

# **ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

## **DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO DE SODIO, pH, TASAS DE REPOSICIÓN E IRRADIANCIA EN MEDIOS DE CULTIVO BG11 SEMICONTINUOS, EN LA CIANOBACTERIA *Scytonema* sp. PROCEDENTE DEL BOSQUE DE *Polylepis pauta* DEL PÁRAMO DE PAPALLACTA.**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O  
TÍTULO DE: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR: MARCELO JAVIER GARCÍA OCHOA**

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermano, todo ha sido y será por su amor.

**Marcelo Javier García Ochoa**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por mostrarme su infinita misericordia, tan solo por el día de hoy.

A la Escuela Politécnica del Ejército, por presentarse como un verdadero reto en la búsqueda de mi superación profesional y brindarme diversas herramientas para la misma.

A la Ing. Mariela Vera, BSc. Karina Ponce, M. Sc. Alma Koch y a la Dra. Blanca Naranjo, por confiar en mí y en el trabajo llevado a cabo durante la realización del proyecto.

Al Ing. Pedro Romero, por su asesoramiento estadístico.

A Mauricio Moreno, por demostrar en más de una ocasión, su verdadera e incondicional amistad.

A Natalia, Liz Peña, Gabi O, Jessy, Andrés, Gustavo, Denisse, Fernanda y Mario, personas importantes durante el caminar de este proyecto, ya que sin su apoyo, no se hubiera podido realizar.

A mis familiares, tías (Lola y Nelly), amigos del colegio, amigos de la vida y del laboratorio, por brindarme su apoyo y comprensión durante la ejecución del trabajo.

**Marcelo Javier García Ochoa**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>CERTIFICACION</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>DECLARACION DE RESPONSABILIDAD</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>AUTORIZACIÓN</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTADO DE TABLAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTADO DE ANEXOS</b> .....	<b>12</b>
<b>RESUMEN</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>ABSTRACT</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
1.1    Formulación del problema .....	12
1.2    Justificación del problema.....	14
1.3    Objetivos de la investigación. ....	17
1.3.1    OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO .....	17
1.3.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
1.4    Marco Teórico .....	17
1.4.1    Compuestos de interés biotecnológico e industrial obtenidos a partir de cianobacterias.....	18
1.4.2    Pigmentos Fotosintéticos.....	19
1.4.3    Cianobacterias.....	22
1.4.4    Scytonema sp. ....	23
1.4.4.1    Establecimiento de cultivos y crecimiento de <i>Scytonema</i> sp.....	26
1.4.4.2    Siembra .....	28
1.4.4.3    CO <sub>2</sub> .....	28
1.4.4.4    Iluminación.....	29
1.4.4.5    pH.....	29
1.4.4.6    Tasa de Reposición .....	29
1.4.4.7    Agitación y Aireación .....	30

1.5	Sistema de hipótesis .....	30
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>		<b>30</b>
2.1	Participantes.....	30
2.2	Zona de Estudio .....	31
2.2.1	Organismo de Estudio .....	31
2.2.2	Laboratorio.....	31
2.3	Período de tiempo de investigación .....	31
2.4	Validación de métodos de cuantificación de clorofila a .....	31
2.5	Diseño Experimental.....	32
2.6	Procedimientos .....	34
2.6.1	Obtención de cepas.....	34
2.6.2	Cultivos madre.....	35
2.6.3	Condiciones de cultivo durante la fase experimental.....	36
2.6.4	Evaluación del crecimiento .....	37
2.6.4.1	Método de la Turbidez .....	37
2.6.4.1	Tasa de Crecimiento.....	38
2.6.5	Extracción de Pigmentos .....	38
2.6.5.1	Extracción de clorofila.....	38
2.6.5.2	Extracción de carotenoides.....	39
2.6.5.3	Extracción de ficocianinas .....	39
2.6.6	Determinación de las concentraciones de los metabolitos .....	40
2.6.6.1	Clorofila.....	40
2.6.6.2	Carotenoides .....	40
2.6.6.3	Ficocianinas.....	40
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....</b>		<b>40</b>
3.1	Validación de métodos de cuantificación de clorofila a .....	40
3.1	Prueba piloto .....	42
3.2	Pruebas de Homogeneidad .....	42
3.3	Cinética de crecimiento .....	42
3.4	Producción de Pigmentos.....	48
3.4.1	Ficocianina.....	48
3.4.2	Carotenoides .....	53
3.4.3	Clorofila a.....	58

3.5 Tasa de Crecimiento .....	64
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES .....</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1	Diseño experimental propuesto para la validación del método de extracción de clorofila a.....	32
Tabla 2.2	Tratamientos realizados para la evaluación de producción óptima de pigmentos en <i>Scytonema</i> sp.....	33
Tabla 3.1	Prueba de Levene de igualdad de Varianzas para las lecturas espectrofotométricas a 650 nm y 750 nm. ....	40
Tabla 3.2	Modelo de análisis multivariado de la varianza entre el método modificado y el método estándar para la extracción de clorofila a de cianobacterias.....	41
Tabla 3.3	Análisis de Varianza para las absorbancias del método de turbidez de la cianobacteria <i>Scytonema</i> sp. antes de la implementación de la tasa de reposición.....	44
Tabla 3.4	Prueba de Duncan para el día con los máximos valores de absorbancia del método de turbidez antes de la implementación de la tasa de reposición. ....	45
Tabla 3.5	Análisis de Varianza para las absorbancias del método de turbidez de la cianobacteria <i>Scytonema</i> sp.....	46
Tabla 3.6	Prueba de Duncan para el día con los máximos valores de absorbancia del método de turbidez. 47	
Tabla 3.7	Análisis de Varianza para la producción de ficocianina ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria <i>Scytonema</i> sp. antes de la implementación la tasa de reposición. ....	49
Tabla 3.8	Prueba de Duncan para el día con la mayor producción de ficocianina sin la implementación la tasa de reposición. ....	50
Tabla 3.9	Análisis de Varianza para la producción de ficocianina de la cianobacteria <i>Scytonema</i> sp. 51	
Tabla 3.10	Prueba de Duncan para el día con los máximos valores de producción de ficocianina. ....	52
Tabla 3.11	Análisis de Varianza para la producción de carotenoides de la cianobacteria <i>Scytonema</i> sp. antes de la implementación la tasa de reposición. ....	54
Tabla 3.12	Prueba de Duncan para el día con la mayor producción de carotenoides ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sin la implementación la tasa de reposición. ....	55
Tabla 3.13	Análisis de Varianza para la producción de carotenoides de la cianobacteria <i>Scytonema</i> sp. 56	

Tabla 3.14 Prueba de Duncan para el día con la mayor producción de carotenoides ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) en <i>Scytonema</i> sp. ....	57
Tabla 3.15 Análisis de Varianza para la producción de clorofila de la cianobacteria <i>Scytonema</i> sp. antes de la implementación la tasa de reposición. ....	60
Tabla 3.16 Prueba de Duncan para el día con la mayor producción de clorofila ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) sin la implementación la tasa de reposición. ....	61
Tabla 3.17 Análisis de Varianza para la producción de clorofila de la cianobacteria <i>Scytonema</i> sp. ....	62
Tabla 3.18 Prueba de Duncan para el día con la mayor producción de clorofila ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) en <i>Scytonema</i> sp. ....	63

## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1	Pigmentos fotosintéticos más importantes en los diferentes grupos de organismos con indicación de la banda de absorción de luz .....	19
Cuadro 1.2	Ubicación taxonómica de <i>Scytonema</i> sp. ....	24
Cuadro 1.3	Composición del Medio BG11 .....	28

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1	Scytonema Sp. bajo el lente 40x. ....	24
Figura 2.1	<i>Scytonema sp.</i> , en medio BG11 sólido sin nitrato de sodio. ....	35
Figura 2.2	Cultivos Madre de <i>Scytonema sp.</i> , en medio BG11 líquido. ....	36
Figura 2.3	Cultivos de <i>Scytonema sp.</i> , durante la fase experimental. ....	37
Figura 2.4	Método de Turbidez: Lectura de una muestra en el espectrofotómetro. ....	38
Figura 3.1	Prueba piloto de la cinética de crecimiento de <i>Scytonema sp.</i> a partir de los valores del método de turbidez. ....	42
Figura 3.2	Crecimiento (DO750) de la cianobacteria <i>Scytonema sp.</i> en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM. ....	43
Figura 3.3	Crecimiento (DO750) de la cianobacteria <i>Scytonema sp.</i> en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM. ....	44
Figura 3.4	Concentración de ficocianina ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria <i>Scytonema sp.</i> en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM. ....	48
Figura 3.5	Concentración de ficocianina ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria <i>Scytonema sp.</i> en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM. ....	49
Figura 3.6	Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria <i>Scytonema sp.</i> en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM. ....	53
Figura 3.7	Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria <i>Scytonema sp.</i> en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM. ....	54
Figura 3.8	Concentración de clorofila y feofitina ( $\mu\text{g}.\text{mL}$ ) de la cianobacteria <i>Scytonema sp.</i> en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM. ....	58
Figura 3.9	Concentración de clorofila y feofitina ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria <i>Scytonema sp.</i> en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM. ....	59
Figura 3.10	Concentración de clorofila y feofitina ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria <i>Scytonema sp.</i> en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM. ....	59
Figura 3.11	Tasa de crecimiento de <i>Scytonema sp.</i> bajo la influencia de los mejores factores para la producción de clorofila a, día 6 a 18. ....	64
Figura 3.12	Tasa de crecimiento de <i>Scytonema sp.</i> bajo la influencia de los mejores factores para la producción de clorofila a, día 21 a 45. ....	65

## LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Formulas empleadas en la cuantificación de pigmentos fotosintéticos. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 2. Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks y de homogeneidad de varianza de Levene para los datos obtenidos tanto de turbidez y de cuantificación de pigmentos. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 3. Gráficos de cinética de crecimiento de acuerdo al método de turbidez. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 4. Gráficos de producción de ficocianina de acuerdo a la extracción metabólica. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 5. Gráficos de producción de carotenoides de acuerdo al método de Arnon. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 6. Gráficos de producción de clorofila *a* de acuerdo al método de Arnon. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 7. Ecuación implementada para el cálculo de la tasa de reposición. **¡Error! Marcador no definido.**

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

Los pigmentos han sido utilizados a lo largo de la historia del ser humano para teñir pintura, tinta, plástico, textiles, cosméticos, alimentos y otros productos. (Rossotti, 1983).

Los primeros pigmentos conocidos fueron los minerales naturales. Los óxidos de hierro producen una amplia variedad de colores y se les puede encontrar en muchas pinturas rupestres del Paleolítico y el Neolítico. Dos ejemplos son el ocre rojo,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , y el ocre amarillo,  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Finlay, 2003; Kassinger, 2003).

Dos de los primeros pigmentos sintéticos fueron el blanco de plomo y la frita azul (azul egipcio). La revolución industrial y científica propició una gran expansión en la gama de pigmentos sintéticos, que han sido fabricados o refinados a partir de sustancias naturales, disponibles para fines comerciales, sin embargo, no es hasta mediados del siglo XX, que se comienza a regular su

uso, debido a que muchos de ellos contenían plomo, cobre y arsénico y representan riesgos muy significantes para la salud (Rossotti, 1983; Finlay, 2003; Kassinger, 2003; Six *et al.*, 2005 y Olson *et al.*, 2007).

Se ha reportado que muchos de estos productos químicos sintéticos, han causado algún tipo de efecto en la salud humana, debido a su utilización en un sinnúmero de aplicaciones industriales como en los alimentos, fármacos, productos de belleza entre otros (Comber *et al.*, 1982; Florentino, 2009).

Recientemente, La FSA (British Food Standards Agency) ha recomendado sustituir seis pigmentos sintéticos debido a los descubrimientos del “estudio Southampton” (McCan *et al.*, 2007). El estudio concluye que los pigmentos sintéticos pueden agravar la hiperactividad en los niños.

Desde que el estudio fue publicado, muchos fabricantes han empezado a reemplazar los pigmentos sintéticos con versiones naturales y este cambio puede aumentar porque recientemente 42 organizaciones en toda Europa han sido llamadas por la comisión de la UE para prohibir los pigmentos artificiales. Los colorantes en cuestión son: Tartrazina (E-102), amarillo quinoleína (E-104), amarillo oca (E-110), azorubina, carmoisina (E122), Ponceau 4R (E124) y Rojo allura (E129). Las organizaciones que respaldan la prohibición sobre los ingredientes “puramente cosméticos” son asociaciones de consumidores, organizaciones de alimentos y grupos de salud (Raabjerg, 2008).

El mercado a nivel mundial de pigmentos tuvo una producción total de 7.4 millones de toneladas para el año 2006. Se estima que para el 2016 alcanzará un valor de alrededor de 9.8 millones de toneladas. A finales del siglo XX, el mercado ha sufrido un cambio en donde se muestra una fuerte tendencia hacia el consumo de productos de origen natural. El mercado de los pigmentos naturales reporta un crecimiento del 4% anual a nivel mundial y de acuerdo al departamento de desarrollo de mercado de Phytone LTD (empresa fabricante de colorantes naturales, derivados para la industria alimentaria y uno de los mayores productores del mundo de clorofila, con sede en el Reino

Unido) existe un mercado potencial en la unión europea de 350 millones y en Estados Unidos de 250 millones de personas. El consumo de aditivos alimentarios de origen natural se ha incrementado con mayor velocidad en la Unión Europea que en Estados Unidos. Uno de los ejemplos más claros es el carmín. En los años '80 Perú exportaba 236 Ton /año a Europa; sin embargo, a mediados de los '90 las exportaciones llegaron a 1700 Ton /año, y es importante considerar que Perú produce el 85% de cochinilla en el mundo (Rossotti, 1983; Finlay, 2003; Kassinger, 2003; Six *et al.*, 2005 y Olson *et al.*, 2007).

Por estas razones, se hace necesario implementar nuevas fuentes de componentes que sean más amigables con el ambiente. Diversos estudios señalan como posible fuente de estos componentes a los microorganismos fotosintéticos, de los cuales se puede extraer, escalar y comercializar diversos compuestos específicos de su metabolismo (Becker *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 2002; Colyer *et al.*, 2005).

Las cianobacterias del género *Scytonema* sp. son microorganismos que presentan en las distintas fases de su metabolismo la producción de pigmentos naturales gracias a su proceso fotosintético oxigénico (Garbisu *et al.*, 1999; Morales, 2002; Loreto, 2003).

En este sentido y como parte del proyecto de investigación “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”, implementado por parte de Investigadores y tesis de la ESPE, se obtuvieron distintos consorcios y cepas aisladas, entre los cuales se encuentra el género *Scytonema* sp., por lo que se realizó un estudio de continuación con el fin de determinar futuras aplicaciones biotecnológicas de dicha cianobacteria obtenida y mantenida en el laboratorio de Microbiología Ambiental.

## **1.2 Justificación del problema**

Diversas cepas de cianobacterias presentan la capacidad de producir compuestos de interés comercial de acuerdo a sus características fisiológicas y de las condiciones de cultivo (Vonshak, 1987; Hernández *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2000; Mundt *et al.*, 2001).

Para mejorar la eficiencia en cuanto a la producción de pigmentos, proteínas o de metabolitos con actividad biológica, es necesario optimizar su crecimiento en función de la temperatura, irradiancia, agitación, concentración y naturaleza de nutrientes en condiciones de laboratorio (Brownell, 1967; Hoffmann, 1988; Albertano, 2000; Morales, 2002; Loreto, 2003; Loreto, 2004; Tang, 2007).

Industrialmente, el cultivo de microorganismos fotosintéticos o fijadores de nitrógeno se presenta como una vía alternativa para la producción biológica de pigmentos, vitaminas, proteínas, toxinas, biofertilizantes, entre otras sustancias de interés comercial (Garbisu *et al.*, 1999). Para un posible escalamiento de las mismas, es menester empezar desde la mínima etapa posible, a través del análisis y obtención de datos a nivel de laboratorio.

Encontramos que en el orden de Nostocales, existen muchos estudios, sobre todo de las cepas de *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp., enfocados en concentraciones óptimas de fuente de nitrógeno, irradiancia, pH, salinidad entre otros (Morales, 2002; Loreto, 2003; Loreto, 2004; Coello, 2008).

Entre las cianobacterias del orden de las Nostocales, se destaca *Scytonema* sp., que pertenece a la familia Scytonemataceae y es de tipo filamentosa, formada por tricomas recubiertos por una vaina bien definida, pigmentada y estratificada. Lo característico de este género son las pseudoramificaciones dobles (Komarek *et al.*, 1989; Zaccaro, 2006).

Actualmente existen muy pocos estudios al respecto, de las posibilidades a nivel de laboratorio o industrial. Se ha descrito su utilidad como biofertilizante (Sathiyamoorthy *et al.*, 1996), fuente de pigmentos (Loreto *et al.*, 2004) y de antibióticos (Bokesch *et al.*, 2003). En nuestro país, no se ha encontrado investigación respecto a dicha cepa.

Entre los pigmentos accesorios que están presentes en *Scytonema* sp. encontramos a las clorofilas, los carotenoides y las ficobiliproteínas, los cuales cumplen un papel fundamental durante la captación de la energía luminosa y su posterior transformación en energía química mediante el proceso de fotosíntesis (Bold *et al.*, 1985; Komarek *et al.*, 1989; Zaccaro, 2006).

Los pigmentos accesorios actúan como catalizadores acelerando o facilitando las diversas reacciones químicas presentes en los procesos biológicos. Estas sustancias no solo podrían actuar como posibles fuentes para la industria cosmética y alimenticia ya que diversos estudios han reportado su utilidad médica, como es el caso de la clorofila, que es utilizada para: combatir problemas de mal aliento, eliminar olores desagradables en transpiración, orina y materia fecal, como elemento cicatrizante, bloqueador del efecto varias sustancias que se relacionan con el envejecimiento prematuro de los tejidos y el surgimiento de células cancerosas, entre otros beneficios (Marker, 1972; Marker, 1980; Lawlor, 1993; Chorus *et al.*, 1999; Albertano *et al.*, 2000).

A su vez, los carotenoides están implicados en la síntesis de la vitamina A, que tiene un importante papel en la visión y el crecimiento (Parsons *et al.*, 1963).

En cuanto a la ficocianina (ficobiliproteína), se reporta su utilidad como aditivo en preparados congelados, bebidas ligeras, productos con leche, caramelos y helados (Cohen, 1986; Borowitzka, 1988; Richmond, 1990), trazador bioquímico en inmunoensayos (Herrera *et al.*, 1989), entre otros. Se ha reportado a su vez, una posible aplicación medicinal de la misma, como agente antioxidante (Romay *et al.*, 2001).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se podría cuantificar de diversas formas el potencial industrial de la generación de pigmentos a partir de microorganismos endémicos (en este caso, *Scytonema* sp.); ya que, gracias a diversos estudios (Morales *et al.*, 2002; Loreto *et al.*, 2003; Loreto *et al.*, 2004) y a variables analizables a nivel de laboratorio (fuente de nitrógeno, pH,

intensidad lumínica, entre otros), se puede optimizar y extrapolar de una manera adecuada dichos procesos a una producción a gran escala.

### **1.3 Objetivos de la investigación.**

#### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO**

- Determinar la cinética de crecimiento y producción de pigmentos en función de la concentración de nitrato de sodio, pH, tasas de reposición e irradiancia en medios de cultivo BG11 semicontinuos, en la cianobacteria *Scytonema* sp., procedente del bosque de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta

#### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estimar la cinética de crecimiento a través del método de turbidez ( $DO_{750}$ ).
- Establecer la tasa de crecimiento en función de la producción de pigmentos de clorofila *a*.
- Precisar la concentración de  $NaNO_3$ , el pH, la tasa de reposición e irradiancia óptimos para el crecimiento de *Scytonema* sp.
- Aplicar el método de Arnon y la extracción metabólica para la obtención de pigmentos: clorofila *a*, carotenoides y ficocianina.
- Cuantificar la producción óptima de pigmentos (clorofila *a*, carotenoides y ficocianina) y biomasa, mediante absorbancia espectrofotométrica.

### **1.4 Marco Teórico**

#### **1.4.1 Compuestos de interés biotecnológico e industrial obtenidos a partir de cianobacterias**

Diversas cepas de cianobacterias presentan la capacidad de producir compuestos de interés comercial de acuerdo a sus características fisiológicas y de las condiciones de cultivo (Vonshak, 1987; Hernández et al., 1998, Vieira et al., 2000; Mundt et al., 2001).

