



**UNAP**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TESIS**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE  
CIANOBACTERIAS NATIVAS AISLADAS DE CUERPOS**

**DE AGUA DE LA REGIÓN LORETO**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**BIÓLOGO**

**PRESENTADO POR:**

**MIGUEL ANGEL GRANDEZ MAVILA**

**ASESORES:**

**Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ. Dr.**

**Blga. MARIANELA COBOS RUIZ. Dra.**

**IQUITOS, PERÚ**

**2021**

# ACTA DE SUSTENTACIÓN



# UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS N° 025-CGT-UNAP-2021

En la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto, mediante plataforma virtual, a los 09 días del mes de abril de 2021, a horas 16:06 se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: "IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE CIANOBACTERIAS NATIVAS AISLADA DE CUERPOS DE AGUA DE LA REGIÓN LORETO" presentado por el Bachiller MIGUEL ÁNGEL GRANDEZ MAVILA autorizada mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 071-2021-FCB-UNAP, para optar el Título Profesional de BIÓLOGO, que otorga la UNAP de acuerdo a Ley 30220, su Estatuto y el Reglamento de Grados y Títulos vigente.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 182-2020-FCB-UNAP de fecha 16 de octubre de 2020, está integrado por:

Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.	-	Presidente
Blgo. RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, MSc.	-	Miembro
Blga. ADRIANA DEL PILAR BURGA CABRERA, MSc.	-	Miembro



Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron respondidas: SATISFACTORIAMENTE

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la Tesis ha sido APROBADA con la calificación de BUENA, estando el Bachiller apto para obtener el Título Profesional de BIÓLOGO.

Siendo las 17:25 se dio por terminado el acto de sustentación.



Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.  
PRESIDENTE

Blgo. RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, MSc.  
MIEMBRO

Blga. ADRIANA DEL PILAR BURGA CABRERA, MSc.  
MIEMBRO

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.  
ASESOR

Blga. MARIANELA COBOS RUIZ, Dra.  
ASESORA

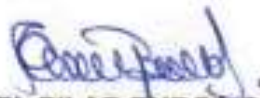
## JURADO



**Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.  
PRESIDENTE**



**Blgo. RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, MSc.  
MIEMBRO**



**Blga. ADRIANA DEL PILAR BURGA CABRERA, MSc  
MIEMBRO**

## ASESORES



---

**Blgo. Juan Carlos Castro Gómez. Dr**



---

**Blga. Marianela Cobos Ruiz. Dra.**

## **DEDICATORIA**

A mi familia por darme su apoyo incondicional e incentivar me siempre a seguir adelante con mis proyectos.

Al Blgo. Juan Carlos Castro Gómez y a la Blga. Marianela Cobos Ruiz por apoyarme en el comienzo de mi carrera profesional y darme ánimos a continuar en el mundo de la investigación.

A todas las personas que estén interesadas en realizar investigaciones en este campo que aún falta mucho por investigar.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre que estaba en cada paso en mi desarrollo personal y académico, por tener la paciencia y sabiduría para poder hacer de mí una persona de bien.

Al proyecto: “Adquisición de un secuenciador masivo NextSeq 550 como soporte para estudios genómicos y metagenómicos de la biodiversidad de la Amazonía Peruana” Universidad Científica del Perú (UCP) – FONDECYT, por ser el ente financiero para realizar el presente trabajo de investigación.

Al Blgo. Juan Carlos Castro Gómez y a la Blga. Marianela Cobos Ruiz por su apoyo incondicional en el transcurso del proyecto.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>PORTADA</b>	i
<b>ACTA DE SUSTENTACIÓN</b>	ii
<b>JURADO</b>	iii
<b>ASESORES</b>	iv
<b>DEDICATORIA</b>	v
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	vi
<b>INDICE DE CONTENIDOS</b>	vii
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	ix
<b>RESUMEN</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPITULO I: MARCO TEÓRICO</b>	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Bases teóricas	9
1.3. Definición de términos básicos	20
<b>CAPITULO II: HIPOTESIS Y VARIABLES</b>	23
2.1. Formulación de la hipótesis	23
2.2. Variables y definiciones operacionales	23
<b>CAPITULO III: METODOLOGÍA</b>	24
3.1. Tipo y diseño	24
3.2. Diseño muestral	24
3.3. Procedimiento de recolección de datos	25
3.3.1. Lugar de ejecución	25
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS</b>	34
4.1. Aislamiento y Cultivo de Cianobacterias Nativas	34
4.2. Evaluación de la axenicidad de los Cultivos de Cianobacterias	34

