro..... | 22 |
| 20. Colonias sobre los 2 cm de diámetro..... | 19. <i>N. hatei</i> (p.389) |
| 21. Tallos adheridos, discoidales o ligulados..... | 20. <i>N. parmelioides</i> (p. 389) |
| 21. Tallos de libre natación, más o menos esféricos..... | 21. <i>N. pruniforme</i> (p.390) |
| 22. Tricomas de 4 a 5 u de ancho, tallos sobre los 7 cm de ancho. | 22. <i>Nostoc sphaericum</i> (p.390). |
| 22. Tricomas de 2 a 3 u de ancho, tallos más largos..... | 23. <i>N. amplissimum</i> (p.390) |

(Desickachary, 1959).

Clave de identificación morfológica Chlorogloea

Colonias mucilaginosas, multicelulares, en el contorno más esférico, hemisférico, llano o granular irregular con la superficie áspera, a menudo compuesta de subcolonias, normalmente macroscópicas, fijas a un sustrato (plantas, piedras) o de vida libre, epipélicas o metáficas, a veces formando una

masa gelatinosa grande compuesta solamente de microcolonias (Komárek & Anagnostidis (1998)..

Clave para el género

- 1ª Células sin envoltura individual diferenciada, o con envoltura simple sin estratificación; colonias micro o macroscópicas.....2
- 1b Células con envoltura individual estratificada interna invariable; colonias usualmente grandes, macroscópicas.....4
- 2ª Tallos con precipitados de hierro.....1. Paracapsa
- 2b Tallos sin precipitados de hierro.....3
- 3ª Tallos compuestos de “fasículos” de células encapsuladas en hileras diferenciadas y ordenadas (las envolturas individuales confluyen alrededor de las células).....2. Lithocapsa
- 3b Tallos irregulares, células en hileras solamente en colonias jóvenes y en colonias marginales; células con y sin envoltura individual sencilla.....3. Chlorogloea
- 4ª Colonias ± amorfas en los márgenes de consistencia babosa; la organización radial de las células es reconocible solamente en las colonias internas.....4. Entophysalis
- 4b Colonias firmes, pseudodicotomales o irregularmente ramificadas con la superficie firmemente delimitada, polarizada; células organizadas irregularmente, ± radiales solamente en las colonias marginales.....5. Cyanoarbor

Clave de las especies

- 1a Marina, epifítica y epizóica en la región litoral; de mucílago incoloro, carente de estructura, células de aproximadamente 1 a 2.5 μm de diámetro.....1. C. tuberculosa.
- 1b Agua dulce y especies aerofíticas.....2
- 2a Células esféricas de 1.5 a 2.5 μm de diámetro, rojizas con especies bentónicas en lagos de agua clara, sin estructura mucilagenosa y sin coloración.....2. C. purpúrea
- 2b Células esféricas, elongadas o redondeadas de forma poligonal, siempre sobre los 2 μm de diámetro, grises, verde azules o amarillentas; en agua estancada o corriente o aerofíticas.....3
- 3ª Agua dulce (rara vez en zonas supralitorales), en corrientes o en lagos litorales, rara vez subaerofíticas o en rocas húmedas.....4
- 3b Especies aerofíticas de rocas de limo húmedo, creciendo en rocas volcánicas calcáreas; células usualmente rodeadas de una envoltura individual, refractiva oval o envoltura redondeada poligonal, que tiene entre 8.5 y 12 μm de diámetro, mucílago descolorido y en colonias viejas amarillo café.....5. C. novacekii
- 4ª Células principalmente en envolturas individuales, epilíticas en biotipos sumergidos.....5
- 4b Células de los alrededores muy finas, difícilmente visibles, envolturas individuales difuyentes, de vida libre (metafíticas), en bentos de los lagos nórdicos (colonias esferoides/globosas).....6. C. gentilis

5^a Células de 3-4 (6) μm en diámetro, mucílago sin color, epilítica en ríos claros no calcáreos.....3. *C. rivularis*
5b Células de 2-3.8 μm de diámetro; mucílago sin color o amirillo-café (dependiendo de la insolación); epilítico en zonas litorales o supralitorales, en lagos y ríos calcáreos.....4. *C. microcystoides*

ANEXO H. (pag.1) Igualdad de las varianzas poblacionales basándose en la mediana. (Cuyos valores son muy similares a las medias para cada caso), prueba t en donde se verifica la similitud entre ensayos.