Desde la antigüedad y mediante una utilización empírica, la biomasa de cianobacterias ha constituido una excelente fuente de alimento, para de esta forma complementar, la dieta tanto de animales como de humanos. Desde tiempos remotos, pueblos que vivían en los alrededores de lagos con aguas ricas en carbonato y bicarbonato sódico se han alimentado de la biomasa cianobacteriana que sobre los mismos ha proliferado (*Spirulina platensis*, *Spirulina máxima*). Existe evidencia histórica de su uso entre los aztecas del lago Texcoco en México y algunas poblaciones norteafricanas del lago Chad, donde era muy común su consumo. A su vez, se tiene antecedentes de la utilización de especies como *Nostoc* en Perú y zonas de Asia Oriental y de *Mycrocystis* en Pakistán y la India (Garbisu et al., 1999; Abdulqader et al., 2000; Paniagua-Michael et al., 2004; Cifuentes-Lemus et al., 2005).

Con el advenimiento de la era industrial y la búsqueda de fuentes alternativas para la obtención y manipulación de componentes de interés, es en 1890, que el microbiólogo Beijerinck, uno de los pioneros en realizar estudios científicos en cuanto a microorganismos que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos, estableció cultivos del alga verde azulada *Chlorella vulgaris* (Abalde et al., 1995). Actualmente géneros como *Spirulina* sp. o *Anabaena* sp. han sido altamente estudiados al respecto (Chini, 1996; Ding – Mei, 1997; Loreto, 2003).

Las cianobacterias han adquirido una amplia gama de usos a nivel industrial, gracias a diversas investigaciones exhaustivas se las puede emplear cada vez más como fuente de pigmentos naturales, vitaminas y ácidos grasos, así como para la obtención de aditivos utilizados en fórmulas farmacéuticas,

alimentos, proteínas, lípidos, producción de ARN polimerasas, biofertilizantes, remediación de efluentes y suelos contaminados, alimento para moluscos, microcrustáceos, (*Artemia* sp.) peces en los cuales ayuda a mantener sana su piel e intensifica la coloración de la misma, además de incrementar las tasas de crecimiento, supervivencia y fertilidad; así también se las ha utilizado como alimento para aves de ornato, para gatos y perros, entre otros (Kosaric *et al.*, 1974; Fábregas *et al.*, 1984; Vekataraman, 1986; Abalde *et al.*, 1995; Chetsumon, 1995; Lau *et al.*, 1995; Robledo, 1997; Loreto *et al.*, 2003; Olaizola, 2003; Henrikson, 2005).

#### 1.4.2 Pigmentos Fotosintéticos

Un pigmento es un material que cambia el color de la luz que refleja como resultado de la absorción selectiva del color. Muchos materiales selectivamente absorben ciertas ondas de luz, dependiendo de su longitud de onda (Rossotti, 1983; Finlay, 2003; Kassinger, 2003).

A su vez, los pigmentos fotosintéticos son lípidos que se hayan unidos a proteínas presentes en algunas membranas plasmáticas, y que se caracterizan por presentar alternancia de enlaces sencillos con enlaces dobles. Esto se relaciona con su capacidad de aprovechamiento de la luz para iniciar reacciones químicas y con poseer color propio. En las plantas se encuentran las clorofilas y los carotenoides; en las cianobacterias y las algas rojas (Cuadro 1.1) también existe ficocianina y ficoeritrina y finalmente, en las bacterias fotosintéticas está la bacterioclorofila (Marker, 1980; Lawlor, 1993; Albertano *et al.*, 2000).

**Cuadro 1.1 Pigmentos fotosintéticos más importantes en los diferentes grupos de organismos con indicación de la banda de absorción de luz (Modificado de Lawlor, 1993).**

Organismo	Pigmento primario	Pigmento(s) accesorio(s)	Longitud de onda absorbida (nm)
<b>Procariotas</b>			
<b>Bacterias</b>	Clorofila a	Clorofila b	Azul-violeta a rojo 470 –

<b>purpúreas</b>			750 nm Azul-violeta a rojo 470 – 1020 nm
<b>Bacterias verdes sulfureas</b>	Clorofila a	Clorofila c	Azul a rojo 470 –750 nm
<b>Cianobacterias</b>	Clorofila a	Ficocianina Ficoeritrina Aloficocianina	Violeta-azul a naranja-rojo 415 – 670 Naranja 630 Verde 570 Rojo 650
<b>Eucariotas</b>			
<b>Algas rojas</b>	Clorofila a	Ficocianina Ficoeritrina Aloficocianina	Violeta-azul a naranja-rojo 415 – 670 Naranja 630 Verde 570 Rojo 650
<b>Algas marrones</b>	Clorofila a	Clorofila c	Violeta-azul a rojo
<b>Algas verdes, musgos y plantas vasculares</b>	Clorofila a	Clorofila b Carotenos $\alpha$ y $\beta$ Xantofilas	Violeta-azul a naranja-rojo 454 – 670 Azul-verde 450

La clorofila está formada por un anillo porfirínico con un átomo de magnesio en el centro, asociado a un metanol y a un fitol (monoalcohol, compuesto de veinte carbonos). Se distinguen dos variedades de clorofila: la clorofila a, que alberga un grupo metilo en el tercer carbono porfirínico y que absorbe luz de longitud de onda cercana a 630 nm, y la clorofila b, que contiene un grupo formilo y que absorbe a 660 nm (Marker, 1980; Lawlor, 1993; Albertano *et al.*, 2000).

La clorofila puede sufrir distintos tipos de alteraciones. La más frecuente, y la más perjudicial, es la pérdida del átomo de magnesio, formando la llamada

feofitina, de un color verde oliva con tonos marrones, en lugar del verde brillante de la clorofila. Esta pérdida del magnesio se produce por sustitución por dos iones  $H^+$ , y consecuentemente se ve favorecida por el medio ácido (Marker, 1972; Chorus *et al.*, 1999).

La concentración de clorofila a nivel de laboratorio puede ser sobreestimada cuando en el análisis espectrofotométrico no se discrimina entre la clorofila y sus productos de degradación. La feofitina es un producto de degradación de la clorofila cuya región de absorción máxima coincide con la del pigmento parental. Se puede determinar la concentración de clorofila y de feofitina en una muestra de agua acidificando el extracto. La adición de ácido al extracto causa que la clorofila presente pierda su átomo de magnesio convirtiéndose en feofitina (Yentsch *et al.*, 1963; Marker, 1972).

Los carotenoides son isoprenoides y absorben luz de 440 nm, pudiendo ser de dos clases: los carotenos, que son de color rojo y las xantófilas, derivados oxigenados de los nombrados anteriormente, que son de color amarillento. Su color, que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro, se encuentra directamente relacionado con su estructura: los enlaces dobles carbono-carbono interactúan entre sí en un proceso llamado conjugación (Morales *et al.*, 2002; Loreto *et al.*, 2003).

Mientras el número de enlaces dobles conjugados aumenta, la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza. Por ejemplo, el fitoeno que posee únicamente tres enlaces dobles conjugados absorbe luz en el rango ultravioleta y apareciendo por tanto incoloro a la vista, el licopeno, compuesto que confiere su color rojo al tomate contiene 11 enlaces dobles conjugados. Existen también carotenoides de color verde,  $\zeta$ -caroteno, amarillo,  $\beta$ -caroteno, y anaranjado, neurosporaxantina (Tandeau *et al.*, 1993).

En organismos fotosintéticos los carotenoides desempeñan un papel vital en los centros de reacción, ya sea participando en el proceso de transferencia de energía, o protegiendo el centro de reacción contra la

autooxidación. En los organismos no fotosintéticos, los carotenoides han sido vinculados a los mecanismos de prevención de la oxidación (Alberte, 1984; Chamorro *et al.*, 2002; Olvera *et al.*, 2003).

La ficocianina es el pigmento ficobilínico azul libre de metal en una cromoproteína conjugada de algas azules-verdosas. Funciona como sustancia que absorbe la luz, junto con la clorofila: absorbe la luz anaranjada y la roja, particularmente cerca de 620 nm (dependiendo de cual tipo específico se trate), y emite fluorescencia cerca de 650 nm (Fay, 1983; Apt *et al.*, 1999; Olvera *et al.*, 2003).

Actualmente, las ficocianinas están siendo utilizadas como colorantes naturales en la industria alimentaria y de cosméticos. La ficocianina de *Spirulina* es comercializada por la compañía Dainippon Ink & Chemicals de Japón; se sugiere como aditivo en preparados congelados, bebidas ligeras, productos con leche, caramelos y helados. Esta compañía ha descrito el tampón para la extracción del pigmento de *Spirulina* y su tratamiento con un solvente orgánico; el pigmento azul así obtenido se utiliza en cosméticos, pues como no es soluble en agua no se extiende por efecto de la humedad (Cohen, 1986; Borowitzka, 1988; Richmond, 1990).

La ficocianina pura es comercializada por Cyanotech Corporation con altos precios para su utilización en pequeñas cantidades como trazador bioquímico en inmunoensayos, microscopía y citometría (Herrera *et al.*, 1989).

### **1.4.3 Cianobacterias**

Las cianobacterias son microorganismos procariontes, aeróbicos y fotoautótrofos, cuyas células generalmente miden sólo unos micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro, pero son más grandes que lo típico de otras bacterias (Schopf, 1993; Golubic, 1999; Schopf, 2000; Svenning *et al.*, 2005).

La fotosíntesis oxigénica es su principal modo de obtención de energía; la misma ha conformado la evolución de la biosfera terrestre (Bennet *et al.*, 1973; Ripkka, 1988; Van den Hoek, 1995; Chapman *et al.*, 2000).

Aunque la generalidad de las cianobacterias puede fijar nitrógeno, sólo algunas tienen células especializadas para esta función llamadas heterocistos, más grandes y con una pared engrosada con celulosa (Ripkka, 1988; Van den Hoek, 1995, Becker, 1995; Garbisu *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 2000).

Su facilidad de crecimiento favorece su aparición tanto en el suelo como en el medio acuático, preferentemente en los ambientes dulceacuícolas de aguas alcalinas o neutras, con pH entre 6 y 9; y temperaturas entre 15 y 30°C. Prefieren una alta concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo (Becker, 1995; Garbisu *et al.*, 1999).

Las cianobacterias se adaptan a ambientes muy adversos para otros microorganismos, bajo condiciones diversas en cuanto a nutrientes, luz, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, contaminantes industriales, metales pesados entre otros (Rai, 1997, Boone *et al.*, 2001; Lañez, 2008).

#### **1.4.4 Scytonema sp.**

Las cianobacterias filamentosas presentan diferenciación celular como heterocistos para la fijación de nitrógeno, acinetos para supervivencia en condiciones adversas y hormogonios para su desplazamiento (Rai *et al.*, 1997).

Una bacteria que pertenece al mismo orden de *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp., es la cianobacteria *Scytonema* sp. (Cuadro 1.2) la cual es una cianobacteria filamentosas formada por tricomas recubiertos por una vaina bien definida, pigmentada y estratificada. Lo característico de este género son las pseudoramificaciones dobles (Zaccaro, 2006).

**Cuadro 1.2 Ubicación taxonómica de *Scytonema* sp. (*Global Biodiversity Information Facility, 2010*).**

<b>Dominio: Bacteria</b>
<b>Phylum: Cyanobacteria</b>
<b>Clase: Hormogoneae</b>
<b>Orden: Nostocales</b>
<b>Familia: Scytonemataceae</b>
<b>Género: <i>Scytonema</i> sp.</b>

Los tricomas del género *Scytonema* sp. son siempre isopolares. Las células apicales son redondeadas, a veces con más o menos células terminales esféricas que presentan vacuolas (Bold *et al.*, 1985; Komarek *et al.*, 1989; Zaccaro, 2006).

Las falsas ramificaciones se producen estricta y obligatoriamente en *Scytonema* sp. (Figura 1.1) y por lo general se originan después de la desintegración de un tricoma entre dos células vegetativas y en otras ocasiones, después de la muerte de una o varias células vegetativas (Bold *et al.*, 1985; Komarek *et al.*, 1989; Zaccaro, 2006).



**Figura 1.1 *Scytonema* Sp. bajo el lente 40x.**

Desde los tricomas divididos surgen dos ramificaciones que crecen hacia los lados. Al inicio de la ramificación, generalmente no existe conexión alguna con un heterocisto. Según lo observado en cultivos bajo condiciones de laboratorio, los heterocistos de *Scytonema* sp. se encuentran siempre

intercalados, mientras que los acinetos se encuentran de forma facultativa (Bold *et al.*, 1985; Komarek *et al.*, 1989; Zaccaro, 2006).

La división celular en este género siempre procede de forma perpendicular a lo largo del eje del tricoma, presentándose el desarrollo de tricomas uniseriados. *Scytonema* sp. es un género usualmente subaéreo o terrestre, aunque también se lo localiza flotando libremente en ambiente acuáticos. Suele crecer sobre piedras húmedas, madera y suelo (Bold *et al.*, 1985; Komarek *et al.*, 1989; Zaccaro, 2006).

El citoplasma presenta estructuras reconocibles como los carboxisomas (corpúsculos que contienen la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa RuBisCO), gránulos de glucógeno, gránulos de cianoficina, gránulos de polifosfato, vesículas gasíferas o de gas (llenas de gas, que presentan algunas cianobacterias), tilacoides y vesículas aplastadas formadas por invaginación de la membrana plasmática (con la que conservan comunicación o contacto) donde reside el aparato molecular de la fotosíntesis (Abalde *et al.*, 1995; Garbisu *et al.*, 1999; Bermudez *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2006).

Estudios como el de Patterson, *et al.*, 1994, han permitido determinar los efectos de las concentraciones de los principales nutrientes (como nitrógenos, azufre, fósforo, la fuente de carbono inorgánico, iones sodio, potasio, magnesio y calcio) y de diversos tampones orgánicos (como reguladores de pH) en el crecimiento y la acumulación de metabolitos secundarios en la cepa *Scytonema ocellatum* FF-66-3. Las concentraciones de calcio superiores a las necesarias para el crecimiento (0,1 mM) estimularon la acumulación de dichos pigmentos. Las concentraciones de carbonato de sodio en exceso (0,25 mM) fueron un factor inhibitorio del crecimiento de la cepa. A su vez, el amonio como fuente de nitrógeno inhibió el crecimiento y la formación de diversos productos en una concentración de 2.5 mM.

En el estudio de Zapomělová *et al.*, 2008; se analizó a siete cianobacterias nostocales. Su variabilidad morfológica fue alta, pero sólo algunas de las características mostraron cambios que reflejan las condiciones

de crecimiento de acuerdo a las variables. La frecuencia de aparición de heterocistos disminuyó con el aumento de la concentración de nitrógeno. Para el caso específico de las nostocales estudiadas, la abundancia de células muertas aumentó de forma lineal en relación al aumento en la variación de temperatura y de irradiancia.

En cambio, el efecto de las condiciones experimentales en las dimensiones de las células vegetativas y heterocistos no tuvo mayor incidencia. Su variabilidad fue notablemente más alta dentro de cada tratamiento experimental que entre los tratamientos.

El análisis de Tang *et al.*, 2007; sobre *Scytonema javanicum*, se centró en las estrategias que utiliza la cepa al ser sometida a cambios bruscos en cuanto a salinidad se refiere. También se determinó la producción de metabolitos secundarios y diversos parámetros fisiológicos y bioquímicos como la tasa de crecimientos y la relación entre la variación en la irradiancia con la máxima irradiancia tolerada.

Los resultados obtenidos demuestran que 50 mM de cloruro de calcio inhiben el crecimiento de la cepa en el medio BG110, sin embargo; esta condición dispara la producción de metabolitos que tratan de evitar el daño oxidativo y la peroxidación de los lípidos, demostrando las habilidades de supervivencia de *Scytonema javanicum* bajo condiciones extremas.

En el caso de *Scytonema* sp., al ser una cepa purificada y endémica, es menester investigar alternativas válidas para la obtención de metabolitos, a partir de su manipulación. El presente estudio pretende proporcionar una referencia de las condiciones de cultivo más apropiadas para el desarrollo de *Scytonema* sp. proveniente del páramo andino ecuatoriano.

#### **1.4.4.1 Establecimiento de cultivos y crecimiento de *Scytonema* sp.**

Los cultivos de *Scytonema* sp. necesitan de ciertos elementos tanto orgánicos como inorgánicos y a su vez de ciertas condiciones básicas para un

óptimo desarrollo y producción de metabolitos secundarios. Existen diversas formulaciones de medios de cultivos y variaciones de los mismos con el fin de permitir el crecimiento y mantenimiento a nivel de laboratorio (Fábregas *et al.*, 1984; Patterson *et al.*, 2004)

Muchas de estas formulaciones toman en consideración parámetros como la concentración total de sal (dependiendo del origen ecológico del organismo), la composición y concentración de los componentes iónicos mayoritarios tales como el K, Mg, Na, Ca, sulfato y fosfato, si el crecimiento es o no dependiente de la disponibilidad de una fuente de nitrógeno, la fuente de carbono, pH óptimo, elementos traza, agentes quelantes, vitaminas, entre otros (Fábregas *et al.*, 1984, Rippka, 1988 Zapomělová, 2008).

El medio BG-11 (Cuadro 1.3) permite el crecimiento de una gran variedad de cianobacterias de suelo y agua dulce y se utiliza habitualmente para los estudios con *Scytonema* sp. Este medio utiliza elevadas concentraciones de nitrato y concentraciones de fósforo relativamente bajas. La concentración de nitratos suele disminuirse incluso hasta carecer totalmente de nitratos (medio BG-11<sub>0</sub>) con la finalidad de estimular el crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, como es el caso de *Scytonema* sp. (Rippka, 1988; Reynaud *et al.*, 1986; Rosales *et al.*, 2006).

**Cuadro 1.3 Composición del Medio BG11 (Rippka, 1988).**

<b>MACRONUTRIENTES</b>	mM
NaNO <sub>3</sub>	17.65
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.18
MgSO <sub>4</sub>	0.30
CaCl <sub>2</sub>	0.25
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.19
EDTA	0.003
Ácido cítrico	0.029
Citrato de amonio férrico	0.030
<b>METALES TRAZA</b>	g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.22
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.39
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.049

#### **1.4.4.2 Siembra**

La manipulación de los cultivos de *Scytonema* sp. (siembras, resiembras, aislamiento o separación de cepas, limpieza de cultivos) así como la preparación de los medios de cultivos se realizan de forma que se evita la contaminación de los cultivos por bacterias o por eucariotas (Rippka, 1988; Fábregas *et al.*, 1995; Rosales *et al.*, 2006).

#### **1.4.4.3 CO<sub>2</sub>**

Un factor a tener en cuenta al cultivar *Scytonema* sp. es el suministro de CO<sub>2</sub>; generalmente el CO<sub>2</sub> del aire es suficiente para los requerimientos de estos organismos, aunque puede ser necesario facilitar el intercambio gaseoso con el medio de cultivo (agitación, burbujeo) o el enriquecimiento de este gas

en la mezcla gaseosa. El medio de cultivo muchas veces viene enriquecido con una fuente de carbono (Martínez *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 2002)

#### **1.4.4.4 Iluminación**

Se ha hecho habitual la utilización de luces fluorescentes (luz fría) en el crecimiento de *Scytonema* sp. La iluminación es indispensable y determinante en el proceso de crecimiento y de fotosíntesis ya que un filamento individual de *Scytonema* sp. generalmente no puede soportar una exposición prolongada a la iluminación y el mismo podría ser destruido por fotólisis. De ahí la necesidad de mantener la iluminación controlada por foto – períodos regulados de tiempo (horas de luz-horas de oscuridad). Cada período genera distintas reacciones: en las horas de luz, se favorece la asimilación de CO<sub>2</sub> a través del ciclo de Calvin, lo que permite la formación de material de reserva de la célula, durante las horas de oscuridad ocurren reacciones bioquímicas de síntesis de material proteico. La intensidad de luz utilizada para el crecimiento de *Scytonema* sp. en el laboratorio es de entre 2000 a 11000 kluxes. Es importante tener en cuenta la siguiente equivalencia, 1 lux = 0,01953 μmolquanta/m<sup>2</sup>s (González, 1995; Archer *et al.*, 1997; Zapomělová, 2008).

#### **1.4.4.5 pH**

La medida de pH en el medio de cultivo es una referencia clave para el desarrollo de los cultivos cianobacterianos y de *Scytonema* sp. El medio de cultivo tiende a alcalinizarse por el consumo de la fuente de carbono. El valor del pH determina entre otros factores la solubilidad del CO<sub>2</sub> y algunos minerales que inciden directamente en el crecimiento de las cianobacterias. El rango de pH de crecimiento óptimo para la mayoría de cianobacterias se ubica entre 8 a 11 (Albertano, 2000; Pelizer, 2002; Berry, 2003).