<b>4.3. Purificación de ADN Genómico e identificación molecular</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Caracterización bioquímica de las cianobacterias aisladas</b>	<b>37</b>
<b>CAPITULO V: DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>CAPITULO VI: CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>CAPITULO VII: RECOMENDACIONES</b>	<b>42</b>
<b>CAPITULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>54</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Lugar de ejecución de los procedimientos de laboratorio. Universidad Científica del Perú	26
<b>Figura 2.</b> Puntos de colecta de muestras de agua de los ríos Amazonas, Itaya y Ucayali.	27
<b>Figura 3.</b> Microfotografías que muestran las características de los dos géneros de cianobacterias aisladas (Anabaena sp. y Aphanocapsa sp.).	34
<b>Figura 4.</b> Análisis electroforético de los amplicones obtenidos después de amplificar las muestras de ADN genómico mediante la RCP empleando los cebadores ITS2F y ITS2R.	35
<b>Figura 5.</b> Análisis electroforético y espectrofotométrico del ADN genómico purificado de las dos géneros de cianobacterias aisladas y cultivadas (Anabaena sp. y Aphanocapsa sp.)	36
<b>Figura 6.</b> Análisis electroforético de los amplicones obtenidos después de amplificar las muestras de ADN genómico mediante la técnica RCP empleando los cebadores 337F y 926R de las dos géneros de cianobacterias aisladas y cultivadas (Anabaena sp. y Aphanocapsa	36
<b>Figura 7.</b> Contenido de Lípidos totales, carbohidratos, proteínas y cenizas de los dos géneros de cianobacterias aisladas (Anabaena sp. y Aphanocapsa sp.).	37

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Secuencia de fotografías de la Colecta de muestras de agua en los distintos puntos de muestreo	54
<b>Anexo 2.</b> Secuencia de fotografías del cultivo inicial de las muestras de agua	54
<b>Anexo 3.</b> Secuencia fotográfica de aislamiento, cultivo y cosecha de biomasa de cianobacterias	55
<b>Anexo 4.</b> Secuencia fotográfica de identificación molecular de las cianobacterias.	56
<b>Anexo 5.</b> Organización del Operón ARNr de cianobacterias y otros procariotas, estructura del gen ribosomal 16S y zonas de hibridación de los cebadores 337F y 926R	57
<b>Anexo 6.</b> Resultados del análisis estadístico mediante la prueba t de Student de los parámetros bioquímicos entre las dos especies de cianobacterias aisladas y cultivadas ( <i>Anabaena</i> sp. y <i>Aphanocapsa</i> sp.) en condiciones axénicas	57
<b>Anexo 7.</b> Resultados de la prueba estadística de Kolmogorov–Smirnov de una muestra para determinar la normalidad de los datos	58
<b>Anexo 8.</b> Composición del medio ASM-1	59
<b>Anexo 9.</b> Composición del medio Bold’s Basal Medium	59
<b>Anexo 10.</b> Composición del medio BG11	60
<b>Anexo 11.</b> Composición del Medio Cyanophycean	60
<b>Anexo 12.</b> Composición del medio Chu N°10	61

## RESUMEN

Las cianobacterias son procariotas fotosintéticos con distribución cosmopolita. Debido a los múltiples compuestos bioactivos que producen y las diversas aplicaciones potenciales que pueden tener, han llamado la atención de la comunidad científica. Sin embargo, aún existen vacíos en el conocimiento científico básico de las cianobacterias y por ende tienen limitado uso biotecnológico. Por tanto, para ampliar los conocimientos científicos de estos microorganismos, la presente investigación tuvo como objetivo general identificar molecularmente y realizar el análisis bioquímico de cianobacterias nativas aisladas de cuerpos de agua de la región Loreto. Las muestras de agua fueron colectadas de los ríos Amazonas, Itaya y Ucayali e inicialmente enriquecidas para estimular el crecimiento de cianobacterias. Posteriormente, estas fueron aisladas y cultivadas con métodos estándares. Luego, las cianobacterias aisladas fueron identificadas morfológica (por microscopía) y molecularmente (por amplificación de las regiones variables V3-V5 del gen ribosomal 16S) y caracterizadas a nivel bioquímico. Se logró el aislamiento, cultivo en condiciones axénicas e identificación molecular de dos géneros de cianobacterias (*Anabaena* sp. y *Aphanocapsa* sp.). Los análisis bioquímicos muestran diferencias estadísticas significativas entre ambos géneros en el contenido de lípidos totales, carbohidratos, proteínas y cenizas. En conclusión, se ha aislado y cultivado de manera exitosa las cianobacterias *Anabaena* sp. y *Aphanocapsa* sp., las mismas que fueron identificadas morfológica y molecularmente. Asimismo, se caracterizaron por mostrar diferencias estadísticas significativas en su composición bioquímica.