Descriptivos

| Absorbancia | Concentración | Media | Estadístico | Error típ. | | |
|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|--------|--|
| 10 | 10 | Media | ,06060 | ,001030 | | |
| | | | ,05774 | | | |
| | | Límite superior | ,06346 | | | |
| | | Media recortada al 5% | ,06056 | | | |
| | | Mediana | ,06100 | | | |
| | | Varianza | ,000 | | | |
| | | Desv. típ. | ,002302 | | | |
| | | Mínimo | ,058 | | | |
| | | Máximo | ,064 | | | |
| | | Rango | ,006 | | | |
| | | Amplitud intercuartil | ,004 | | | |
| | | Asimetría | ,606 | ,913 | | |
| | | Curtosis | ,274 | 2,000 | | |
| | | Media | ,08920 | ,000800 | | |
| | | | ,08698 | | | |
| 20 | 20 | Límite superior | ,09142 | | | |
| | | Media recortada al 5% | ,08922 | | | |
| | | Mediana | ,08900 | | | |
| | | Varianza | ,000 | | | |
| | | Desv. típ. | ,001789 | | | |
| | | Mínimo | ,087 | | | |
| | | Máximo | ,091 | | | |
| | | Rango | ,004 | | | |
| | | Amplitud intercuartil | ,004 | | | |
| | | Asimetría | -,052 | ,913 | | |
| | | Curtosis | -2,324 | 2,000 | | |
| | | Media | ,11700 | ,000447 | | |
| | | | ,11576 | | | |
| | | 30 | 30 | Límite superior | ,11824 | |
| | | | | Media recortada al 5% | ,11700 | |
| Mediana | ,11700 | | | | | |
| Varianza | ,000 | | | | | |
| Desv. típ. | ,001000 | | | | | |
| Mínimo | ,116 | | | | | |
| Máximo | ,118 | | | | | |
| Rango | ,002 | | | | | |
| Amplitud intercuartil | ,002 | | | | | |
| Asimetría | ,000 | | | ,913 | | |
| Curtosis | -3,000 | | | 2,000 | | |
| Media | ,17080 | | | ,001200 | | |
| | ,16747 | | | | | |
| 50 | 50 | | | Límite superior | ,17413 | |
| | | | | Media recortada al 5% | ,17089 | |
| | | Mediana | ,17200 | | | |
| | | Varianza | ,000 | | | |
| | | Desv. típ. | ,002683 | | | |
| | | Mínimo | ,167 | | | |
| | | Máximo | ,173 | | | |
| | | Rango | ,006 | | | |
| | | Amplitud intercuartil | ,005 | | | |
| | | Asimetría | -,813 | ,913 | | |
| | | Curtosis | -1,539 | 2,000 | | |
| | | Media | ,25900 | ,011336 | | |
| | | | ,22753 | | | |
| | | 100 | 100 | Límite superior | ,29047 | |

| | | | | |
|------|-----------------------|-----------------|----------------|---------|
| | Media recortada al 5% | | ,25917 | |
| | Mediana | | ,25500 | |
| | Varianza | | ,001 | |
| | Desv. típ. | | ,025348 | |
| | Mínimo | | ,230 | |
| | Máximo | | ,285 | |
| | Rango | | ,055 | |
| | Amplitud intercuartil | | ,050 | |
| | Asimetría | | ,098 | ,913 |
| | Curtosis | | -2,695 | 2,000 |
| 200 | Media | | ,44400 | ,002470 |
| | | Límite superior | ,43714 | |
| | | | ,45086 | |
| | Media recortada al 5% | | ,44383 | |
| | Mediana | | ,44000 | |
| | Varianza | | ,000 | |
| | Desv. típ. | | ,005523 | |
| | Mínimo | | ,440 | |
| | Máximo | | ,451 | |
| | Rango | | ,011 | |
| | Amplitud intercuartil | | ,010 | |
| | Asimetría | | ,683 | ,913 |
| | Curtosis | | -2,902 | 2,000 |
| 300 | Media | | ,58980 | ,005380 |
| | | Límite superior | ,57486 | |
| | | | ,60474 | |
| | Media recortada al 5% | | ,59006 | |
| | Mediana | | ,59500 | |
| | Varianza | | ,000 | |
| | Desv. típ. | | ,012029 | |
| | Mínimo | | ,572 | |
| | Máximo | | ,603 | |
| | Rango | | ,031 | |
| | Amplitud intercuartil | | ,021 | |
| | Asimetría | | -,779 | ,913 |
| | Curtosis | | -,040 | 2,000 |
| 500 | Media | | ,80460 | ,012683 |
| | | Límite superior | ,76939 | |
| | | | ,83981 | |
| | Media recortada al 5% | | ,80472 | |
| | Mediana | | ,80600 | |
| | Varianza | | ,001 | |
| | Desv. típ. | | ,028360 | |
| | Mínimo | | ,770 | |
| | Máximo | | ,837 | |
| | Rango | | ,067 | |
| | Amplitud intercuartil | | ,056 | |
| | Asimetría | | -,114 | ,913 |
| | Curtosis | | -2,194 | 2,000 |
| 800 | Media | | 1,07860 | ,013064 |
| | | Límite superior | 1,04233 | |
| | | | 1,11487 | |
| | Media recortada al 5% | | 1,07906 | |
| | Mediana | | 1,08100 | |
| | Varianza | | ,001 | |
| | Desv. típ. | | ,029211 | |
| | Mínimo | | 1,037 | |
| | Máximo | | 1,112 | |
| | Rango | | ,075 | |
| | Amplitud intercuartil | | ,054 | |
| | Asimetría | | -,500 | ,913 |
| | | | | |
| | Curtosis | | -,420 | 2,000 |
| 1000 | Media | | 1,19080 | ,032785 |