#### **1.4.4.6 Tasa de Reposición**

Se puede definir como la tasa en la cual un volumen indicado del medio de cultivo que se esté empleando para el crecimiento de un microorganismo, sea retirado y reemplazado con un volumen igual de medio fresco, con el

objetivo de retirar biomasa lista para ser cosechada y permitiendo de esta forma que los microorganismos aún presentes en el medio, puedan continuar reproduciéndose y produciendo metabolitos de interés, en un intervalo de tiempo conocido (Fábregas *et al.*, 1995, Fábregas *et al.*, 1998).

#### **1.4.4.7 Agitación y Aireación**

Es indispensable una adecuada agitación y aireación en los cultivos de cianobacterias. A nivel de laboratorio, generalmente el proceso de aireación permite tener de por sí, una adecuada agitación, a través de la inyección de aire con un compresor de acuario, con lo cual se pretende favorecer la dispersión homogénea de la cianobacteria en el líquido y a la exposición a la luz por parte de todos los filamentos, manteniendo activo el mecanismo fotosintético (González, 1995; Sánchez, 2003).

### **1.5 Sistema de hipótesis**

La variación de la fuente de nitrato, de pH, de las tasas de reposición e irradiancia en cultivos semicontinuos en la cianobacteria *Scytonema* sp., procedente de la filosfera de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta, tiene un efecto sobre su crecimiento y genera biomasa cianobacteriana con diferente contenido de clorofila a, carotenoides y ficocianina.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes**

Escuela Politécnica del Ejército: Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología y el Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI), en el cual se encuentra el Laboratorio de Microbiología Ambiental, donde se realizaron los distintos ensayos que permitieron el desarrollo de la investigación.

Mariela Vera, Ing., directora de Tesis, BSc. Karina Ponce, co-directora de tesis, Ing. Pedro Romero, asesoramiento estadístico y Alma Koch MSc.,

quien facilitó el espacio, material, asesoría en el laboratorio y revisión del documento escrito.

Ing. Mauricio Moreno, quien aportó con su experiencia previa en la investigación con microorganismos fotosintéticos.

Srta. Lizette Peña, quien colaboró en la etapa investigativa de la tesis.

## **2.2 Zona de Estudio**

### **2.2.1 Organismo de Estudio**

El proyecto de investigación “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”, ejecutado por parte de Investigadores, tesis de la ESPE y dirigido por Alma Koch, obtuvo distintos consorcios y cepas aisladas, entre las cuales se encuentra el género *Scytonema* sp., la misma que fue utilizada en el presente proyecto, como continuación del tema de investigación, una vez finalizado el proyecto formalmente.

### **2.2.2 Laboratorio**

Laboratorio de Microbiología Ambiental del CEINCI de la Escuela Politécnica del Ejército, donde se efectuó la investigación.

## **2.3 Período de tiempo de investigación**

El trabajo fue realizado entre los meses de Agosto de 2009 y Junio de 2010,

## **2.4 Validación de métodos de cuantificación de clorofila a**

Con el fin de optimizar los métodos a las condiciones del laboratorio de Microbiología, se implementó un DCA para los métodos de cuantificación de clorofila a descritos por Arnon (1949), Marker (1972) y Chorus *et al.* (1999), en medio BG11 8 mM. Los factores y niveles se muestran en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1 Diseño experimental propuesto para la validación del método de extracción de clorofila a.**

FACTOR	NIVELES
Irradiancia	5 kluxes
	8 kluxes
	11 kluxes

Se diseñaron dos ensayos extractivos para la clorofila a: con etanol y metanol, con cinco repeticiones; de esta forma se determinó si existió diferencia estadística al utilizar estos compuestos indistintamente para las metodologías extractivas y variantes del método originalmente planteado por Arnon en 1949. Los datos obtenidos fueron analizados mediante modelos de análisis multivariados de la varianza, procedimiento equivalente a la *t de Student* para más de dos muestras y dos factores, con el programa SPSS 18.0.

## 2.5 Diseño Experimental

Luego de validar la metodología propuesta para la extracción del pigmento clorofila a, se implementó el diseño experimental.

Las metodologías de extracción de carotenoides y ficocianina fueron realizadas según lo señala la bibliografía consultada.

Los datos derivados de la presente investigación fueron de carácter cuantitativo expresados en valores espectrofotométricos y transformados mediante fórmulas (Bennet *et al.*, 1973; Strickland *et al.*, 1972; Chorus *et al.*,

1999); analizados mediante un Diseño Factorial 2x2x2x3 con 24 tratamientos y tres repeticiones para cada uno de ellos (Tabla 2.2) realizándose también, pruebas de comparación de medias de Bonferroni, Scheffe, Tukey y Duncan con el programa SPSS 18.0.

**Tratamientos realizados para la evaluación de producción óptima de pigmentos en *Scytonema* sp.**

<b>Número</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
1	L5P6N0R1	5 kluxes, pH 6, BG11 0, 10% TR.
2	L5P6N0R2	5 kluxes, pH 6, BG11 0, 30% TR.
3	L5P6N8R1	5 kluxes, pH 6, BG11 8, 10% TR.
4	L5P6N8R2	5 kluxes, pH 6, BG11 0, 30% TR.
5	L5P8N0R1	5 kluxes, pH 8, BG11 0, 10% TR.

6	L5P8N0R2	5 kluxes, pH 8, BG11 0, 30% TR.
7	L5P8N8R1	5 kluxes, pH 8, BG11 8, 10% TR.
8	L5P8N8R2	5 kluxes, pH 8, BG11 0, 30% TR.
9	L5P10N0R1	5 kluxes, pH 10, BG11 0, 10% TR.
10	L5P10N0R2	5 kluxes, pH 10, BG11 0, 30% TR.
11	L5P10N8R1	5 kluxes, pH 10, BG11 8, 10% TR.
12	L5P10N8R2	5 kluxes, pH 10, BG11 0, 30% TR.
13	L11P6N0R2	11 kluxes, pH 6, BG11 0, 10% TR.
14	L11P6N0R1	11 kluxes, pH 6, BG11 0, 30% TR.
15	L11P6N8R1	11 kluxes, pH 6, BG11 8, 10% TR.
16	L11P6N8R2	11 kluxes, pH 6, BG11 0, 30% TR.
17	L11P8N0R2	11 kluxes, pH 8, BG11 0, 10% TR.
18	L11P8N0R1	11 kluxes, pH 8, BG11 0, 30% TR.
19	L11P8N8R1	11 kluxes, pH 8, BG11 8, 10% TR.
20	L11P8N8R2	11 kluxes, pH 8, BG11 0, 30% TR.
21	L11P10N0R2	11 kluxes, pH 10, BG11 0, 10% TR.
22	L11P10N0R1	11 kluxes, pH 10, BG11 0, 30% TR.
23	L11P10N8R1	11 kluxes, pH 10, BG11 8, 10% TR.
24	L11P10N8R2	11 kluxes, pH 10, BG11 0, 30% TR.

**\*TR: Tasa de Reposición.**

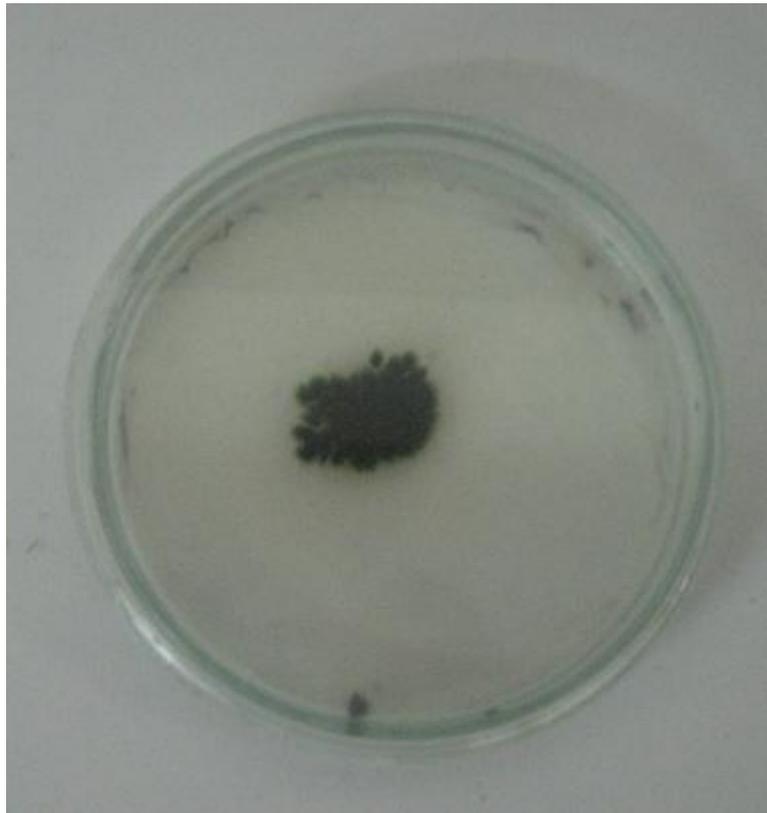
Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y un modelo lineal multivariante, con el fin de establecer las posibles interacciones del factor tratamiento en cada uno de sus niveles: irradiancia (2), pH (3), presencia de una fuente de nitrógeno (2) y tasa de reposición (2), para los factores carotenoides, ficocianina y clorofila. A su vez, se efectuó un modelo lineal mutivariante.

## **2.6 Procedimientos**

### **2.6.1 Obtención de cepas**

Las cepas de *Scytonema* sp. (Figura 2.1), que se utilizaron en los bioensayos, fueron cepas previamente aisladas del Proyecto “Condiciones óptimas de crecimiento de cianobacterias en cultivo mixto procedentes de la

filósfera de Bosques Nativos de *Polylepis pauta*”, realizado por Koch *et al.*, 2007.



**Figura 2.1** *Scytonema* sp., en medio BG11 sólido sin nitrato de sodio.

### 2.6.2 Cultivos madre

Los cultivos madre (Figura 2.2) fueron realizados por cuadruplicado, a partir de la cepa *Scytonema* sp., purificada y perteneciente al cepario de cianobacterias del laboratorio de Microbiología Ambiental, provenientes de bosques nativos del páramo de Papallacta de *Polylepis pauta*.



## **Figura 2.2 Cultivos Madre de *Scytonema* sp., en medio BG11 líquido.**

Los cultivos, fueron mantenidos en medio líquido BG11 (Rippka, 1988), con un fotoperíodo de 16:8 (16 horas de luz, 8 de oscuridad) con una irradiancia de aproximadamente 1000 Lux, a 20 °C de temperatura y aireación continua (Koch *et al.*, 2008).

### **2.6.3 Condiciones de cultivo durante la fase experimental**

El medio en el cual se desarrolló *Scytonema* sp. fue BG11 a dos molaridades finales de la fuente de nitrógeno en el medio: 0mM y 8mM (Figura 2.3). La unidad experimental fue un frasco de vidrio claro de marca BOECO de 500 mL con 400 mL de medio de cultivo estéril. El inóculo inicial de cada tratamiento equivalió a una absorbancia de 0,08 a 750 nm en fase exponencial (Loreto *et al.*, 2003; Rosales *et al.*, 2005)



**Figura 2.3** Cultivos de *Scytonema sp.*, durante la fase experimental: a. día 3; b. día 18; c. día 45.

El pH fue estabilizado y controlado diariamente, mediante la utilización de un pHmetro marca HANNA HI 9026V y de NaOH y HCl en solución al 1%, por recomendación del Dr. Ever Morales del laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Universidad de Zulia, Venezuela.

La tasa de reposición fue implementada a partir del día 18 (fase exponencial del cultivo discontinuo), en una tasa del 10% y del 30% respectivamente (Fábregas *et al.*, 1995, Fábregas *et al.*, 1998).

## 2.6.4 Evaluación del crecimiento

### 2.6.4.1 Método de la Turbidez

Se tomó 1 mL de cultivo, muestra que fue homogenizada mediante centrifugación en una microcentrifuga de marca Spectrofuge Labnet 24 D a 14000 rpm. El cultivo centrifugado se lo agitó mediante un vortex y a continuación se procedió a leer en un espectrofotómetro Genesys 10UV (Figura 2.4), marca Thermo Scientific, a 750 nm de longitud de onda cada tres días (Fuenmayor *et al.*, 2009).



**Figura 2.4 Método de Turbidez: Lectura de una muestra en el espectrofotómetro.**

#### **2.6.4.1 Tasa de Crecimiento**

Mediante la metodología planteada por Kobayasi, 1961, Eppley y Sloan, 1966 y Chie *et al.*, 2006, se relaciona la tasa de crecimiento (divisiones por día) y la concentración de clorofila a por unidad de volumen celular:

$$\frac{dx}{xdt} = \mu \text{ (divisiones/día)}$$

Siendo:

dX: sea valor de clorofila o densidad celular, en  $\mu\text{g mL}$

dt: Cambio en el tiempo.

x= Concentración inicial (valor de clorofila o densidad celular).

#### **2.6.5 Extracción de Pigmentos**

##### **2.6.5.1 Extracción de clorofila**

Mediante el método planteado por Arnon, 1949, modificado por Marker, 1972 y validado para la utilización de las fórmulas como se observa en el

Anexo 1. Se extrajo con metanol al 90%: se tom6 1 mL del cultivo, se lo centrifug6 a 13500 rpm por 15 min, se desech6 el sobrenadante, y se lo coloc6 con metanol al 90% en la oscuridad, se los almacen6 a una temperatura de 4° C por 24 h, posteriormente se midi6 en el espectrof6metro a una longitud de onda de 665 nm, 750 nm, a continuaci6n se a~adi6 10 µL de HCl a la muestra ya medida con anterioridad (con el objetivo de acidificar el medio y acelerar la formaci6n de feofitina) y se realiz6 una nueva medida a las mismas longitudes de onda.

#### **2.6.5.2 Extracci6n de carotenoides**

Para la extracci6n de carotenoides se prob6 con la extracci6n metab6lica descrita por Loreto *et al.*, 2004: Se recolect6 1 mL de cultivo, se centrifug6 a 14000 rpm por 10 min y se coloc6 en metanol absoluto una vez desechado el sobrenadante preliminar, se dej6 por 24 h a 4° C en la oscuridad, luego se procedi6 a leer el extracto mediante espectrof6metro a una longitud de onda de 480 nm.

#### **2.6.5.3 Extracci6n de ficocianinas**

Para la extracci6n de ficocianinas se utiliz6 la extracci6n metab6lica descrita por Morales *et al.*, 2002: El contenido de ficocianina se determin6 a partir de biomasa fresca. Por cada r6plica de cada tratamiento, se extrajo 1 mL de cultivo. Este volumen se a~adi6 a los tubos eppendorff y se centrifug6 a 130000 rpm por 15 min. A los pellets resultantes, se les a~adi6 200 µL de glicerol y se homogeniz6 la mezcla mediante la utilizaci6n de un vortex, refriger6ndose posteriormente por un tiempo de 30 min. Posteriormente, se le a~adi6 1 mL de agua destilada y se homogeniz6 en el vortex por 15 seg.

Los tubos fueron centrifugados nuevamente a 13000 rpm y se procedi6 a extraer los sobrenadantes y transferirlos a tubos de Spectronic, a~adiendo agua destilada hasta un volumen de 2,5 mL.

## 2.6.6 Determinación de las concentraciones de los metabolitos

### 2.6.6.1 Clorofila

La concentración de clorofila total se calculó con la fórmula propuesta por Chorus *et al.*, 1999 (Anexo 1).

### 2.6.6.2 Carotenoides

La concentración de carotenoides totales se calculó con la fórmula propuesta por Strickland *et al.*, 1972 (Anexo 1).

### 2.6.6.3 Ficocianinas

La concentración de ficocianinas totales se calculó con la fórmula propuesta por Bennet *et al.*, 1973 (Anexo 1).

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 Validación de métodos de cuantificación de clorofila a

A partir de los resultados de las lecturas espectrofotométricas se presentan a continuación los resultados del modelo de análisis univariado de varianza.

En el caso de las lecturas a 650 nm y a 750 nm, como puede observarse en la Tabla 3.1, la significancia ( $p=0.338$  y  $p=0.325$ , respectivamente) es mayor a 0.05, por lo que puede aceptarse la hipótesis de que no existe diferencia entre las varianzas de las lecturas espectrofotométricas.

**Tabla 3.1 Prueba de Levene de igualdad de Varianzas para las lecturas espectrofotométricas a 650 nm y 750 nm.**

	F	gl1	gl2	Significación
Lectura a 650 nm	1,148	3	56	.338

Lectura a 750 nm	1,182	3	56	.325
------------------	-------	---	----	------

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a Diseño: Intersección+metodo+ab+metodo \* ab

Se validó el método modificado para la extracción de clorofila a de *Scytonema* sp. al hallarse que no existió diferencia estadística entre los resultados obtenidos indistintamente del uso de metanol o etanol, como puede verse en la Tabla 3.2. donde la significancia ( $p=0.376$  y  $p= 0.633.$ ) es mayor al 0.05, para la lectura a 650 nm y a 750 nm.

**Tabla 3.2 Modelo de análisis multivariado de la varianza entre el método modificado y el método estándar para la extracción de clorofila a de cianobacterias.**

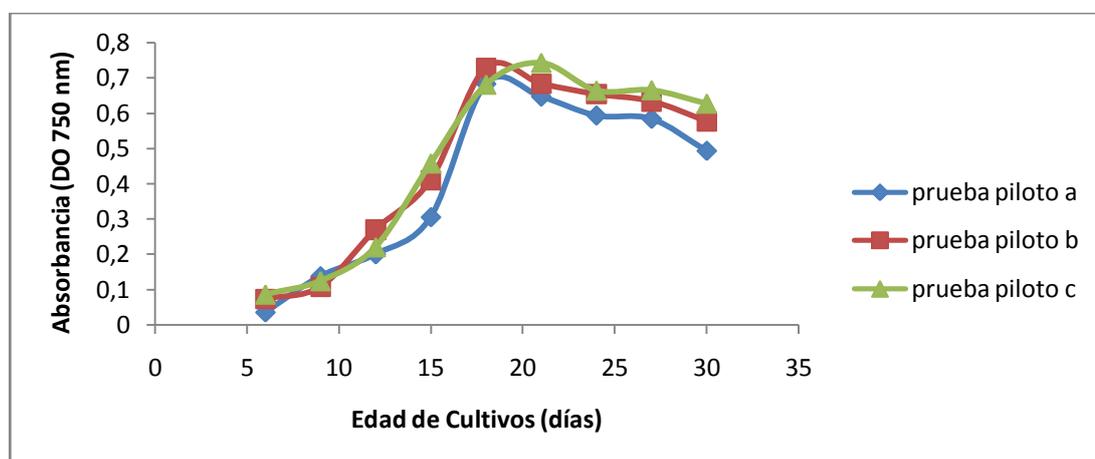
Fuente	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	Lectura a 650 nm	4.149(a)	3	1.383	133.010	.000
	Lectura a 750 nm	.299(b)	3	.100	27.331	.000
Intersección	Lectura a 650 nm	47.924	1	47.924	4608.868	.000
	Lectura a 750 nm	4.961	1	4.961	1360.047	.000
Método	Lectura a 650 nm	.013	1	.013	1.284	.262
	Lectura a 750 nm	.210	1	.210	57.484	.000
Ab	Lectura a 650 nm	4.128	1	4.128	396.950	.000
	Lectura a 750 nm	.089	1	.089	24.318	.000
metodo * ab	Lectura a 650 nm	.008	1	.008	.797	.376
	Lectura a 750 nm	.001	1	.001	.192	.663
Error	Lectura a 650 nm	.582	56	.010		
	Lectura a 750 nm	.204	56	.004		
Total	Lectura a 650 nm	52.655	60			
	Lectura a 750 nm	5.464	60			
Total corregida	Lectura a 650 nm	4.731	59			
	Lectura a 750 nm	.503	59			

a R cuadrado = .877 (R cuadrado corregida = .870)

b R cuadrado = .594 (R cuadrado corregida = .572)

### 3.1 Prueba piloto

Se realizó un análisis previo, respecto a la cinética de crecimiento de *Scytonema* sp.. De esta forma se pudo determinar que entre el día 18 al 21 del crecimiento, *Scytonema* sp. alcanzó la fase exponencial y a su vez, se pudo establecer al día 18 como punto de partida para implementar la tasa de reposición dentro del diseño experimental (Figura 3.1).