**Palabras clave:** Biodiversidad, biología molecular, cianobacteria, ecosistema amazónico

## ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes with a cosmopolitan distribution. Due to the multiple bioactive compounds they produce and the various potential applications they can have, they have caught the attention of the scientific community. However, there are still gaps in the basic scientific knowledge of cyanobacteria and therefore they have limited biotechnological use. Therefore, to broaden the scientific knowledge of these microorganisms, the general objective of the present investigation was to molecularly identify and carry out the biochemical analysis of native cyanobacteria isolated from bodies of water in the Loreto region. The water samples were collected from the Amazon, Itaya and Ucayali rivers and initially enriched to stimulate the growth of cyanobacteria. Later, these were isolated and cultured with standard methods. Then, the isolated cyanobacteria were identified morphologically (by microscopy) and molecularly (by amplification of the variable regions V3-V5 of the 16S ribosomal gene) and characterized at the biochemical level. Isolation, culture under axenic conditions and molecular identification of two genera of cyanobacteria (*Anabaena* sp. And *Aphanocapsa* sp.) Were achieved. Biochemical analyzes show statistically significant differences between both generes in the content of total lipids, carbohydrates, proteins and ash. In conclusion, the cyanobacteria *Anabaena* sp. Has been successfully isolated and cultured. and *Aphanocapsa* sp., the same ones that were identified morphologically and molecularly. Likewise, they were characterized by showing significant statistical differences in their biochemical composition.

**Keywords:** Biodiversity, molecular biology, cyanobacteria, Amazonian ecosystem

## INTRODUCCIÓN

Los cuerpos de agua dulce constituyen un recurso natural invaluable en diversos aspectos: económico, cultural, estético, científico y educacional; en la actualidad, estos ecosistemas están experimentando cambios en su biodiversidad, calidad y cantidad por diversas actividades humanas que ocasionan contaminación, destrucción y degradación de hábitats <sup>[1]</sup>.

La región nororiental del Perú, particularmente la región de Loreto, contiene una gran variedad de ambientes acuáticos de agua dulce (es decir, ríos, lagunas, etc.) que albergan una rica biodiversidad. Las investigaciones enfocadas en la identificación y caracterización de las microalgas y cianobacterias deben ser un esfuerzo continuo, debido a que solo unos pocos miles (~ 50,000) se conservan en colecciones de cultivos de microalgas en todo el mundo y de ellos, solo unos pocos cientos (<10%) han sido investigados por su composición bioquímica <sup>[2]</sup>. Asimismo, en nuestra región existen escasos estudios de aislamiento de cianobacterias <sup>[3]</sup>, y que sólo se han limitado a su identificación taxonómica y molecular de algunos grupos en especial de microalgas <sup>[2]</sup>. Por lo que, aún existen vacíos en el conocimiento para identificar molecularmente a las especies de cianobacterias que habitan en los diferentes ecosistemas amazónicos.

Consecuentemente, teniendo la certeza de la existencia de especies de cianobacterias identificadas molecularmente, se podrá ampliar el conocimiento de los posibles usos biotecnológicos que éstas presenten, como por ejemplo; la producción de potentes toxinas, capaces de originar efectos agudos y crónicos en el hombre, animales y vegetales, se estiman que más del 50% de estos crecimientos masivos son tóxicos <sup>[4]</sup>.