| | | | |
|-----------------------|-----------------|---------|-------|
| | | 1,09977 | |
| | Límite superior | 1,28183 | |
| Media recortada al 5% | | 1,19456 | |
| Mediana | | 1,22200 | |
| Varianza | | ,005 | |
| Desv. típ. | | ,073309 | |
| Mínimo | | 1,065 | |
| Máximo | | 1,249 | |
| Rango | | ,184 | |
| Amplitud intercuartil | | ,110 | |
| Asimetría | | -1,815 | ,913 |
| Curtosis | | 3,451 | 2,000 |

(pag. 4) Prueba t en donde se verifica la similitud entre ensayos.

| | | Diferencias relacionadas | | | | | t | gl | Sig. (bilateral) |
|--------|-------|--------------------------|--------------------|------------------------------|---|----------|----------|--------------------|------------------------------|
| | | Media | Desviación típ. | Error típ. de la media | 95% Intervalo de confianza para la diferencia | | Media | Desviación típ. | Error típ. de la media |
| | | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Inferior | Superior |
| Par 1 | 1 -2 | -,08300 | ,30688 | ,09253 | -,28917 | ,12317 | -,897 | 10 | ,391 |
| Par 2 | 1-3 | -,18436 | ,60303 | ,18182 | -,58949 | ,22076 | -1,014 | 10 | ,334 |
| Par 3 | 1-4 | -,27182 | ,90521 | ,27293 | -,87995 | ,33631 | -,996 | 10 | ,343 |
| Par 4 | 1-5 | -,37055 | 1,20394 | ,36300 | -1,17936 | ,43827 | -1,021 | 10 | ,331 |
| Par 5 | 2 -3 | -,10136 | ,30413 | ,09170 | -,30568 | ,10296 | -1,105 | 10 | ,295 |
| Par 6 | 2 -4 | -,18882 | ,60330 | ,18190 | -,59412 | ,21649 | -1,038 | 10 | ,324 |
| Par 7 | 2 -5 | -,28755 | ,90103 | ,27167 | -,89286 | ,31777 | -1,058 | 10 | ,315 |
| Par 8 | 3 - 4 | -,08745 | ,30432 | ,09175 | -,29190 | ,11699 | -,953 | 10 | ,363 |
| Par 9 | 3 - 5 | -,18618 | ,60204 | ,18152 | -,59064 | ,21828 | -1,026 | 10 | ,329 |
| Par 10 | 4 - 5 | -,09873 | ,29940 | ,09027 | -,29986 | ,10241 | -1,094 | 10 | ,300 |

Según la prueba de significancia se comprueba la validación del método con una significancia mayor al 5% aceptando la hipótesis nula de que cada ensayo es similar al otro.

ANEXO I. Glosario de Términos.

Intercalar: Los heterocistos intercalares ocurren en medio de células vegetativas.

Metamérico: Cuando varios heterocistos se desarrollan en distancias más o menos regulares a lo largo del tricoma completo de tal forma que varios ejes perpendiculares pueden dividir al tricoma en varios segmentos morfológicamente casi idénticos.

Subsimétrico Cuando unos pocos heterocistos no están situados en una posición estrictamente simétrica desarrollados en un tricoma, ocurre una estructura final subsimétrica.

Paraheterocítico Los acinetos se desarrollan bajo condiciones “normales” en números mas o menos pequeños (usualmente de 1 a 8) cerca de los heterocistos.

Apoheterocítico Los acinetos empiezan a diferenciarse mas o menos en la mitad del “intervalo heterocístico” entre dos heterocistos de células vegetativas, los acinetos cambian hacia ambos lados de los heterocistos.

ANEXO J. Tabla de Abreviaturas

| | |
|--|--------------------------|
| Tipo ABC transportador de nitrito /nitrato | NRT |
| Tipo ABC - transportador de úrea | Urt |
| Permeasa de amonio | Amt |
| Nitrato reductasa | Nar |
| Nitrito reductasa | Nir |
| Complejo nitrogenasa | NifHDK |
| Ferredoxina específica de heterocistos | FdxH |
| Ferredoxina reducida | Fdx_{red} |
| Fosfoenolpiruvato carboxilasa | PEP carboxilasa |
| 2-oxoglutarato | 2-OG |
| Glutamina sintetasa | GS |
| Glutamato sintasa | GOGAT |
| Radiación ultravioleta | UVR |
| Células Vegetativas | CV |