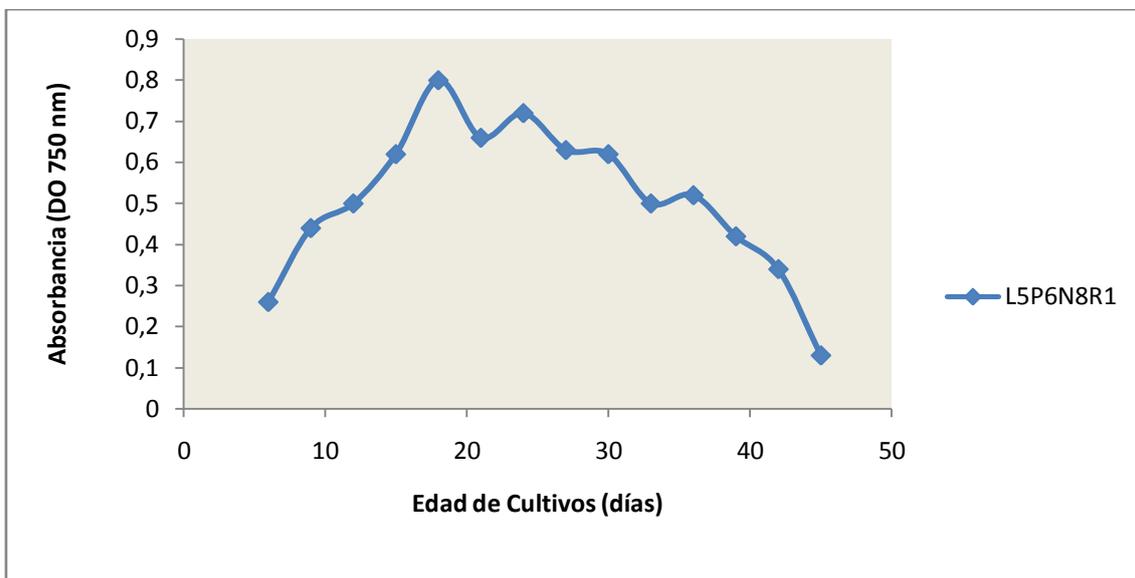
**Figura 3.1 Prueba piloto de la cinética de crecimiento de *Scytonema* sp. a partir de los valores del método de turbidez.**

### 3.2 Pruebas de Homogeneidad

Tanto para los datos de turbidez y cuantificación de pigmentos, se efectuaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas Shapiro-Wilk y Levene (Anexo 2) determinándose su idoneidad para realizar directamente el diseño experimental planteado, sin necesidad de transformación de datos.

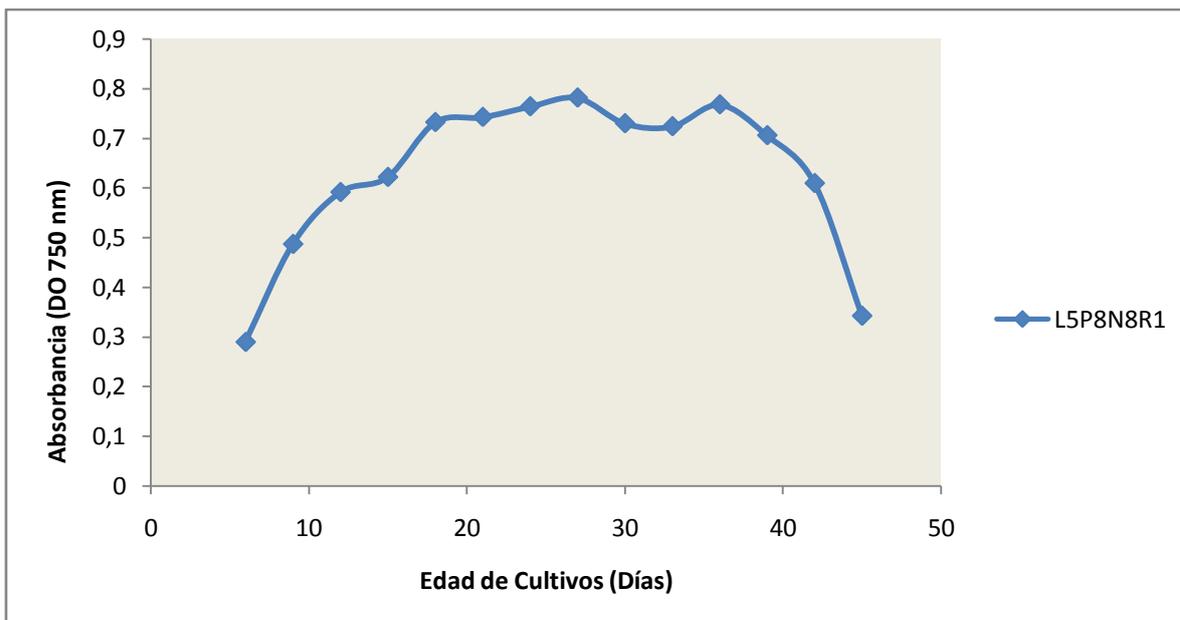
### 3.3 Cinética de crecimiento

El día en el que se estimó mayores valores de absorbancia, antes de establecer la tasa de reposición, fue el día 18, bajo la combinación L5P6N8 (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Crecimiento (DO750) de la cianobacteria *Scytonema* sp. en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM.

El día que presentó el mayor valor de absorbancia fue el día 27, bajo la combinación L5P8N8R1 (Figura 3.3).



**Figura 3.3 Crecimiento (DO750) de la cianobacteria *Scytonema* sp. en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM.**

El resto de gráficas que fueron modeladas para cada combinación de factores se presenta en el Anexo 3.

Realizado el análisis de varianza, ANOVA, para el diseño factorial (Tabla 3.3), para el día en que se obtuvo los máximos valores de absorbancia antes de implementar la tasa de reposición (día 18), se concluye que la interacción pH – irradiancia – nitrógeno, presentó un valor crítico de significación de 0.078, lo cual indica que la interacción de los factores posee un efecto no significativo sobre la cinética de crecimiento y que no tiene efecto alguno sobre los valores de turbidez, por cuanto la significancia es mayor al 0.05.

**Tabla 3.3 Análisis de Varianza para las absorbancias del método de turbidez de la cianobacteria *Scytonema* sp. antes de la implementación de la tasa de reposición.**

Variable dependiente: Turbidez

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	2.507(a)	11	.228	56.081	.000
Intersección	13.138	1	13.138	3233.269	.000
pH	.015	2	.007	1.804	.173
Irradiancia	.571	1	.571	140.530	.000
Nitrógeno	1.627	1	1.627	400.459	.000

pH * Irradiancia	.005	2	.002	.585	.560
pH * Nitrógeno	.032	2	.016	3.890	.026
Irradiancia * Nitrógeno	.236	1	.236	58.020	.000
pH * Irradiancia * Nitrógeno	.022	2	.011	2.661	.078
Error	.244	60	.004		
Total	15.888	72			
Total corregida	2.750	71			

a R cuadrado = .911 (R cuadrado corregida = .895)

Una vez realizadas las pruebas *post hoc*, se decidió presentar los resultados de las pruebas de Duncan, ya que representaban una mejor distribución de los subconjuntos de agrupación de tratamientos.

Las pruebas de Duncan, para las absorbancias que se obtuvieron de la implementación del método de la turbidez, presentaron 5 subconjuntos, como se muestra en la Tabla 3.4., donde los tratamientos L5P10N8, L5P6N8, L5P8N8, representan al subconjunto de mayores valores de absorbancia. El valor de  $0.7642 \pm 0.19682$ , fue el mayor alcanzado durante los primeros 18 días.

**Tabla 3.4 Prueba de Duncan para el día con los máximos valores de absorbancia del método de turbidez antes de la implementación de la tasa de reposición.**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05				
		1	2	3	4	5
L11P8N0	6	.2220				
L11P10N0	6	.2442	.2442			
L11P6N0	6	.2688	.2688			
L5P6N0	6	.2980	.2980	.2980		
L5P8N0	6		.3128	.3128		
L5P10N0	6		.3152	.3152		
L11P6N8	6			.3593		
L11P10N8	6				.4530	
L11P8N8	6				.4813	
L5P10N8	6					.6927
L5P6N8	6					.7145
L5P8N8	6					.7642
Sig.		.063	.090	.134	.444	.070

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

A partir del día 18, la variable tasa de reposición fue implementada dentro del diseño, por lo que también se hizo un análisis del día de mayor producción, entre los días 21 a 45.

Realizado el análisis de varianza, ANOVA, para el diseño factorial (Tabla 3.5), en el día en que se obtuvo los máximos valores de absorbancia a partir de la implementación de la tasa de reposición (día 27), se concluye que la interacción pH – irradiancia – nitrógeno – reposición, presentó un valor crítico de significación de 0.008, lo cual indica que la interacción de los factores posee un efecto significativo sobre la cinética de crecimiento y que existe al menos un tratamiento distinto de los demás, por cuanto la significancia es menor al 0.05.

**Tabla 3.5 Análisis de Varianza para las absorbancias del método de turbidez de la cianobacteria *Scytonema* sp.**

Variable dependiente: Turbidez

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	3.050(a)	23	.133	174.254	.000
Intersección	9.559	1	9.559	12559.538	.000
Ph	.071	2	.035	46.347	.000
Irradiancia	.101	1	.101	132.731	.000
Nitrógeno	2.214	1	2.214	2908.535	.000
Reposición	.218	1	.218	286.589	.000
pH * Irradiancia	.032	2	.016	20.999	.000
pH * Nitrógeno	.002	2	.001	1.559	.221
Irradiancia * Nitrógeno	.251	1	.251	329.757	.000
pH * Irradiancia * Nitrógeno	.009	2	.005	6.024	.005
pH * Reposición	.016	2	.008	10.193	.000
Irradiancia * Reposición	.001	1	.001	1.150	.289
pH * Irradiancia * Reposición	.009	2	.004	5.723	.006
Nitrógeno * Reposición	.080	1	.080	104.495	.000
pH * Nitrógeno * Reposición	.008	2	.004	5.455	.007
Irradiancia * Nitrógeno * Reposición	.031	1	.031	41.332	.000

pH * Irradiancia * Nitrógeno * Reposición	.008	2	.004	5.326	.008
Error	.037	48	.001		
Total	12.646	72			
Total corregida	3.087	71			

a R cuadrado = .988 (R cuadrado corregida = .982)

Las pruebas de Duncan, para las absorbancias que se obtuvieron de la implementación del método de la turbidez, presentaron 12 subconjuntos, como se muestra en la Tabla 3.6., donde el tratamiento L5P8N8R1, representa al subconjunto de mayor valor de absorbancia. El valor de  $0.7813 \pm 0.213$ , fue mayor alcanzado durante la etapa de implementación de la tasa de reposición.

**Tabla 3.6 Prueba de Duncan para el día con los máximos valores de absorbancia del método de turbidez.**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05									
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L5P6N0R2	3										
L5P10N0R2	3										
L5P8N0R2	3	.1660									
L5P6N0R1	3	.1667									
L11P10N0R1	3	.1667									
L11P6N0R1	3	.1713									
L11P8N0R2	3	.1797									
L11P10N0R2	3	.2057	.2057								
L5P10N0R1	3	.2060	.2060								
L11P6N0R2	3		.2333								
L5P8N0R1	3		.2473								
L11P8N0R1	3			.3070							
L11P6N8R2	3			.3080							
L11P8N8R2	3			.3323							
L11P10N8R2	3			.3513							
L5P6N8R2	3				.4750						
L11P10N8R1	3					.5370					
L11P6N8R1	3					.5623	.5623				
L11P8N8R1	3					.5683	.5683				
L5P10N8R2	3						.5960	.5960			
L5P6N8R1	3							.6313	.6313		

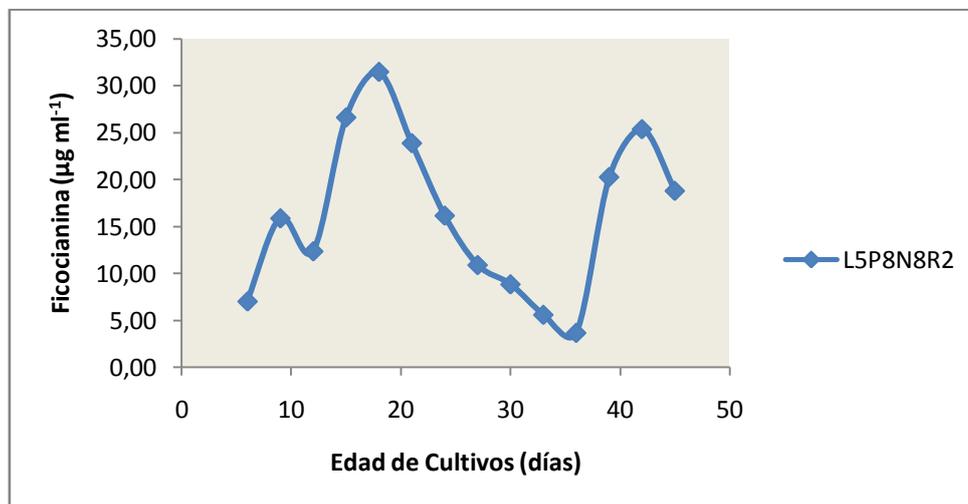
L5P8N8R2	3								.6460	.6460	
L5P10N8R1	3									.6877	
L5P8N8R1	3										.7813
Sig.		.131	.097	.077	1.000	.196	.165	.123	.518	.071	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

### 3.4 Producción de Pigmentos

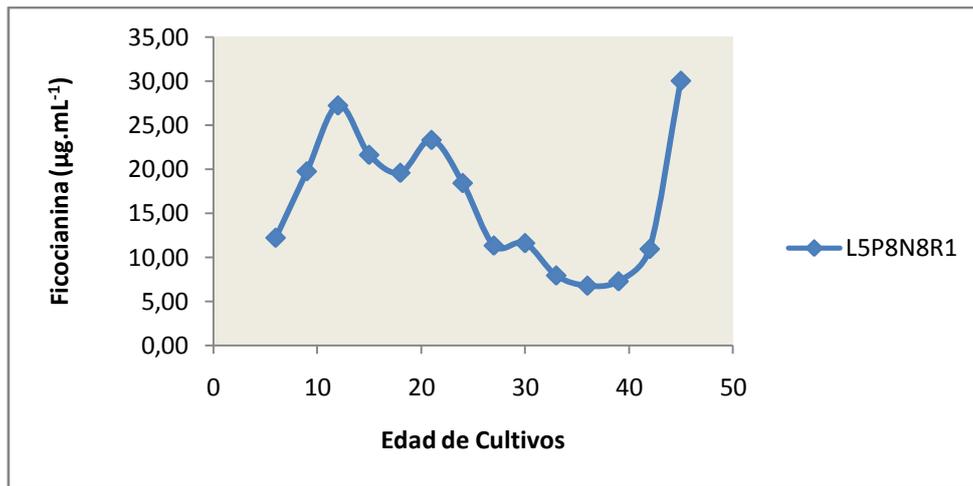
#### 3.4.1 Ficocianina

Para el pigmento ficocianina, el día en el que se alcanzó la mayor producción, antes de haber empezado con la tasa de reposición fue el día 18, bajo los parámetros combinados L5P8N8 (Figura 3.4)



**Figura 3.4 Concentración de ficocianina ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria *Scytonema* sp. en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM.**

A su vez, el día que mostró mayor producción ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), una vez que se empezó la tasa de reposición, fue el día 45, bajo la combinación de parámetros L5P8N8R1 (Figura 3.5).



**Figura 3.5** Concentración de ficocianina ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria *Scytonema* sp. en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM.

El resto de gráficas que fueron ajustadas y graficadas para cada combinación de factores se presentan en el Anexo 4.

El análisis de varianza, tipo ANOVA, para el diseño factorial (Tabla 3.7), en el día de mayor producción de ficocianina antes de implementar la tasa de reposición (día 18), concluye que la interacción pH – irradiancia – nitrógeno, presentó un valor de significación de 0.233, lo cual indica que la interacción de los factores estima un efecto no significativo sobre la producción de ficocianina, por cuanto la significancia es superior al 0.05.

**Tabla 3.7** Análisis de Varianza para la producción de ficocianina ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria *Scytonema* sp. antes de la implementación la tasa de reposición.

Variable dependiente: Ficocianina

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	5691.117(a)	11	517.374	32.750	.000
Intersección	8094.585	1	8094.585	512.395	.000
pH	54.156	2	27.078	1.714	.189
Irradiancia	1619.215	1	1619.215	102.498	.000
Nitrógeno	1945.137	1	1945.137	123.129	.000
pH * Irradiancia	3.423	2	1.711	.108	.897
pH * Nitrógeno	46.639	2	23.319	1.476	.237
Irradiancia * Nitrógeno	1975.435	1	1975.435	125.047	.000

pH * Irradiancia * Nitrógeno	47.112	2	23.556	1.491	.233
Error	947.852	60	15.798		
Total	14733.555	72			
Total corregida	6638.969	71			

a R cuadrado = .857 (R cuadrado corregida = .831)

Las pruebas de Duncan, para el día de mayor producción de ficocianina, exhibieron 3 subconjuntos, como se muestra en la Tabla 3.8., donde las combinaciones L5P6N8, L5P8N8, L5P10N8, representan al subconjunto de mayor producción de ficocianina. El valor de 26.8020  $\mu\text{g.mL}^{-1} \pm 9.669$ , fue el mayor logrado durante los primeros 18 días.

**Tabla 3.8 Prueba de Duncan para el día con la mayor producción de ficocianina ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sin la implementación de la tasa de reposición.**

Duncan

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
L5P6N0	6	2.0792		
L11P10N8	6	3.9327	3.9327	
L11P6N0	6	5.1021	5.1021	
L5P10N0	6	5.3223	5.3223	
L11P6N8	6	5.5056	5.5056	
L11P10N0	6	6.1987	6.1987	
L11P8N0	6	6.4026	6.4026	
L5P8N0	6	7.3274	7.3274	
L11P8N8	6		8.0231	
L5P10N8	6			25.0080
L5P8N8	6			25.5329
L5P6N8	6			26.8020
Sig.		.053	.134	.467

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Luego de los primeros 18 días de ensayo, la variable tasa de reposición fue implementada dentro del diseño, por lo que también se efectuó un análisis del día de mayor producción, entre los días 21 a 45.

El ANOVA (Tabla 3.9), para el día de mayor producción de ficocianina a partir de la implementación de la tasa de reposición (día 45), deriva que la interacción pH – irradiancia – nitrógeno – reposición, presentó un valor crítico de significación de 0.027, lo cual indica que la interacción de los factores posee un efecto significativo sobre la producción de ficocianina y que existe al menos un tratamiento distinto de los demás, por cuanto la significancia es menor al 0.05.

**Tabla 3.9 Análisis de Varianza para la producción de ficocianina de la cianobacteria *Scytonema* sp.**

Variable dependiente: Ficocianina

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	3459.280(a)	23	150.403	14.814	.000
Intersección	5595.816	1	5595.816	551.168	.000
pH	260.456	2	130.228	12.827	.000
Irradiancia	992.243	1	992.243	97.732	.000
Nitrógeno	1201.611	1	1201.611	118.354	.000
Reposición	156.351	1	156.351	15.400	.000
pH * Irradiancia	111.251	2	55.626	5.479	.007
pH * Nitrógeno	91.319	2	45.659	4.497	.016
Irradiancia * Nitrógeno	226.023	1	226.023	22.262	.000
pH * Irradiancia * Nitrógeno	52.419	2	26.209	2.582	.086
pH * Reposición	43.865	2	21.933	2.160	.126
Irradiancia * Reposición	26.136	1	26.136	2.574	.115
pH * Irradiancia * Reposición	77.110	2	38.555	3.798	.029
Nitrógeno * Reposición	60.496	1	60.496	5.959	.018
pH * Nitrógeno * Reposición	78.836	2	39.418	3.883	.027
Irradiancia * Nitrógeno * Reposición	2.339	1	2.339	.230	.633
pH * Irradiancia * Nitrógeno * Reposición	78.822	2	39.411	3.882	.027

Error	487.327	48	10.153		
Total	9542.423	72			
Total corregida	3946.606	71			

a R cuadrado = .877 (R cuadrado corregida = .817)

Las pruebas de Duncan, para las concentraciones de ficocianina que se obtuvieron fueron representadas en 9 subconjuntos, como se muestra en la Tabla 3.10, donde el tratamiento L5P8N8R1, representa al subconjunto con mayor producción de ficocianina. El valor de  $30.0403 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \pm 7.4556$ , fue el mayor alcanzado en la fase en la que entró en vigencia la tasa de reposición.