Por tanto, el objetivo general de esta investigación fue identificar molecularmente y realizar análisis bioquímicos de cianobacterias nativas aisladas de cuerpos de agua de la Región Loreto y los objetivos específicos fueron: 1) aislamiento de cianobacterias de los ríos Amazonas, Itaya y Ucayali; 2) identificación molecular de las cianobacterias aisladas; y 3) caracterización bioquímica de las cianobacterias aisladas.

## CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

Investigaciones actuales demostraron que las cianobacterias son el principal grupo de procariontas fotótrofos oxigenados [5,6]; este grupo son morfológicamente diversos que van desde organismos unicelulares hasta filamentosos [7]. El crecimiento de las cianobacterias es un fenómeno natural, pero cada vez es más frecuente y severo como resultado de la actividad antropogénica [7].

Las cianobacterias son capaces de producir metabolitos secundarios que pueden ser tóxicos, considerado biotoxinas [8,9]. La producción de estas endotoxinas es máxima cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, por ese motivo, se observa, una producción directamente proporcional al aumento de la biomasa [4].

Actualmente se sabe que algunas especies producen potentes toxinas, capaces de originar efectos agudos y crónicos en el hombre, en animales y vegetales [4,10].

Probablemente los problemas de salud humana estén relacionados con la exposición crónica a bajas concentraciones de microcistinas a través del consumo de aguas y alimentos contaminados [6].

Desde el punto de vista evolutivo, las cianobacterias y sus relaciones filogenéticas están regulada por procesos metabólicos y genéticos específicos; la taxonomía moderna proporciona métodos combinados para catalogar y comprender la biodiversidad de la Tierra [11]. La clasificación genotípica y fenotípica de cianobacterias se basa principalmente en los estudios de Stainer y colaboradores [7].

Según estudios morfológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* con otras dos cepas australianas SDC (AF067818) y SDS (AF067819), siendo puestas como un mismo

grupo pero como distintas especies; cuyas características morfológicas consistían en tricomas rectos y otra con tricomas en espiral; mientras que los estudios taxonómicos y filogenéticos de las cepas de cultivo de estos morfotipos sugirieron que todos los aislamientos de *C. raciborskii* de Australia pertenecían a la misma especie, que incluyen tanto las formas rectas como las formas espiraladas, aunque los análisis de secuencia STRR de 13 cepas australianas indicaron que los aislados australianos con tricomas enrollados agruparse, lo que sugiere cierta vinculación entre el enrollamiento del tricoma y el genotipo, aunque los análisis de la investigación de la secuencia STRR de cepas tailandesas y cepas japonesas mostraron claramente que las cepas con tricomas en espiral no agrupados y no se reconoce una distinción clara entre las formas en espiral y recta <sup>[12]</sup>.

Recientes investigaciones sobre *Nostoc* spp. sobre su ecofisiología, bioquímica, y morfología, no proponen cambios taxonómicos, según la morfología *Nostoc* se define como un grupo monofilético; aunque la evidencia molecular está haciendo cada vez más claro que *Nostoc* es un conjunto polifilético como actualmente morfológicamente circunscrito. Esto está respaldado por los estudios del gen 16S rRNA, así por los análisis que usan *nifD*, *nifH* y *rbcL* <sup>[13]</sup>

Otras investigaciones centradas enfocadas en la identificación de cianotoxinas por métodos moleculares determinaron que las cepas axénicas que producen microcistina tienen un parte de la región *mcyA-Cd*, mientras que las cepas que no producen microcistina no tienen esta región; de tal modo que se pueden diseñar cebadores específicamente para esta región que sólo presentan las cepas que producen microcistina <sup>[14]</sup>.



Se diseñaron herramientas moleculares para el aprovechamiento de las cianobacterias debido al gran potencial biotecnológico que esta tiene; como por ejemplo se desarrollaron proteínas fluorescentes que se usan ampliamente como proteínas informadoras para el estudio de la expresión o de la localización, en las cianobacterias se estudiaron los espectros de las tres proteínas fluorescente Cerulean, GFPmut3B y EYFP, expresados en células de la cianobacteria *Synechocystis*, se ha medido y comparado con los espectros de la célula de tipo salvaje sin expresar la proteína fluorescente <sup>[15]</sup>. Las longitudes de onda de excitación y emisión máximas del cerúleo expresadas en *Synechocystis* son ligeramente diferente de las longitudes de onda para la proteína pura; las longitudes de onda de excitación y emisión máxima de GFPmut3B expresadas en *Synechocystis* se ajusta bien al máximo expresado para la proteínas pura; y finalmente los picos de excitación y emisión de EYFP expresaos en *Synechocystis* son cercanos a los máximos expresado para la proteína pura, en conclusión a estos datos las proteínas fluorescentes pueden usar como proteínas informadoras en cianobacterias <sup>[15]</sup>.