**Tabla 3.10 Prueba de Duncan para el día con los máximos valores de producción de ficocianina.**

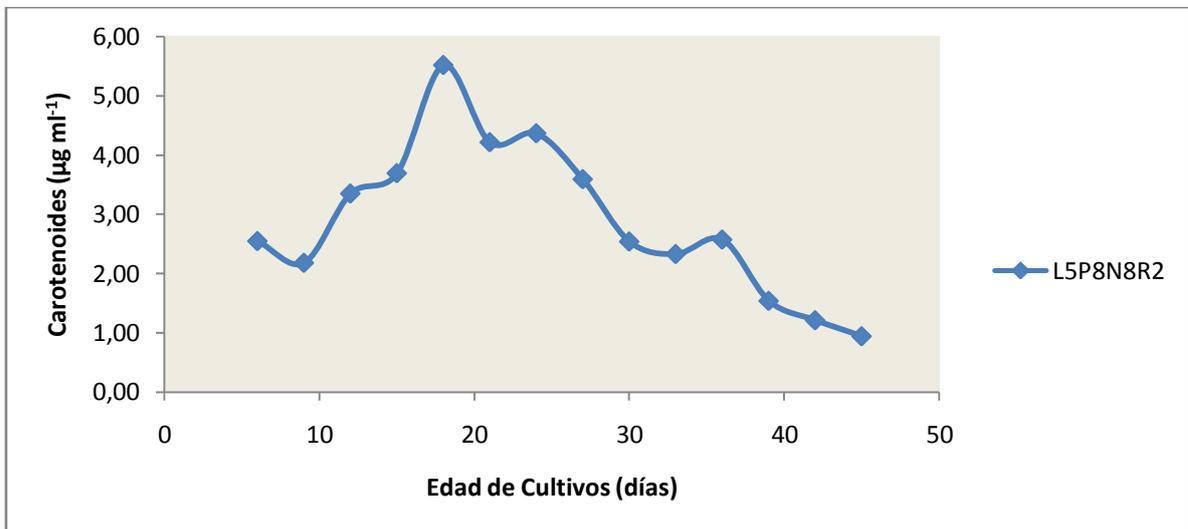
Duncan									
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05							
		2	3	4	5	6	7	8	9
L11P6N0R2	3								
L11P6N0R1	3								
L11P10N0R1	3	2.7121							
L11P8N0R2	3	2.8130							
L11P10N0R2	3	3.1552							
L11P8N0R1	3	3.8130							
L11P6N8R2	3	3.8596							
L5P10N0R1	3	4.2141							
L5P6N0R2	3	5.0285	5.0285						
L5P10N0R2	3	5.0651	5.0651						
L11P10N8R2	3	5.3702	5.3702	5.3702					
L5P8N0R2	3	6.9822	6.9822	6.9822	6.9822				
L5P6N0R1	3	7.4788	7.4788	7.4788	7.4788				
L11P6N8R1	3	8.1057	8.1057	8.1057	8.1057				
L11P8N8R2	3	8.1987	8.1987	8.1987	8.1987				
L11P8N8R1	3	8.6046	8.6046	8.6046	8.6046	8.6046			
L11P10N8R1	3		10.3632	10.3632	10.3632	10.3632			
L5P6N8R1	3		10.4770	10.4770	10.4770	10.4770			
L5P8N0R1	3			11.2582	11.2582	11.2582			
L5P10N8R2	3				12.4113	12.4113			
L5P6N8R2	3					14.4255	14.4255		
L5P8N8R2	3						18.7997		

L5P10N8R1	3								24.1572	
L5P8N8R1	3									30.0403
Sig.		.066	.083	.059	.082	.053	.099	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

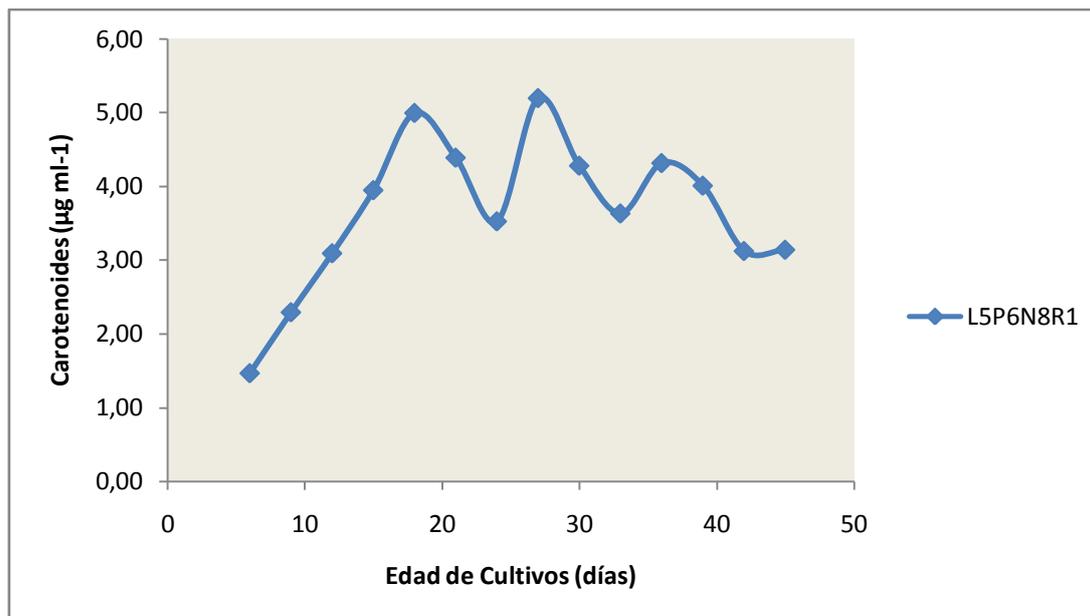
### 3.4.2 Carotenoides

Los mayores valores de producción de carotenoides, antes de comenzar con la tasa de reposición se alcanzaron en el día 18, bajo el tratamiento L5P8N8 (Figura 3.6).



**Figura 3.6 Concentración de carotenoides (µg.mL<sup>-1</sup>) de la cianobacteria *Scytonema* sp. en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM.**

El día que exhibió mayor producción (µg.mL<sup>-1</sup>) fue el día 18, bajo el tratamiento L5P8N8 (Figura 3.6).



**Figura 3.7 Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria *Scytonema* sp. en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM.**

El resto de gráficas, de producción de carotenoides respecto a múltiples variables y factores se las puede constatar en el Anexo 5.

Según el análisis de varianza, ANOVA, para el diseño factorial (Tabla 3.11), en el día de mayor producción de carotenoides antes de implementar la tasa de reposición (día 18), se estima que la interacción pH – irradiancia – nitrógeno, presentó un valor crítico de significación de 0.000, lo cual indica que la interacción de los factores posee un efecto significativo sobre la producción de carotenoides, por cuanto la significancia es menor al 0.05.

**Tabla 3.11 Análisis de Varianza para la producción de carotenoides de la cianobacteria *Scytonema* sp. antes de la implementación la tasa de reposición.**

Variable dependiente: Carotenoides

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	200.167(a)	11	18.197	108.464	.000
Intersección	335.578	1	335.578	2000.218	.000
pH	5.776	2	2.888	17.213	.000
Irradiancia	1.535	1	1.535	9.148	.004
Nitrógeno	172.336	1	172.336	1027.211	.000
pH * Irradiancia	1.631	2	.816	4.861	.011
pH * Nitrógeno	1.812	2	.906	5.400	.007

Irradiancia * Nitrógeno	12.594	1	12.594	75.064	.000
pH * Irradiancia * Nitrógeno	4.484	2	2.242	13.365	.000
Error	10.066	60	.168		
Total	545.811	72			
Total corregida	210.234	71			

a R cuadrado = .952 (R cuadrado corregida = .943)

Las pruebas de Duncan, para el día de mayor producción de carotenoides, presentaron 7 subconjuntos, como se muestra en la Tabla 3.12, donde el tratamientos L5P8N8, representa al subconjunto con mayor producción de carotenoides. El valor de  $5.044 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 1.72077$ , fue el mayor alcanzado durante los primeros 18 días.

**Tabla 3.12 Prueba de Duncan para el día con la mayor producción de carotenoides ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sin la implementación la tasa de reposición.**

Duncan

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
L5P6N0	6	.1940						
L5P10N0	6	.3427						
L5P8N0	6	.4820	.4820					
L11P10N0	6	.6173	.6173	.6173				
L11P6N0	6		.9547	.9547				
L11P8N0	6			1.0800				
L11P6N8	6				2.7387			
L11P10N8	6				3.1887	3.1887		
L5P10N8	6				3.1987	3.1987		
L11P8N8	6					3.4980		
L5P6N8	6						4.5673	
L5P8N8	6							5.0447
Sig.		.107	.063	.068	.070	.223	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

A partir del día 18, la variable tasa de reposición fue incluida dentro del diseño, por lo que también se realizó un análisis del día de mayor producción, entre los días 21 a 45.

Realizado el análisis de varianza, ANOVA, para el diseño factorial (Tabla 3.12), en el día de mayor producción de carotenoides a partir de la implementación de la tasa de reposición (día 27), se concluye que la interacción pH – irradiancia – nitrógeno – reposición, presentó un valor crítico de significación de 0.654, lo cual indica que la interacción de los factores posee un efecto no significativo sobre la producción de carotenoides, por cuanto la significancia es menor al 0.05.

**Tabla 3.13      Análisis de Varianza para la producción de carotenoides de la cianobacteria *Scytonema* sp.**

Variable dependiente: Carotenoides

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	151.211(a)	23	6.574	72.597	.000
Intersección	312.900	1	312.900	3455.186	.000
pH	.826	2	.413	4.562	.015
Irradiancia	7.778	1	7.778	85.883	.000
Nitrógeno	108.536	1	108.536	1198.499	.000
Reposición	8.334	1	8.334	92.029	.000
pH * Irradiancia	.542	2	.271	2.990	.060
pH * Nitrógeno	1.394	2	.697	7.696	.001
Irradiancia * Nitrógeno	12.301	1	12.301	135.831	.000
pH * Irradiancia * Nitrógeno	.443	2	.221	2.445	.097
pH * Reposición	.834	2	.417	4.606	.015
Irradiancia * Reposición	1.332	1	1.332	14.705	.000
pH * Irradiancia * Reposición	.037	2	.019	.205	.815
Nitrógeno * Reposición	6.929	1	6.929	76.515	.000
pH * Nitrógeno * Reposición	1.794	2	.897	9.903	.000

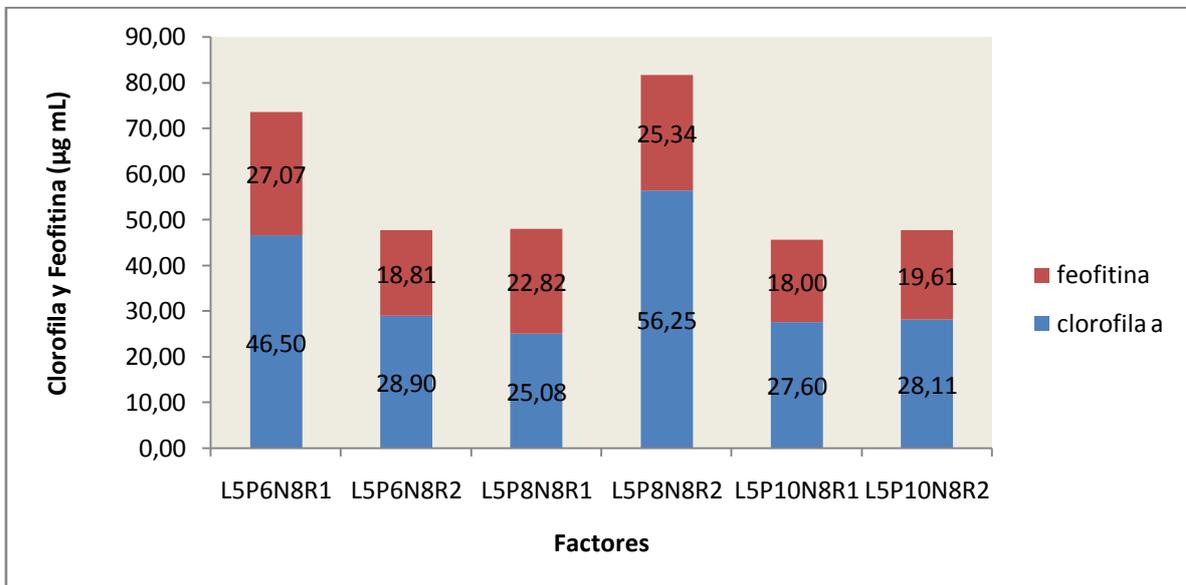


L5P10N8R1	3							4.2933	
L5P8N8R1	3								5.1120
L5P6N8R1	3								5.2000
Sig.		.084	.294	.089	.130	.280	.152	1.000	.722

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

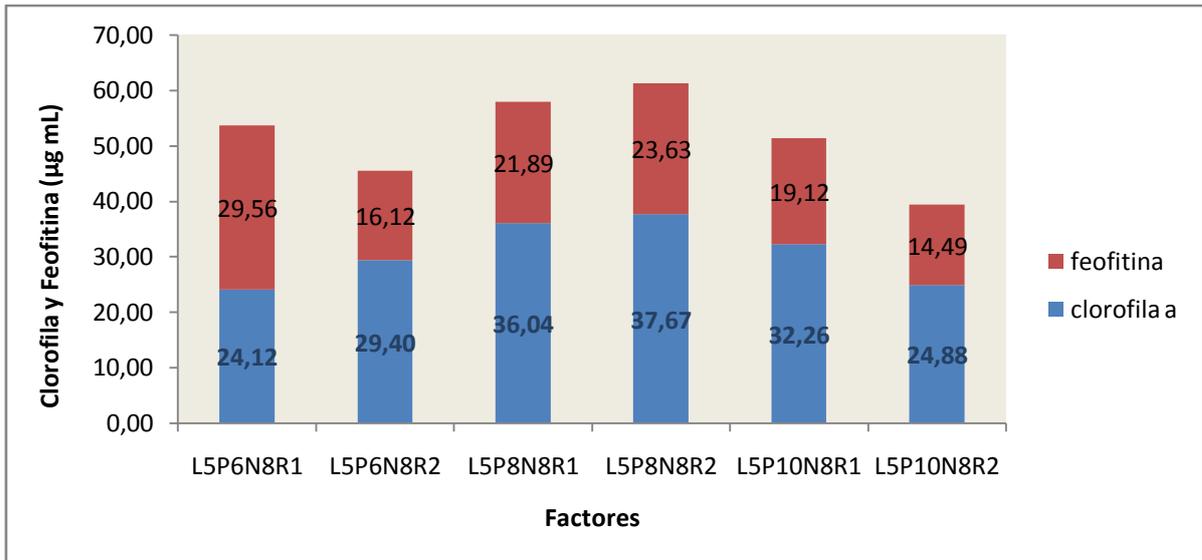
### 3.4.3 Clorofila a

La mayor producción de clorofila a respecto a su degradación en feofitina, antes de haber establecido la tasa de reposición se presentó en el día 18, bajo la combinación L5P8N8 (Figura 3.8).



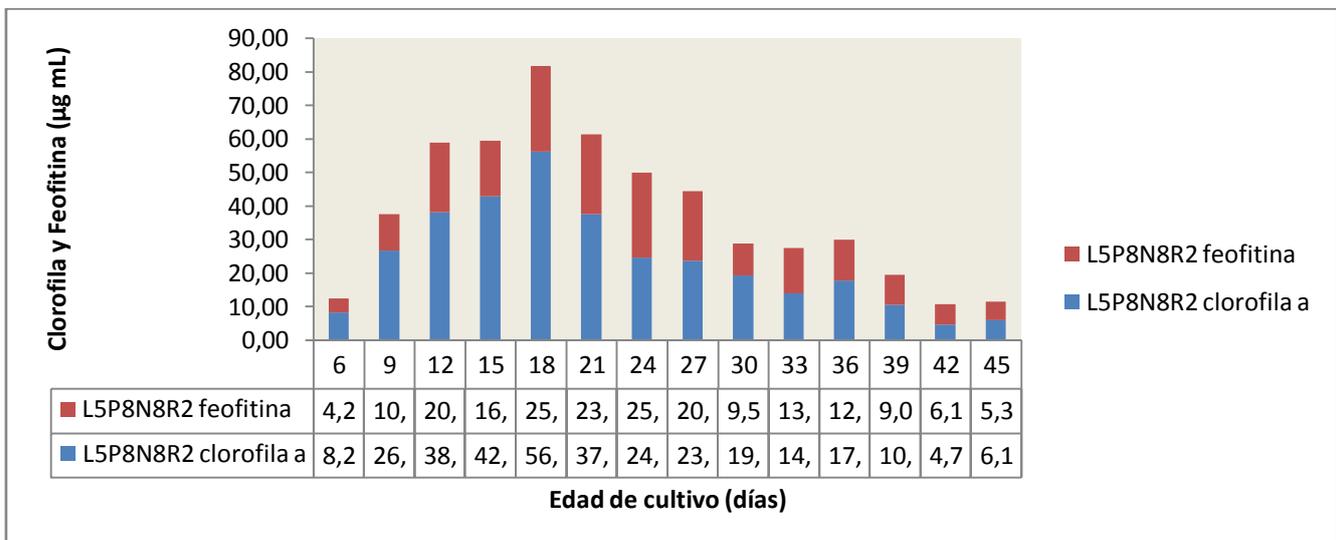
**Figura 3.8 Concentración de clorofila y feofitina (µg.mL) de la cianobacteria *Scytonema* sp. en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM.**

El día que presentó mayor producción (µg.mL) fue el día 21, bajo la combinación L5P8N8R2 (Figura 3.9).



**Figura 3.9** Concentración de clorofila y feofitina ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria *Scytonema* sp. en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM.

Se efectuó el análisis de los distintos factores por edad de cultivo (Figura 3.10).



**Figura 3.10** Concentración de clorofila y feofitina ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la cianobacteria *Scytonema* sp. en función del diseño factorial a 5 kiloluxes y medio BG11 8 mM.

Las gráficas que fueron diseñadas para cada combinación de factores se presenta en el Anexo 6.

El estudio de varianza, ANOVA, para el diseño factorial (Tabla 3.15), antes de implementar la tasa de reposición (día 18), concluye que la interacción pH – irradiancia – nitrógeno, presentó un valor de significación de 0.271, lo cual indica que la interacción de los factores posee un efecto no significativo sobre la producción de clorofila, por cuanto la significancia es mayor al 0,05.

**Tabla 3.15 Análisis de Varianza para la producción de clorofila de la cianobacteria *Scytonema* sp. antes de la implementación la tasa de reposición.**

Variable dependiente: Clorofila

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	17423.640(a)	11	1583.967	28.755	.000
Intersección	23582.774	1	23582.774	428.121	.000
pH	288.122	2	144.061	2.615	.081
Irradiancia	23.122	1	23.122	.420	.520
Nitrógeno	16495.148	1	16495.148	299.452	.000
pH * Irradiancia	86.429	2	43.214	.785	.461
pH * Nitrógeno	197.882	2	98.941	1.796	.175
Irradiancia * Nitrógeno	186.053	1	186.053	3.378	.071
pH * Irradiancia * Nitrógeno	146.885	2	73.443	1.333	.271
Error	3305.065	60	55.084		
Total	44311.480	72			
Total corregida	20728.705	71			

a R cuadrado = .841 (R cuadrado corregida = .811)

Las pruebas de Duncan, para el día de mayor producción de clorofila, presentaron 4 subconjuntos, como se muestra en la Tabla 3.16, donde el tratamiento L5P8N8, representa al subconjunto con mayor producción de clorofila. El valor de  $40.6658 \mu\text{g.mL} \pm 17.08665$ , fue el mayor alcanzado durante los primeros 18 días.

**Tabla 3.16 Prueba de Duncan para el día con la mayor producción de clorofila ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sin la implementación la tasa de reposición.**

Duncan

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
L5P10N0	6	1.5180			
L5P6N0	6	1.8019			
L5P8N0	6	2.4437			
L11P10N0	6	2.9867			
L11P8N0	6	3.9000			
L11P6N0	6	5.1218			
L5P10N8	6		27.8551		
L11P6N8	6		27.9045		
L11P10N8	6		30.1630	30.1630	
L11P8N8	6		35.1120	35.1120	35.1120
L5P6N8	6			37.7038	37.7038
L5P8N8	6				40.6658
Sig.		.471	.128	.101	.227

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

A partir del día 18, la variable tasa de reposición fue implementada dentro del diseño, por lo que se analizó la mayor producción, entre los días 21 a 45.

Realizado el análisis de varianza, ANOVA, para el diseño factorial (Tabla 3.17), en el día de mayor producción de clorofila a partir de la implementación de la tasa de reposición (día 21), se concluye que la interacción pH – irradiancia – nitrógeno – reposición, presentó un valor crítico de significación de 0.002, lo cual indica que la interacción de los factores presenta un efecto significativo sobre la producción de clorofila, por cuanto la significancia es menor a 0.05.

**Tabla 3.17 Análisis de Varianza para la producción de clorofila de la cianobacteria *Scytonema* sp.**

Variable dependiente: Clorofila

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	11851.664(a)	23	515.290	26.829	.000
Intersección	17284.922	1	17284.922	899.945	.000
pH	82.384	2	41.192	2.145	.128
Irradiancia	262.119	1	262.119	13.647	.001
Nitrógeno	10048.836	1	10048.836	523.196	.000
Reposición	19.101	1	19.101	.994	.324
pH * Irradiancia	268.753	2	134.376	6.996	.002
pH * Nitrógeno	12.918	2	6.459	.336	.716
Irradiancia * Nitrógeno	164.302	1	164.302	8.554	.005
pH * Irradiancia * Nitrógeno	110.704	2	55.352	2.882	.066
pH * Reposición	91.936	2	45.968	2.393	.102
Irradiancia * Reposición	19.747	1	19.747	1.028	.316
pH * Irradiancia * Reposición	233.172	2	116.586	6.070	.004
Nitrógeno * Reposición	96.080	1	96.080	5.002	.030
pH * Nitrógeno * Reposición	91.697	2	45.849	2.387	.103

Irradiancia * Nitrógeno * Reposición	82.183	1	82.183	4.279	.044
pH * Irradiancia * Nitrógeno * Reposición	267.733	2	133.866	6.970	.002
Error	921.919	48	19.207		
Total	30058.505	72			
Total corregida	12773.582	71			

a R cuadrado = .928 (R cuadrado corregida = .893)

Las pruebas de Duncan, para la concentración de clorofila que se obtuvieron presentaron 6 subconjuntos, como se muestra en la Tabla 3.18, donde los tratamientos L5P8N8R1, L11P6N8R1 y L5P8N8R2, representan al subconjunto con mayor producción de clorofila. El valor de  $37.6668 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 13.41304$ , fue el mayor alcanzado durante la etapa de implementación de la tasa de reposición.

**Tabla 3.18 Prueba de Duncan para el día con la mayor producción de clorofila ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en *Scytonema* sp.**

Duncan

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05					
		2	3	4	5	6	1
L11P6N0R1	3	1.2342					
L5P6N0R1	3	1.5551					
L5P10N0R2	3	1.6538					
L11P10N0R1	3	1.8759					
L11P10N0R2	3	2.5424					
L5P6N0R2	3	2.6707					
L11P8N0R1	3	3.1842					
L5P8N0R1	3	3.2088					
L11P8N0R2	3	4.1221					
L11P6N0R2	3	6.7386					
L5P10N0R1	3	7.1829					
L5P8N0R2	3	8.1949					
L11P6N8R2	3		16.3651				
L11P8N8R1	3		21.3017	21.3017			
L11P8N8R2	3		22.2644	22.2644			
L11P10N8R1	3		23.1283	23.1283			
L11P10N8R2	3		23.2517	23.2517			
L5P6N8R1	3		24.1156	24.1156			
L5P10N8R2	3			24.8808	24.8808		

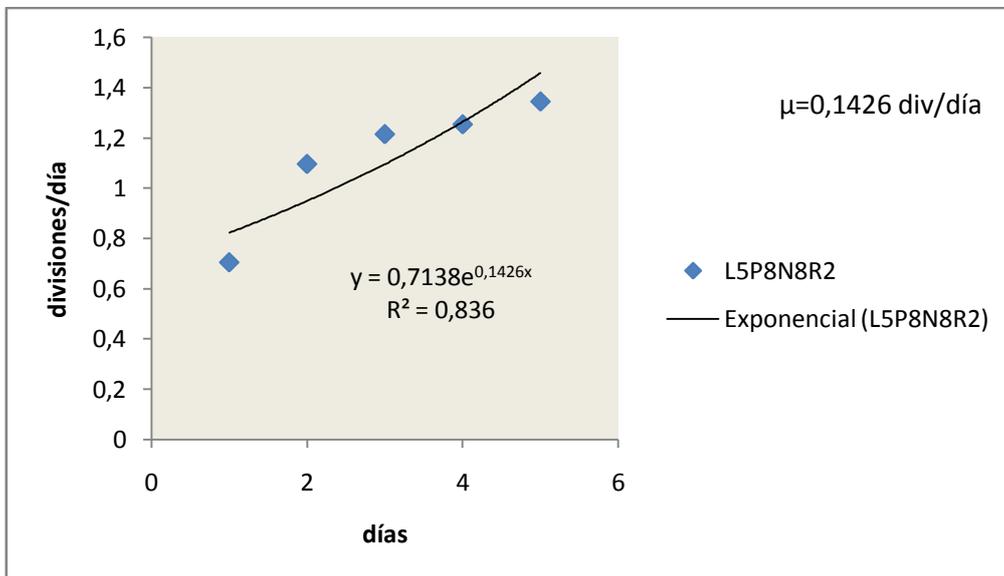
L5P6N8R2	3			29.3979	29.3979	29.3979	
L5P10N8R1	3				32.2611	32.2611	32.2611
L5P8N8R1	3					36.0377	36.0377
L11P6N8R1	3					37.0250	37.0250
L5P8N8R2	3						37.6668
Sig.		.111	.062	.054	.056	.056	.175

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

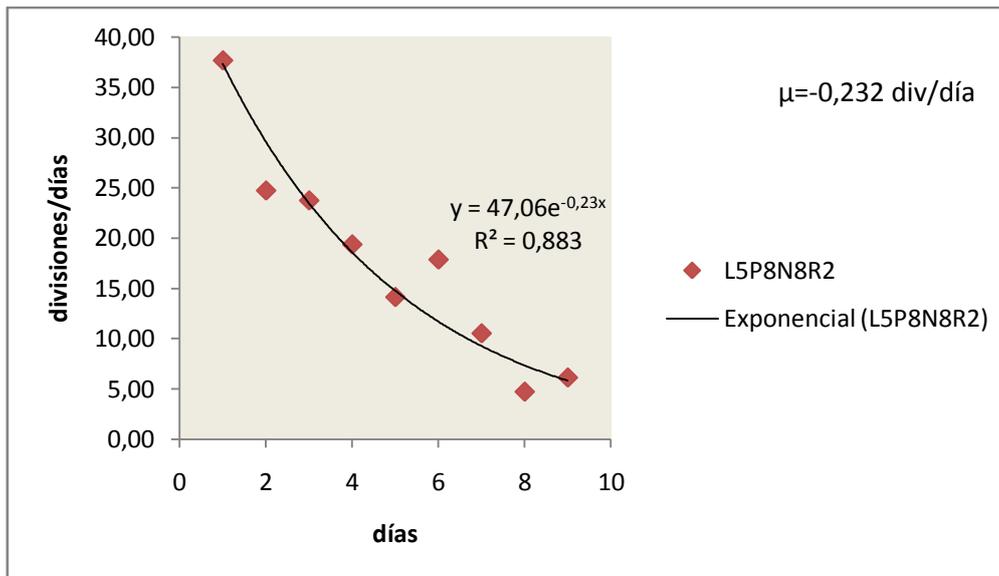
### 3.5 Tasa de Crecimiento

La tasa de crecimiento fue determinada para la combinación de factores con mayor producción (Figura 3.11). Se estableció la tasa de reposición de acuerdo al modelo de ecuación que se utilizó (Anexo 7).



**Figura 3.11 Tasa de crecimiento de *Scytonema* sp. bajo la influencia de los mejores factores para la producción de clorofila a, día 6 a 18.**

También se modeló la tasa de reposición para los días en los cuales ya se había establecido la tasa de reposición (Figura 3.12).



**Figura 3.12** Tasa de crecimiento de *Scytonema* sp. bajo la influencia de los mejores factores para la producción de clorofila a, día 21 a 45.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El cultivo de cianobacterias se ha constituido en los últimos años como una herramienta alternativa para estimular la producción de compuestos de interés industrial. Múltiples estudios a nivel de laboratorio constatan, las diversas posibilidades y aplicaciones de dichas cianobacterias (Iwata, 1990; Becker, 1995; Chetsumon *et al.*, 1995; Garbisu *et al.*, 1999; De Lara *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2006).

Se ha comprobado con anterioridad la capacidad de crecimiento de *Scytonema* sp., la producción y cuantificación de diversos pigmentos y otros metabolitos, a nivel de laboratorio; demostrándose su versatilidad fisiológica para adaptarse, incluso a medios limitantes o carentes de ciertas condiciones habituales para el crecimiento de dicha cepa (Patterson, *et al.*, 1994; Chetsumon *et al.*, 1995; Albertano *et al.*, 2000; Matern *et al.*, 2001; Antonopoulou *et al.*, 2002; Bokesch, 2003; Changyun, 2006; Grewe, 2005; Zapomělová *et al.*, 2008; Karseno *et al.*, 2009).

La modificación del medio de cultivo ha sido un método ampliamente utilizado para incrementar la producción de biomasa cianobacteriana. A partir de un medio base se ha seguido la estrategia de modificar cuantitativamente parte de los nutrientes y condiciones suministrados (Rippka, 1988; Fábregas *et al.*, 1995; Rosales *et al.*, 2006).

*Scytonema* sp. experimentó un mayor crecimiento en el medio BG11 8 mM y a 5 kluxes, en términos de medida de turbidez y observación de coloración verde azulada típica de cultivos en óptimas condiciones. Bajo su ausencia (BG11 0 mM) y a una mayor irradiancia (11 kluxes) se exhibió una disminución significativa de la población inicial y la pérdida de la pigmentación característica. Esto es debido probablemente a la influencia de la iluminación en el crecimiento cianobacteriano y en diversas poblaciones fitoplanctónicas, caracterizándose muchas de ellas por desarrollarse de manera óptima a irradiancias bajas e intermedias, como por ejemplo cepas de *Spirulina platensis* (Baldia *et al.* 1991), *Pseudanabaena galeata* (Romo 1994; Leal *et al.*, 2001), *Synechococcus*, (Mastala *et al.* 1996), *Anabaena* PCC7120 (Loreto *et al.* 2003) y *Anabaena variabilis* (Yoon *et al.* 2007).

El incremento del crecimiento en medidas de turbidez, ha sido descrito en estudios previos, como en el de Fuenmayor (2009), observándose una marcada diferencia estadística entre los datos obtenidos a pH 9 ( $0.9 \pm 0.09$ ) respecto a los de menor ( $0.74 \pm 0.08$ ), bien podría decirse que comparativamente han tenido similar rendimientos, no así con los ensayos de Loreto (2003), en el cual se precisa cierta diferencia respecto al de la turbidez sobre todo a menores concentraciones de la fuente de nitrato ( $0.29 \pm 0.02$ ), para así regularizarse a una fuente de nitrógeno 8 mM, hasta alcanzar valores similares a este estudio ( $0.62 \pm 0.02$ ).

Se pudo constatar el crecimiento de *Scytonema* sp. a bajas o nulas concentraciones de nitrato. Se asume que es debido a su capacidad fijadora de nitrógeno, evidenciándose en un incremento de heterocistos a estas condiciones de cultivo, lo cual ha sido reportado en otras cianobacterias filamentosas (Stacey *et al.* 1977; Tandeau *et al.*, 1993), mientras que un

aumento de la concentración de fuentes nitrogenadas en el medio de cultivo ha inducido un descenso en el número de heterocistos en el cultivo (Mishra 1997).

En diversos estudios se correlacionó los valores obtenidos mediante el método de turbidez y los de recuento celular con una cámara de Neübauer. (Fábregas *et al.*, 1995; Fábregas *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 2002; Loreto *et al.*, 2003; Loreto *et al.*, 2004; Rosales *et al.*, 2006), e incluso específicamente en trabajos con *Scytonema* sp. (San José *et al.*, 1991; Mian, 2002; Doutelo *et al.*, 2004; Grewe, 2005).

Por recomendación directa del Lcdo. Néstor Rosales y el Dr. Ever Morales, investigadores del **Laboratorio de Bioquímica y Microorganismos Fotosintéticos** de la Universidad de Zulia, Venezuela, se empleó el método de turbidez y la producción de los pigmentos, específicamente de la clorofila *a* para seguir el crecimiento de la cepa (Kobayashi, 1961; Epley *et al.*, 1966, Leal, 2001, Fuenmayor, 2009).

Al evaluar el desarrollo del cultivo hasta su culminación, en todos los ensayos a disímiles valores de pH, se observaron etapas de crecimiento definidas, lo cual probablemente demuestre que *Scytonema* sp. es capaz de crecer bajo un intervalo amplio (6 a 10), teniendo como principal característica la alcalinización del medio, posiblemente porque se ve afectado por la composición, la cantidad de dióxido de carbono disuelto, la temperatura que a su vez controla la solubilidad del CO<sub>2</sub>, la actividad metabólica de las células e inclusive de la fuente de nitrógeno utilizada (nitrato de sodio), ya que la misma ejerce un papel importante en el incremento del pH del cultivo debido a la liberación de iones OH<sup>-</sup> durante el proceso de fotoasimilación del nitrato (Albertano *et al.*, 2000; Bermúdez *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2004).

Según lo observado en las pruebas de Duncan, se ubicaron en un mismo subconjunto los valores obtenidos a pH 6, 8 y 10, por lo que se podría afirmar que este factor no influenció en los primeros 18 días de crecimiento.

Se demuestra a su vez, la versatilidad y el amplio espectro de opciones, a partir de la implementación de una producción semicontinua de biomasa (cada tres días a partir de la fase exponencial) y el manejo de la tasa de reposición, una herramienta muy valiosa en el control de la productividad de metabolitos, los cuales son procesos que fácilmente pueden ser llevados a un escalamiento, para una producción a escala industrial.

La eficiencia en cuanto a producción de biomasa, fue evaluada de acuerdo a la tasa de crecimiento previa (pruebas piloto), de esta forma se planteó un intervalo de tiempo adecuado (tres días), el cual permitió la regeneración de la población cianobacteriana, durante la ejecución del ensayo. Comparativamente, la tasa de crecimiento obtenida y bajo la mejor combinación de factores es similar a la presentada en trabajos como los de Morales (2003) en el cual, el rango de la tasa va desde 0.099 div/día a pH 6 hasta 0.23 div/día a pH 9, sin embargo, es deficiente frente a otros microorganismos, como se ha reportado en el trabajo de Fábregas (1995), con valores superiores a 1 div/día.

En estudios con *Anabaena* PCC7120 (Loreto *et al.*, 2003), *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum* (Fábregas *et al.*, 1996, 1998) y *Limnospira redekei* (Mundt, 2001), se ha reportado elevados rendimientos en la producción de biomasa hasta una tasa de reposición de 30%, obteniéndose las mayores densidades celulares de estabilización a una tasa de 10% y encontrándose un efecto de lavado en los cultivos renovados a 50%. Esto podría ser consecuencia de una baja velocidad de crecimiento, en relación a su capacidad para regenerar la población de células cada 24 horas.

Es por esta razón, se optó por el establecimiento de una tasa de reposición cada tres días, como en el trabajo de Mundt, y con tasas de reposición al 10% y 30%, ya que los valores de la tasa de crecimiento que se obtuvieron en la prueba piloto y durante la fase experimental (Figuras 3.10 y 3.11), permiten presuponer que no se puede sostener sistemas de renovación cada 24 horas y a mayores tasas de renovación. Los mayores valores del método de turbidez (Tabla 3.6) fueron conseguidos a la tasa de renovación

más baja (10%), sin embargo, a la tasa de renovación de 30%, también se pudo trabajar con muy buenos rendimientos. Estos datos son muy importantes y deberían de ser tomados en cuenta al momento de armar una planta piloto e incluso en la implementación de biorreactores para su producción, ya que al manejar mayores concentraciones de biomasa, dichos valores nos servirían para diseñar los parámetros bajo los cuales podríamos implementar un escalamiento.

Entre los requisitos más importantes para la obtención de ficobiliproteínas a partir de cianobacterias está, en primer lugar, la selección de una cepa que posea altas concentraciones de estos pigmentos-proteína, lograr su óptima extracción, disponer de adecuadas condiciones de cultivo y, dependiendo del destino final del producto, optimizar un eficiente proceso de purificación. Para la extracción de los pigmentos es necesario, en primer lugar, la ruptura de la pared celular, lo cual puede lograrse a través de métodos mecánicos y/o enzimáticos, liberándose de este modo las ficobiliproteínas en solución (Rowan, 1989).

La ruptura de la pared celular para la liberación de las ficobiliproteínas se puede realizar por sonicación prolongada (Siegelman *et al.*, 1978) o mediante ciclos de congelación y descongelación reiterados, métodos que se utilizan fundamentalmente en los cultivos de microalgas y cianobacterias en condiciones de laboratorio (Alberte, *et al.*, 1984). El método de congelación y descongelación a 4°C, resulta ser económico y es avalado en la literatura, proporcionando el mayor rendimiento y la mayor pureza, comparándolo con otros comúnmente utilizados.

Cuando el objetivo es la producción de ficocianina, la utilización de diversas concentraciones de la fuente de nitrato parece ser la mejor alternativa (Stanier *et al.*, 1971; Levi *et al.*, 1976; Kana *et al.*, 1992; Becker, 1994; Omata, 1995)

Los resultados obtenidos demostraron que concentraciones muy bajas o nulas de nitrato son insuficientes para obtener un buen crecimiento de esta

cianobacteria, sin embargo, existen diversos estudios en los cuales concentraciones muy altas de la fuente de nitrato se consideraron un medio limitante de nitrógeno para las cianobacterias *Oscillatoria agardhi* y *O. redekei* (Foy, 1993),

Comparativamente, *Scytonema* sp. es 4.2, 5.8 y 6.0 veces menos productiva que otras cepas de cianobacterias respectivamente, según lo demostrado en los trabajos de Loreto (2003), Morales (2003) y Fuenmayor (2009).

En los cultivos con 8 mM de nitrato se obtuvo la mayor concentración de ficocianina, cuya producción era el objetivo principal. Medios con concentraciones de nitrato de 10 mM se han considerado suficientes para el cultivo de cianobacterias (Foy, 1993). Es destacable el hecho una vez más, que antes de ser establecida la tasa de reposición, las pruebas de Duncan, establecieron en el mismo subconjunto a los cultivos óptimos de producción de ficocianina, a 5 kluxes y 8mM pero indistintamente del pH, lo que sugiere que este factor no participa en la regulación de la producción de ficocianinas. Iguales resultados se han observado en los estudios de Betancourt (1997) y Loreto (2003).

Respecto a la tasa de reposición, la producción de ficocianina pudo ser mantenida al finalizar el ensayo en el día 45, sin embargo existió una caída en los días intermedios de dicha producción una vez alcanzada la fase exponencial.

La concentración de los pigmentos fotosintéticos se relaciona con la concentración de nitrógeno. De hecho, la retirada de nitrógeno del medio de cultivo generalmente causa clorosis (Allen *et al.*, 1969) debido a una drástica reducción de las ficobiliproteínas. Este fenómeno es bastante rápido, degradándose de un 80 a un 95 % de las ficobiliproteínas durante las primeras 24 horas de limitación (Boussiba *et al.*, 1980). En los cultivos con ausencia de nitrato y una vez empezados los regímenes de reposición probablemente se

produjo una clorosis durante la fase estacionaria, con pérdidas claras de la pigmentación celular.

Un gran número de estudios han demostrado que la movilización del nitrógeno de los componentes fotosintéticos permite continuar con la síntesis de proteínas esenciales para el mantenimiento celular y el crecimiento durante los períodos de deficiencia de nitrógeno (Perry *et al.*, 1981) y las ficobiliproteínas, además de constituir un pigmento fotosintético accesorio, tienen el papel funcional de compuestos de reserva de nitrógeno (Carr, 1988).