Actualmente se está usando técnicas moleculares para la identificación de cianobacterias. Esto se debe a la alta credibilidad de estos métodos. Se hicieron estudios sobre identificación molecular de cianobacterias que producen cilindroesperminas en dos lagos polacos en Europa Central <sup>[16]</sup>. También se realizaron estudios para caracterizar genéticamente a *C. raciborskii* de distintos orígenes geográficos basado en el análisis de secuencia de nucleótidos *nifH* y *cpc-IGS* <sup>[10]</sup>.

En el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú, se han desarrollado una serie de investigaciones enfocados en el aislamiento de microalgas provenientes de las cuencas Nanay, Itaya y Amazonas. Reportando el

aislamiento de 15 especies, de las cuales *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Ankistrodesmus* sp., fueron aislados de las tres cuencas [3]. Asimismo, en una reciente publicación en el año 2017 del mismo equipo de investigaciones reportaron el aislamiento de 14 especies de microalgas de los ríos Amazonas, Nanay e Itaya [2]. Donde también se realizó la identificación molecular de distintas cepas de microalgas, estas fueron identificadas mediante la amplificación del ITS2 ADNr, en general, la identificación de cepas nativas de microalgas presentó una buena correspondencia entre las características morfológicas y el análisis filogenético basado en secuencias [2]. Gracias al análisis filogenético se pudo realizar un filograma de se dividía en tres grupos, cada uno de los grupos contenían distintos géneros de microalgas, el primer grupo consistió en microalgas del género *Acusdesmus*, *Scenedesmus*, *Tetradesmus* y *Desmodesmus* y seis cepas aisladas (ITA007, AMA004, ITA006, NAN003, ITA005 y NAN002); el segundo grupo estaba conformado por una microalga del género *Ankistrodesmus* y las cepas aisladas AMA001, ITA001, ITA002, NAN001 y AMA002; finalmente el tercer grupo se encontraba conformado por una microalga del género *Chlorella* y tres cepas aisladas (ITA004, AMA003 e ITA003) [2].

Se realizaron trabajos enfocados en la caracterización bioquímica de distintas microalgas. En uno de estos trabajos se realizó la caracterización bioquímica de *Chaetocerus muelleri*; dentro de los cuales se analizaron las proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos grasos [17]. En esta investigación las proteínas celulares en sistemas de cultivo discontinuo varían desde  $21,1 \pm 2 \text{ pg cél}^{-1}$ , hasta  $3,5 \pm 0.2 \text{ pg cél}^{-1}$ , mientras que para sistemas de cultivo semicontinuo la concentración de proteínas varía desde  $21 \pm 2 \text{ pg cél}^{-1}$  y  $23 \pm 2 \text{ pg cél}^{-1}$ ; los niveles de lípidos se incrementaron significativamente en sistemas de cultivo discontinuo, este variaba

desde  $8,5 \pm 0,9 \text{ pg cél}^{-1}$ , hasta  $12 \pm 3 \text{ pg cél}^{-1}$ , mientras los niveles de lípidos para sistemas semicontinuos fueron mayores con respecto al anterior mostrando concentraciones de  $18 \pm 4 \text{ pg cél}^{-1}$ ; los índices de carbohidratos oscilaban entre  $18 \pm 1 \text{ pg cél}^{-1}$  y  $4,2 \pm 0,2 \text{ pg cél}^{-1}$  para sistemas discontinuos y tenía baja concentración para sistemas semicontinuos con un índice de  $4,2 \pm 0,2 \text{ pg cél}^{-1}$ ; para la caracterización de los ácidos grasos se dividieron en dos grupos, el primer grupo que estaba conformado por los ácidos grasos insaturados y monoinsaturados, y el segundo grupo que se encontraba conformado por los ácidos grasos poliinsaturados, el contenido de los ácidos grasos en del primer grupo era superior en los cultivos semicontinuos, con un índice de 47.5% para los ácidos grasos saturados y 34.8% para los ácidos grasos insaturados; y el contenido total de los ácidos grasos poliinsaturados fue mayor en el sistema discontinuo con un índice de 31,4% [17].