*En Anacystis nidulans* se ha demostrado que la síntesis de la ficocianina es reprimida selectivamente en un medio deficiente en nitrógeno (Lau *et al.*, 1977). Además de la reducción en su tasa de producción, las cianobacterias son capaces de degradar las ficobiliproteínas presentes en la célula cuando el organismo se halla en un estrés de nitrógeno (Lau *et al.*, 1977; Yamanaka *et al.*, 1980) y éstas condiciones son las responsables de una parte significativa del contenido de nitrógeno celular (Kana *et al.*, 1987). La degradación de las ficobiliproteínas es, por tanto, el mecanismo de movilización del nitrógeno para aquellos procesos que mantienen el crecimiento celular o el metabolismo durante el tiempo en que el suplemento exógeno de nitrógeno se agota (Lewitus *et al.*, 1990).

La movilización de la ficocianina como una fuente de nitrógeno endógena parece ser una respuesta adaptativa de esta cianobacteria a las etapas tempranas de la deficiencia de nitrógeno. En la mayoría de las especies de cianobacterias el descenso en el contenido de las ficobiliproteínas en respuesta al estrés de nitrógeno ocurre antes de la pérdida del contenido de clorofila a y la disminución de la tasa de crecimiento (Allen *et al.*, 1980; Boussiba *et al.*, 1980; Bayer *et al.*, 1986; Schenk *et al.*, 1987).

Respecto a los carotenoides, el aumento de su producción fue muy leve, aunque estadísticamente significativa,  $p < 0.05$  en los primeros 18 días (Tabla 3.12). La producción de este pigmento es igual de eficiente respecto a los estudios de Fuenmayor ( $5.66 \pm 0.63$ ), y Morales ( $6.52 \pm 0.02$ ) y mayor en 1.5

veces a lo conseguido por Loreto ( $4.5 \pm 0.3$ ). Se constata, según las pruebas de Duncan, que el pH en el rango establecido para este estudio no influencia la producción de este pigmento, ya que los mayores valores se produjeron a 6, 8 y 10 respectivamente. El factor tasa de reposición, no presentó significancia alguna una vez establecido, lo cual queda demostrado estadísticamente y en las gráficas (Anexo 5), ya que se observó una producción estable a lo largo del tiempo. Posiblemente, esta cianobacteria activa otro proceso de aclimatación o de control para evitar la degradación de este pigmento, a múltiples rangos de pH, elevadas intensidades luminosas y al establecer tasas de reposición; tal como se ha descrito en las cianobacterias *Synechococcus* PCC 7002, *Synechococcus* PCC 6301 y *Microcystis aeruginosa*; en las cuales no hay variación en los contenidos de carotenoides (Tandeau et al., 1993). (estadísticamente ubicados en el mismo subconjunto).

Las pruebas espectrofotométricas de los pigmentos de clorofila se desarrollaron en los años 1930 y 1940 (Weber et al., 1986). Richards y Thompson (1952) introdujeron diversas técnicas tricromáticas para la estimación de las clorofilas a, b, y c. Dichas técnicas y ecuaciones han sido modificadas con el pasar de los años (Parsons et al., 1963, UNESCO, 1966; Jeffrey et al., 1975), sin embargo, dichas metodologías no tomaban en consideración a los productos de la degradación de la clorofila.

Lorenzen y Moss (1967), fueron los pioneros en introducir un paso de acidificación durante el proceso de cuantificación espectrofotométrica de la clorofila para eludir la interferencia con los productos de degradación de dicho pigmento. En los primeros trabajos, se utilizaba acetona saturada con ácido oxálico para acidificar el medio (Holm-Hansen et al., 1965). Hoy en día, el ácido clorhídrico (HCl) se utiliza casi exclusivamente, porque la reacción es más rápida y completa. La conversión es casi instantánea de clorofila a feofitina. (Yentsch et al., 1963) Pese a que en la bibliografía se señala que pueden haber comportamientos anómalos durante las mediciones espectrofotométricas al utilizar la técnica de extracción con metanol (Marker, 1972), en este trabajo, no se observó alteración alguna.

El problema central en el ensayo de extracción de clorofila por cualquier método siempre ha sido la eliminación cuantitativa de la clorofila de las células. Existen muchos solventes que pueden ser utilizados para dicha extracción, sin embargo se decidió utilizar el metanol, combinándolo con el paso de acidificación, de esta forma se pretendió, tener una medida más real de la producción de clorofila.

El aumento de la producción de clorofila a a bajas irradiancias; tal y como se observó en los cultivos de esta cianobacteria; es un hecho bastante conocido y reportado en otras cianobacterias como *Anabaena* (Martín-Trillo 1995), *Spirulina subsalsa* (Tomaselli *et al.*, 1995), *Plectonema boryanum* UTEX 485 (Mis'kiewicz *et al.* 2000), *Pseudobaena galeata* (Romo, 1994; Leal *et al.*, 2001) y *Anabaena* PCC7120 (Loreto *et al.*, 2003) y se produce básicamente por un efecto de ensombrecimiento. Las células al encontrarse en un medio con poca iluminación aumentan la cantidad de membranas tilacoides y de ficobilisomas para captar la mayor cantidad de energía radiante posible (Tandeau *et al.*, 1993).

En un estudio realizado por Schagerl y Müller (2006) con cuatro cepas de cianobacterias filamentosas, hallaron que al comparar los tratamientos, las bajas irradiancias causaron aumento del contenido de clorofila a en en *Nostoc* sp. y *Anabaena cilíndrica*, observándose una fuerte correlación entre la baja irradiancia y bajas tasas de reposición respecto al incremento de la síntesis de clorofila.

La concentración de nitrato también influyó en el contenido de clorofila. De tal manera, que para alcanzar una mayor producción de clorofila a es necesario utilizar concentraciones de nutrientes equivalente al menos a 8 mM de NaNO<sub>3</sub>.

En cambio, cuando la cianobacteria se cultivó a concentraciones nulas se produjeron los valores más bajos de este compuesto. De todas formas, queda demostrada su capacidad diazotrófica bajo ausencia de nitrógeno. Fábregas (1996), reporta que en *Tetraselmis suecica* cultivada a diversas

concentraciones de nitrato de sodio (entre 0.5 a 16 mM), se encontraron los mayores valores de clorofila total entre 4 y 8mM. Lo mismo ocurre en los trabajos en *Anabaena* PCC7120 (Loreto *et al.*, 2003) y en los estudios en los que se combina la tasa de crecimiento con la concentración de nitrógeno (10%, 8 mM y 16 mM) en *Phaeodactylum tricornutum* por Fábregas (1996) e incluso valores aún superiores como es el caso reportado en *Dunaliella viridis* con una concentración 10 mM o el de *Synechococcus* sp. a 12 mM para la producción máxima (Yépez *et al.*, 1998; Rosales *et al.*, 2006).

La producción de clorofila *a* en *Scytonema* sp. se destaca frente a otros estudios y ensayos realizados con cianobacterias, ya que la misma es 2.3 veces superiores a los valores obtenidos en el estudio de Loreto (2003), 2.1 veces superiores a los resultados de Fuenmayor (2009) y 1.77 veces superiores a lo obtenido por Morales en 2003.

En muchos estudios, se plantea la utilización de tampones (fosfato, TRIS-HCl, Hepes) para el control y sostenimiento del pH en los cultivos respectivos (Bermúdez *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2002; Moronta *et al.*, 2006), sin embargo, el uso de fosfato y TRIS como tampones del medio no es aconsejable ya que las concentraciones necesarias para esta función son inhibitorias o incluso tóxicas para muchas especies (Rippka, 1988; Bermúdez *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2002) por lo que se llevó la regulación del pH sin el uso de tampones, con soluciones 1 N de HCl y NaOH, como lo descrito en Fuenmayor *et al.*, 2009; y por sugerencia directa del Dr. Ever Morales.

Durante la fase exponencial de la prueba piloto y de los cultivos madre, el pH fue monitoreado. El mismo, osciló entre 9.0 a 9.3, tendiendo a estabilizarse entre estos valores y sin presentar efecto nocivo alguno sobre el cultivo. Se podría considerar a este dato como referencia para el cultivo de esta cepa sin embargo, se demostró estadísticamente que este factor no tuvo un efecto realmente significativo sobre la producción de pigmentos y crecimiento de la cianobacteria. Trabajos previos con *Anabaena* PCC 7120 y *Synechocystis minúscula* han mostrado la estabilización del contenido de clorofila *a* y carotenoides en un rango desde 6 a 9 (Morales *et al.*, 2002; Jonte, 2003). En

otros microorganismos fotosintéticos se ha observado que no sólo la variación de este factor no ejerce influencia sobre el contenido de pigmentos liposolubles, sino que tampoco afecta la eficiencia fotosintética, la tasa máxima de fotosíntesis y la de respiración (Dorling *et al.*, 1997).

Todos estos resultados indican que *Scytonema* sp. es capaz de responder satisfactoriamente a cambios de irradiancia, concentración de nutrientes, pH y tasa de reposición en cultivos semicontinuos, es decir, su crecimiento no es fácilmente inhibido, aun a bajas concentraciones de nitrógeno, mayores irradiancias, pH ácido o incrementos en la tasa de reposición. Por lo tanto, se demuestra que la producción de clorofila *a*, ficocianina y carotenoides de la cepa posee un potencial productivo. La misma guarda similitudes respecto a su crecimiento y obtención de carotenoides frente a otras cepas cianobacterianas emparentadas y denota menor productividad de ficocianina respecto a otros microorganismos. La clorofila *a* merece especial atención y un mayor análisis, al alcanzar valores superiores que en ensayos similares, por lo que se podría considerar a la misma como una cepa con un alto potencial escalamiento y obtención a nivel industrial de clorofila *a* y cuya base serían todos los datos y factores derivados de esta investigación.

## **CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES**

Mediante la implementación del método de turbidez, en el crecimiento y cinética de *Scytonema* sp., se estableció que los mayores valores obtenidos espectrofotométricamente a 750 nm fueron  $0.7642 \pm 0.19682$  (primeros dieciocho días) y  $0.7813 \pm 0.213$  (una vez se estableció la tasa de reposición, en el día veintisiete).

Los mayores valores obtenidos mediante el método de turbidez en la cianobacteria *Scytonema* sp., bajo las condiciones y parámetros establecidos en el presente ensayo se alcanzaron bajo la combinación: 8 mM (concentración de la fuente de nitrógeno), 5 Kluxes (irradiancia) y tasa de reposición (10%).

La tasa de crecimiento fue estimada a partir de la mejor combinación (correlacionada estadísticamente) de factores para la producción y cuantificación del pigmento clorofila *a* (5 Kluxes, 8 mM, tasa de reposición 30%), siendo su valor de 0,1426 div/día, durante la fase exponencial y de -0,232 div/día, durante el establecimiento del sistema semicontinuo.

El pigmento ficocianina obtuvo una media de 26.8020  $\mu\text{g.mL}^{-1} \pm 9.669$  y de 30,0403  $\mu\text{g.mL}^{-1} \pm 7,4556$ , respectivamente para *Scytonema* sp., durante los ensayos realizados con el método de extracción metabólica, al producirse una clorosis en el medio. Este promedio se lo alcanzó bajo la combinación: medio BG11 8 mM, intensidad de 5 Kluxes y una tasa de reposición del 10%.

La media de la concentración de carotenoides más alta para *Scytonema* sp. se alcanzó con la extracción metabólica que manejó el tratamiento con medio BG11 8 mM, a una intensidad de 5 Kluxes y una tasa de reposición del 10% con un promedio de 5.044  $\mu\text{g.mL}^{-1} \pm 1.72077$  y de 5.2  $\mu\text{g.mL} \pm 1.48019$ .

El promedio de concentración de clorofila *a* más alto para *Scytonema* sp. se consiguió con el tratamiento que utilizó el método de Arnon con medio BG11 8 mM, a una intensidad de 5 Kluxes y una tasa de reposición del 30% con una media de 40.6658  $\mu\text{g.mL} \pm 17.08665$  y de 37.6668  $\mu\text{g.mL} \pm 13.41304$ , gracias a un efecto de ensombrecimiento.

La producción de clorofila *a*, ficocianina y carotenoides estadísticamente óptima, fue estimulada a elevadas concentraciones de nutrientes (fuente de nitrógeno 8 mM), a una baja tasa de reposición (10%) y a una baja irradiancia (5 Kluxes). La misma se alcanzó en el día dieciocho de haber empezado con los ensayos de *Scytonema* sp. Una vez establecida la tasa de reposición, se obtuvo los mejores resultados los días: veintiuno, cuarenta y cinco y veintisiete respectivamente.

El factor pH y sus interacciones fueron los únicos que demostraron ser estadísticamente no significantes para determinar los valores mediante el método de turbidez y la producción de los pigmentos clorofila *a* y ficocianina en

la cianobacteria *Scytonema* sp., no así para el pigmento carotenoide, para el cual el factor no significativo fue la tasa de reposición.

## **CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES**

La cepa *Scytonema* sp. fue purificada como parte 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” e identificada bajo clave microscópica en dicho género, sin embargo, sería importante para futuros estudios y potenciales aplicaciones efectuar la caracterización molecular de la misma, para identificar específicamente la especie a la que pertenece.

La producción de pigmentos y de otros metabolitos de interés de la cianobacteria *Scytonema* sp. podría ser aprovechada a nivel farmacéutico, cosmetológico, y alimenticio, a partir de estudios y pruebas de toxicidad, cuya implementación fue desarrollada con éxito en la literatura citada.

Se debería probar el crecimiento de la cianobacteria, mediante la implementación de otros medios de cultivo y nuevas combinaciones de variables, con el fin de abaratar los costos de su producción, para en un futuro,

pensar en el escalamiento óptimo y masificación de la misma, en la búsqueda de su producción a nivel industrial.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Abalde, J. Cid, A. Fidalgo, P. Torres, E. y Herrero, C. (1995). Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Monografía No 26. (pp 11-13). Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de La Coruña - España.
2. Abdulqader, G., Barsanti, L., Tredici, M. (2000). Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. J. Appl. Phycol. 12: 493-498.
3. Abed, R., Safi, N., Köster, J., de Beer, D., El-Nahhal, y., Rullkötter, J., Garcia-Pichel, F. (2002). Microbial Diversity of a Heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of Petroleum Compounds. J. Appl. Environ. Microbiol. , Vol 68:4, p. 1674-1683.
4. Albertano, P., Bruno, L., D'ottavi, D., Moscone, D., Palleschi, G. (2000). Effect of photosynthesis on pH variation in cyanobacterial biofilms from Roman catacombs. Journal of Applied Phycology 12: 379–384.
5. Alberte, R., Wood, A., Kursar, A., Guillard, R. (1984). Novel phycoerythrins in marine *Synechococcus* spp.: characterization and evolutionary and ecological significance. Plant Physiol. 75: 732-739.
6. Allen, M., Smith, A. (1969). Nitrogen chlorosis in blue-green algae. Arch. Mikrobiol. 69: 114-120.

7. Antonopoulou, S., Oikonomou, A., Karantonis, H., Fragopoulou, E., Pantazidou, A. (2002). Isolation and structural elucidation of biologically active phospholipids from *Scytonema julianum* (cyanobacteria). The Biochemical journal; 367(Pt 1):287-93.
8. Apt, K., Behrens, P. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. J. Phycol. 35: 215-226.
9. Archer, S., Mc Donald, K., Jackman, A. (1997). Effect of irradiance on the production of sulfolipids from *Anabaena* PCC 7120 in a fed-batch photobioreactor. Appl. Biochem. Biotech. 67: 15-28.
10. Arnon, D. (1949). A copper enzyme is isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24: 1-15.
11. Baldia, S., Nishijima, T., Hata, Y. (1991). Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Spirulina platensis* isolated from Lake Kojima, Japan. Nippon Suisan Gakkaishi, 57(3):481-490.
12. Bayer, M., Schenk, H. (1986). Biosynthesis of proteins in *Cyanophora paradoxa*. I. Protein import into the endocyanelle analyzed by micro twodimensional gel-electrophoresis. Endocyt. Cell Res. 3: 197-202
13. Becker, E. (1994). Microalgae. Biotechnology and Microbiology. Cambridge Univ. Press, Cambridge – Reino Unido.
14. Bennet A., Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous bluegreen algae. J. Cell Biol. 58: 419- 435.
15. Bermudez, J., Lodeiros, C., Morales, E. (2002). Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad, Bol. Inv. Mar. Cos. Vol. 31, p. 167-185.

16. Berry, S., Bolychevtseva, V., Rögner, M., Karapetyan, N. (2003). Photosynthetic and respiratory electron transport in the alkaliphilic cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Photosynthesis Research* 78: 67-76
17. Betancourt, L. (1997). Producción, purificación y caracterización de la ficocianina de *Synechococcus* sp. 109201 aislada en aguas de Cuba. Universidade da Coruna Facultade de Ciencias Departamento de Bioloxía celular y molecular. Microbioloxía.
18. Bokesch, R., O'keefe, R., Mckee, C., Pannell, K., Patterson, G., Gardella, S., Sowder, C., Turpin, J., Watson, K., Buckheit, W., Boyd, R. (2003). A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*, *Biochemistry*, vol. 42, nº9, pp. 2578-2584.
19. Bold, H., Wynne, M. (1985). Divisions Cyanophyta and Prochlorophyta. En: Introduction to the algae, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, pp. 34-69.
20. Borowitzka, M. (1988). Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp: 153-196.
21. Boussiba, S., Richmond, A. (1980). C-phycoyanin as a storage protein in the bluegreen algae *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125: 143-147.
22. Brownell, P., Nicholas, D. (1967). Some Effects of Sodium on Nitrate Assimilation and N<sub>2</sub> Fixation in *Anabaena Cylindrica*, *Plant Physiol.* Vol. 42, p 915-921.
23. Carr, N. (1988). Nitrogen reserves and dynamic reservoirs in cyanobacteria. En: Rogers, L.J. & Gallon, J.R. (eds.). Biochemistry of the algae and cyanobacteria. Clarendon Press, Oxford, pp: 13-21.

24. Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I., Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela, Boletín del Centro de investigaciones Biológicas de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, Vol 38, p 94 – 108.
25. Chamorro, G., Salazar, M., Favila, L., Bourges, H. (1996). Farmacología y toxicología del alga *Spirulina*. Rev. Invest. Clin. 48: 389-399.
26. Changyun, X., Barry, R., Istvan, B., Wlodawer, A. (2006). Overexpression and purification of scytovirin, a potent, novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*, Protein Expression and Purification 46: 233–239.
27. Chapman, L., Wilcox. L. (2000). Algae. Prentice Hall, Upper Saddle River – Estados Unidos.
28. Chetsumon, A., Maeda, I., Umeda, F., Yagi, K., Miura, Y., Mizoguchi, T. (1995). Continuous antibiotic production by an immobilized cyanobacterium in a seaweed-type bioreactor. Journal of applied phycology, vol. 7, n°2, pp. 135-139.
29. Chini G, Tomasello, V., Tredici, M. (1996). Outdoor cultivation of *Spiurlina platensis* during autumn and winter in temperate climates. *J. Appl. Phycol.* 8: 293-301.
30. Chorus, I., Bartram, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Publicado por E & FN Spon, Londres (Reino Unido). en nombre de la Organización Mundial de la Salud, Ginebra (Suiza).
31. Chye, L., John, W., Nigel, J., Titchener, H, Suzanne, S., Farid, A. (2006). Computer- Arded Approach to Compare the Production Economics of Fed-Batch and Perfusion Culture under Uncertainty. *Biotechnol Bioeng*; 93:687-97.

32. Cifuentes, J., Torres, P., Frías M. (2005). IX. Algas. Versión en línea < [http://omega.ilce.edu.mx.3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec\\_27.htm](http://omega.ilce.edu.mx.3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec_27.htm)>
33. Cohen, Z. (1986). Products of microalgae. En: Richmond, A. (ed.). Handbook of Microalgae Mass Culture. C.R.C. Press., Boca Raton, Florida, pp: 421-454.
34. Colyer, C., Kinkade, C., Viskari, P. (2005). Analysis of cyanobacterial pigments and proteins by electrophoretic and chromatographic method. Springer Berlin / Heidelberg. Volume 382, Number 3: 559 – 569.
35. Comber, R., Haveland-Smith, R. (1982). A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours ant other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. Mutation Res. 98, 101
36. De Lara, R., Castro, T., Castro, J., Castro, G., Malpica, A., García, V. (2005). La importancia de Spirulina en la alimentación acuícola. UAM, contactos 57, p 13 – 16.
37. Ding-mei, L., Yu-zao, Q. (1997). Spirulina Industry in China: Present status and future prospects. J. Appl. Phycol 9: 25-28.
38. Dorling M., McAuley P., Hodge H. (1997). Effect of pH on growth and carbon metabolism of maltose-releasing Chlorella. Eur J Phycol; 32: 19-24.
39. Douterelo I., Perona E., Mateo, P. (2004). Use of cyanobacteria to assess water quality in running waters. Environmental Pollution, 127 (3). pp. 377-384.
40. Elizer, L. (2002). Spirulina platensis growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. EJB Electron. J. Biotechnol., 5(3). 251-257.

41. Eppley, R., Sloan, P. (1966). Growth rates of marine phytoplankton: Correlation with light absorption by cell chlorophyll-a. *Physiol. Plant.* 19, 47-59.
42. Fábregas J., García, D., Morales, E., Domínguez, A., Otero, A. (1998). Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 463-467.
43. Fábregas, J., J. Abalde, C., Herrero, B. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrients concentrations. *Aquaculture*. 42: 207-215.
44. Fábregas, 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.
45. Fábregas, J., Patiño, B., Arredondo, J., Otero, A. (1995). Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 44:287-292.
46. Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B., Patino, M. (1996). *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to Artemia. *Aquaculture*, 143 (2). pp. 197-204.
47. Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E., Cordero, B., Otero, A. (1996). Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in semicontinuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1):266-268.
48. Fay, P. (1983). The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria). Edward Arnold (Pubs.). Londres – Reino Unido.

49. Finlay, V. (2003). *Color: A Natural History of the Palette*. Random House. New York – Estados Unidos.
50. Florentino, M. (2009). Reemplazan tinturas sintéticas mediante insectos. Publicación de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Versión en línea: <[http://agoracactus.com.ar/index.php?topic=6645.0;prev\\_next=prev](http://agoracactus.com.ar/index.php?topic=6645.0;prev_next=prev)>.
51. Foy, R. (1993). The phycocyanin to chlorophyll a ratio and cell components as indicators of nutrient limitation in two planktonic cyanobacteria subjected to low light exposures. Journal of Plankton Research 15: 1263-1276.
52. Fuenmayor, G., Jonte, L., Rosales, N. (2009). Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos. Rev. Soc. Ven. Microbiol., vol.29, no.1, p.21-25. ISSN 1315-2556.
53. Gallardo, S. (2001). Algas que extraen metales del agua. Ecofield. Versión en línea <<http://www.ecofield.com.ar/notas/n-140.htm>>
54. Garbisu, C., Blanco, A., Alkorta, I., Llama, M., Serra, J. (1999). Biotecnología con cianobacterias. Investigación Ciencia 65-71.
55. Gebhardt, J., Nierzwicki-Bauer, S. (1991). Identification of a Common Cyanobacterial Symbiont Associated with *Azolla* spp. Through Molecular and Morphological Characterization of Free-Living and Symbiotic Cyanobacteria. J. Appl. Environ. Microbiol., Vol 57:8, p. 2141-2146.
56. *Global Biodiversity Information Facility*. (2010). Species: *Scytonema allochromum*. Versión en línea: <<http://data.gbif.org/species/20112443/>>
57. Golubic, S. (1999). Early cyanobacterial fossil record: Preservation, palaeo-environments and identification. Eur. J. Phycol. 34:339-348.

58. González, M., Parra, O., Cifuentes, A. (1995). Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. en: K. Alvear, M. Ferrario, E. Oliveira & E. Sar (eds.). pp. 219-250. Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción. Editorial Aníbal Pinto S. A., Concepción, Chile.
59. Henrikson, R. (2005). Earth Food Spirulina. Versión en línea: <http://www.spirulina.com/earthfood.html>.
60. Herrera, A., Boussiba, S., Napoleone, V., Hohlberg, A. (1989). Recovery of cphycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *J. Appl. Phycol.* 1: 325-331.
61. Hernández, M., Travieso, N. (1998). Comportamiento de *Anabaena cylindrica* en diferentes medios de cultivo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 29: 89-92.
62. Hoffmann, L. (1988). Criteria for the classification of 89 blue-green algae at the genus and at the species level. *Archives of Hydrobiology / Algological Studies* 50: 131-139.
63. Holm-Hansen, O., Lorenzen, C., Holmes, R., Strickland, J. (1965). Fluorometric Determination Of Chlorophyll, *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 30: 3-15.
64. Iwata, K. (1990). Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in of Nutrition, Kagawa Nutrition College, Toshima-ku, Japan. *Tokyo Journal of nutritional science and vitaminology* 170: 165-171.
65. Jeffrey, S. Humphrey, G. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen Bd.* 167: 191-194.

66. Jonte, L. (2003). *Crecimiento de la cianobacteria Synechocystis minúscula en respuesta a diversos parámetros de cultivos. Trabajo de Grado. Universidad de Zulia - Venezuela. 156 p.*
67. Kana, T., Glibert, P. (1987). Effects of irradiances up to (2000)  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  on marine *Synechococcus* WH7803. Growth, pigmentation, and cell composition. Deep Sea Res. 34: 479-495.
68. Kana, T., Feirvel, N., Flynn, L. (1992). Nitrogen starvation in marine *Synechococcus* strains: clonal differences in phycobiliprotein breakdown and energy coupling. Mar. Ecol.Prog. Ser. 88: 75-82.
69. Karseno, H, Bamba, T, Dwi, S, Mahakhant, A, Yoshikawa, T, Hirata, K. (2009). Extracellular phycoerythrin-like protein released by freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* and *Scytonema* sp. Biotechnol Lett. 31(7):999-1003
70. Kassinger, R. (2003). *Dyes: From Sea Snails to Synthetics, Twenty-First Century Books. Breckenridge – Estados Unidos.*
71. Kobayashi, H. (1961). Chlorophyll content in sessile algal communities of a Japanese mountain river. The Botanical Magazine 74: 228–235.
72. Koch, A. García, M. Villacís, N. Vieira, N. y Rosero, G. (2008). Condiciones óptimas de crecimiento de cianobacterias en cultivo mixto procedentes de la filosfera de bosques nativos de *Polylepis pauta*. Ciencia. Vol 11,1:99-111
73. Kochert, G. (1978). *Carbohydrate determination by the phenolsulfuric acid method, Handbook of phycological methods, Cambridge University Press, New York – Estados Unidos. pp. 95-98.*

74. Komárek, J., Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4-Nostocales. Arch. Hydrobiol. Suppl. 82: 247-345.
75. 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.
76. Lau, P., Tam, N., Wong, Y. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater, J. Environmental Pollution 89, págs 59-66.
77. Lau, R., Mackenzie, M., Doolittle, W. (1977). Phycocyanin synthesis and degradation in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. J. Bact. 132: 771-778.
78. Lawlor, D. (1993). Photosynthesis. Longman Scientific and Technical. Reino Unido.
79. Leal, M.;Quintero, L; Mora, R.; Ruiz, G. Perona, E., Morales, E. (2001). Caracterización de la cianobacteria *Pseudoanabaena galeata* a diferentes condiciones de cultivo, aislada de la represa de Tulé, Estado Zulia, Venezuela. *Boletín del centro de Investigaciones Biológicas* 35 3 : 223-241
80. Levi, C., Preiss, J. (1976). Regulatory properties of the ADP-glucose pyrophosphorylase of the blue-green bacterium *Synechococcus* 6301. Plant Physiol. 58: 753-756.
81. Lewitus, A., Caron, D. (1990). Relative effects of nitrogen and phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). Mar. Ecol. Prog. Ser. 61: 171-181.

82. Liotenberg S., Campbell, D., Rippka, R., Houmard, J., Tandeau de Marsac, N. (1996). Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. Microbiology 142: 611-622.
83. Loreto, C., Morales, E. (2003). Productividad de la Cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en Cultivos Semicontinuos. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Zulia - Venezuela. Vol 37, N° 1: 21-34.
84. 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.
85. McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J., Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. The Lancet 370(9598):1560-7.
86. Marker, A. (1972). The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. Freshwater Biology 2: 361-385.
87. Marker, A., Crowther, C., Gunn, R. (1980). Methanol and acetone solvents for estimating chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometry. Archiv für Hydro. Beihefte, vol 14, p: 52-69.
88. Martínez, I., Orús, M., Marco, E. (1997). Carboxysome structure and function in a mutant of *Synechococcus* that requires high levels of CO<sub>2</sub> for growth, Plant Physiol Biochem 35: 137-146.
89. Martín-Trillo, M. (1995). Afloramientos masivos (blooms) de cianobacterias en los arrozales valencianos: seguimiento de su desarrollo y

caracterización de dos estirpes formadoras. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Madrid - España.

90. Mastala, Z., Herodek, S., Balogh, K., Borbely, G., Shafik, H., Voeroes, L. (1996). Nutrient requirement and growth of a *Synechococcus* species isolated from Lake Balaton. Inter. Rev. Gesamt. Hydrobiol. 81: 503-512.

91. Miles, B. (2003). Photosystems I and II. Versión en línea <<http://www.tamu.edu/classes/bich/bmiles/lectures/photosystems.pdf> >

92. Mis'kiewicz, E., Ivanov, A., Williams, J., Khan, M., Falk, S., Huner, N. (2000). Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum* UTEX 485, to temperature and light. Plant Cell Physiol. 41: 767-775.

93. Mishra, A. (1997). Regulation of cellular constituents, heterocyst development, photosynthetic O<sub>2</sub> evolution and enzyme activities of *Anabaena* PCC 7120 by nitrogen sources. Cytobios 89: 173-182.

94. Mora, R., Moronta, R., Ortega, J., Morales, E. (2004). Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la Repesa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. Ciencia Maracaibo - Venezuela, V12 N2.

95. Morales, E., Rodríguez, M., García, D., Loreto, C., Marco, E. (2002). Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO<sub>2</sub>, Interciencia, Vol. 27:7, p 373 – 378.

96. Moronta, R., Mora, R., Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. Revista Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia - Venezuela. 23: 28-43.

97. Mundt, S., S. Kreilow, A. Nowotny & U. Effmert. (2001). Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. International Journal of Hygiene and Environmental Health 203: 327- 334.
98. Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. Biomol Eng. (2003) Jul;20(4-6):459-66.
99. Olson, T., Le Van de Meene, A., Francis, N., Pierson, B., Blankenship, R. (2007). Pigment Analisis of "Candidatus Chlorothrix halophila", a Green Filamentous Anoxygenic Phototrophic Bacterium. Journal of Bacteriology, p 4187 - 4195.
100. Olvera-Ramírez, R., Ríos-Leal, E., Vicente-García V. (2003). Manual de Técnicas para el Cultivo y Extracción de Bioproductos a Partir de Microalgas. México DF - México. 69 pp.
101. Omata, T. (1995). Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7972. Plant Cell Physiol. 36:
102. Paniagua-Michael, J., Dujardin, E., Sironval, C. (2004). Crónica Azteca: El tecuitlatl, concentrado de algas espirulinas fuente de proteínas comestibles del pueblo de los Aztecas. [www.spiralspring.com/h\\_Textos/Cronica%20azteca.pdf](http://www.spiralspring.com/h_Textos/Cronica%20azteca.pdf).
103. Parsons, T., Strickland, J. (1963). Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. J. Mar. Res. 21: 155-163.
104. Patterson, G., Bolis, C. (1994). Regulation of scytonemin accumulation in cultures of Scytonema ocellatum. II. Nutrient requirements. Appl Microbiol Biotechnol (1995) 43:692-700.

105. Perry, M., Talbot, M., Alberte, R. (1981). Photoadaptation in marine phytoplankton: response of the photosynthetic unit. *Mar. Biol.* 62: 91-101.
106. Poncé, B., Theodose, F., Sarthou, C, Ponge, F, Bodo, B. (2004). New Pigments from the Terrestrial Cyanobacterium *Scytonema* sp. Collected on the Mitaraka Inselberg, French Guyana. *Journal of Natural Products* 67 (4). 678-681.
107. Purcell, J., Brelford, A. (2004). Reassessing the causes of decline of *Polylepis*, a tropical subalpine forest. *ECOTROPICA* 10: p. 155–158.
108. Rai, A. (1997). Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology. Springer Link. Versión en línea <[http://books.google.com.ec/books?id=loLoGfgGggC&printsec=frontcover&dq=Cyanobacteria&lr=&source=gbs\\_summary\\_r&cad=0#PPR9,M1](http://books.google.com.ec/books?id=loLoGfgGggC&printsec=frontcover&dq=Cyanobacteria&lr=&source=gbs_summary_r&cad=0#PPR9,M1)>
109. Rai, M. (2006). Handbook of Microbial Biofertilizers. Haworth Press. Versión en línea: <[http://books.google.com.ec/books?id=xE4eXkl2j\\_EC&printsec=frontcover&dq=Cyanobacteria&lr=&source=gbs\\_summary\\_r&cad=0#PPR9,M1](http://books.google.com.ec/books?id=xE4eXkl2j_EC&printsec=frontcover&dq=Cyanobacteria&lr=&source=gbs_summary_r&cad=0#PPR9,M1)>
110. Raabjerg, U. (2008). Futuro brillante para los colorantes naturales. Versión en línea <[http://chr-hansen.es/noticias/news\\_single/article/futuro-brillante-para-los-colorantes-naturales.html?L=0&cHash=55bb2c7b913ecc068cf24d7330c262a1](http://chr-hansen.es/noticias/news_single/article/futuro-brillante-para-los-colorantes-naturales.html?L=0&cHash=55bb2c7b913ecc068cf24d7330c262a1)>
111. Ramirez-Moreno, L., Olvera-Ramirez, R. (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *INCI*, vol.31, no.9, p.657-663. ISSN 0378-1844.
112. Reynaud, P., Franche, C. (1986). Isolation and characterization of nonheterocystous tropical cyanobacteria growing on nitrogen-free medium, *J. Mircen*, 2, p. 427-443.

113. Richards, F., Thompson, T. (1952). The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. J. Mar. Res. 11:156-172.
114. Richmond, A. (1990). Large scale microalgal culture and applications. Prog. Phycol. Res. 7: 1-62.
115. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., Stanier, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Journal of General Microbiology 111, 1-61.
116. Rippka, R. (1988). Isolation and Purification of Cyanobacteria. Methods in Enzymology, 167: 3-27. Romay, C., Ramirez, D., Gonzalez, R. (2001). Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal. Rev Cubana Invest Bioméd, Ciudad de la Habana, v. 20, n.
117. Robarts, D., Zohary, T. (1987). Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. Vol. 21,
118. Robledo, D. (1997). Las algas y la biodiversidad. Biodiversitas 13: 2-4.
119. Romay, C., Ramirez, D., Gonzalez, R. (2001). Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal. Rev Cubana Invest Biomédica, Ciudad de la Habana, v. 20, n. 1.
120. Romo, S. (1994). Growth parameters of Pseudanabaena galeata Bocher in culture under different light and temperature conditions. Algological studies 75, 239-248. Stuttgart, November.
121. Romoleroux, K. (1996). Rosaceae. En: Flora of Ecuador. (Harling, G. y Anderson, L. eds.) No. 56. University of Gotenborg; Riksmuseum; Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Goterborg; Stockholm; Quito.

122. Rosales, N., Jonte, L., Morales, E. (2006). Crecimiento y composición bioquímica de *Synechococcus* sp. modulados por nitrato de sodio, Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, Vol. 40(2). p 120-132.

123. Rossotti, H. (1983). *Colour: Why the World Isn't Grey*. Princeton University Press. Princeton – Estados Unidos.

124. Rowan, K. (1989). The biliproteins. Photosynthetic pigments of algae. Cambridge University Press, New York – Estados Unidos.

125. San José, J., Bravo, C. (1991). CO<sub>2</sub> Exchange in soil algal crusts occurring in the trachypogon savannas of the Orinoco Llanos, Venezuela. *Plant and Soil* Volume 135, Number 2, 233-244.

126. Sarmiento, G. (1986). Ecological features of climate in high tropical mountains. En: Vuilleumier, F., M. Monasterio (eds.). *High Altitude Tropical Biogeography*. Oxford University Press. American Museum of Natural History.

127. Sathiyamoorthy, P., Shanmugasundaram, S. (1996). Preparation of cyanobacterial peptide toxin as a biopesticide against cotton pests; *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 46, n°5-6, pp. 511-513.

128. Schenk, H., Bayer, M., Maier, T. (1987). Nitrate assimilation and regulation of biosynthesis and desintegration of phycobiliproteins by *Cyanophoraparadoxa*. Indications for a nitrogen store function of the phycobiliproteins. *Endocyt. Cell Res.* 4: 167-176.

129. Schopf, J. (1993). Microfossil of the early Archean apex chert: new evidence of antiquity of life. *Science*. 260: 640-646.

130. Schopf, J. (2000). The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. En: Whitton BA, Potts M (eds). The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space, pp.13-35. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
131. Six, C., Thomas, J., Thion, L., Zal, F., Partensky, F. (2005). Two novel phycoerythrin associated linker proteins in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain WH8102. Journal of Bacteriology, p 1685 – 1694
132. Stacey, G., van Baalen, C., Tabita, R. (1977). Isolation and characterization of a marine *Anabaena* sp. capable of rapid growth on molecular nitrogen. Archives of Microbiology 114: 197-201.
133. Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel, M. Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order *Chroococcales*). American Society for Microbiology 35: 171-205.
134. Strickland, J., Parsons, T. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167. Fisheries Research
135. Svenning, M., Eriksson, T, Rasmussen, U. (2005). Phylogeny of symbiotic cyanobacteria within the genus *Nostoc* based on 16S rDNA sequence analyses. Arch Microbiol. 183, 19-26
136. Tandeau de Marsac, N., Houmar, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps toward molecular mechanisms. FEMS Microbiology Reviews 104: 119-190.
137. Tang, D., Shi, S., Li, D., Hu, C, Liu, Y. (2007). Physiological and biochemical responses of *Scytonema javanicum* (cyanobacterium) to salt stress. Journal of Arid Environments 71: 312–320.

138. Tomaselli, L., Margheri, M. (1995). Effects of light on pigments and photosynthetic activity in a phycoerithrinrich strain of *Spirulina subsalsa*. *Aquat. Microbial Ecol.* 9: 27-31.
139. UNESCO. (1966). Monograph on oceanographic methodology. I. Determination of photosynthetic pigments in sea water. United Nations Educ., Sci., and Cult. Org., Paris.
140. Van den hoek, C., Mann, D., Jahns, H. (1995). Algae: An introduction to phycology Cambridge University Press. New York – Estados Unidos.
141. Venkatamaran, L. (1986). Blue-Green algae as biofertilizer. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture* (ed. A. Richmond). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, Estados Unidos. p. 455-472.
142. Vera, A., Martinez, M., Morillo, K. (2004). Cultivo Discontinuo de *Chlorella* sp. en Medios Enriquecidos con el Exudado Gomoso de *Acacia macracantha*. *Bol. Centro Invest. Biol.*, Vol.38:2, p.109-119.
143. Vieira, J., G. Linde, D. Pires, G. Martinez, Trapp, R. (2000). Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 15-18.
144. Vonshak, A. (1987). Strain selection of *Spirulina* suitable for mass production. *Hydrobiologia* 151: 75-77.
145. Weber, C., Fay, L., Collins, G., Rathke, D., Tobin, J. (1986). A review of methods for the analysis of chlorophyll in periphyton and plankton of marine and freshwater systems. Ohio State University Sea Grant Program Tech Bull. OHSU-TB-15.
146. Wood, N., Haselkorn, R. (1980). Control of phycobiliprotein proteolysis and heterocyst differentiation in *Anabaena*. *J. Bacteriol.* 141: 1375-1385.

147. Yamanaka, G., Glazer, A. (1980). Dynamic aspects of phycobilisome structure. Arch. Microbiol. 124: 39-47.
148. Yentsch, C., Menzel, D. (1963). A Method For The Determination Of Phytoplankton, Chlorophyll, And Pheophytin By Fluorescence, Deep Sea Research, 10, 221-231.
149. Yepez, M., Morales, E. (1998). Efecto de la concentración de Nitrato y Cloruro de Sodio sobre la densidad celular y contenido de pigmentos y proteínas de *Dunaliella viridis*. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Zulia - Venezuela. Vol 32, N° 1: 1-12.207-213.778. 88 pp.
150. Yoon, J., J. Shin, Park, T. (2007). Characterization of factors influencing the growth of *Anabaena variabilis* in a bubble column reactor. Biores. Technol.
151. Zaccaro, M. (2006). Bioactivity of *Scytonema hofmanni* (Cyanobacteria) in *Lilium alexandrae* in vitro propagation. Electron. J. Biotechnol., vol. 9, no. 3
152. Zapomělová, E., Hrouzek, P., Řeháková, K., Šabacká M., Stibal, M., Caisová, L., Komárková, J., Lukešová, A. (2008). Morphological variability in selected heterocystous cyanobacterial strains as a response to varied temperature, light intensity and medium composition. Folia Microbiológica, 53 (4): 333–341.