Otra investigación de este tipo fue realizada en *Chlorella vulgaris*, para determinar la composición bioquímica de la biomasa de *Chlorella vulgaris* se hizo estudio de pérdida por desecación (7,18%), nitrógeno total (7,13%), proteína bruta (44,56%), proteína verdadera (32,25%), carbohidratos (16%), fibra cruda (8,20%), lípidos (0,29%), cenizas (8,90%) y ácidos nucleicos totales (5,69%), todos estos se mostraron como porcentaje (%) en relación a la biomasa [18].

Un grupo de investigadores del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú trabajaron caracterizando ciertos componentes de interés como es el caso de lípidos y ácidos grasos [19–25]. Una de estas investigaciones determinó el efecto del nitrógeno en la producción de lípidos totales, en medios sin nitrógeno *Ankistrodesmus* sp., *Ankistrodesmus nannosele*, *Scenedesmus* sp., *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella* sp., mostraron una producción de 26,4%,

31,6%, 24,3%, 14,6% y 20,4% respectivamente, y en medios con nitrógenos *Ankistrodesmus* sp., *Ankistrodesmus nannoselene*, *Scenedesmus* sp., *Scenedesmus quadrikauda*, *Chlorella* sp., mostraron una producción de 20,81%, 24,1%, 17,3%, 15,9% y 22,1% respectivamente [19]. Se evaluaron la producción de lípidos totales de *Ankistrodesmus* sp. y *Scenedesmus* sp. en los medios de cultivo BG-11, Bold Basal y Beijerinck; *Ankistrodesmus* sp. tuvo índices 19,5%, 12,4% y 3,5% respectivamente, mientras que *Scenedesmus* sp. tuvo 9,6%, 15,3% y 7,8% respectivamente [20]. El tiempo de exposición al CO<sub>2</sub>, tendrá impacto en la producción de lípidos totales, *Chlorella* sp. mostró un alto índice de lípidos cuando se expone a 6 minutos de CO<sub>2</sub>, con un índice de 47,6% de lípidos totales [22].

Se hizo una investigación para determinar el perfil de ácidos grasos en *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en 4 medios de cultivo, BG11, BBM, CHU-10 y Beijerinck [24], también se realizó una investigación para determinar el perfil de ácidos grasos pero con diferentes concentraciones de nitrato [25].

También, este mismo grupo de investigadores purificaron el ADN genómico y ARN total de tres especies de microalgas oleaginosas, el protocolo empleado para purificar el ADN genómico muestra que el ratio de calidad (A260/A280) y (A260/A230) fueron de alta calidad. Por lo que el protocolo de purificación de ADN genómico es altamente eficiente para aplicar a las cianobacterias [26].

Finalmente, el mismo equipo de investigación realizó un trabajo de investigación enfocada en la clonación molecular y caracterización de la ACETIL-CoA carboxilasa (ACCase) de *Ankistrodesmus* sp. en este trabajo se logró la caracterización de una secuencia del gen de la subunidad alfa carboxil transferasa de la enzima Acetil-CoA carboxilasa(CCCase) [27].

## 1.2. Bases teóricas

### a) Cianobacterias.

Las cianobacterias o cianofíceas son microorganismos procariontes, aeróbicos y fotoautótrofos [4-6], sin embargo, sus células son como el de las plantas, tienen aparato fotosintético que incluye clorofila a y ambos fotosistemas [7,11]. Se encuentran en diversos ambientes incluyendo océanos, ambientes dulciacuícolas, rocas y suelo [28]. Su crecimiento se ve favorecido por la eutrofización de los ecosistemas acuáticos [4,11].

#### - Evolución de las cianobacterias

La evolución de las cianobacterias es un proceso continuo, esto se basa en la transferencia horizontal de ácidos nucleicos entre las cepas de las cianobacterias y dentro de las poblaciones, combinada con una rápida aclimatación y adaptación; a este proceso se le llama “evolución estática” dentro de un rango de patrones genéticos, metabólicos y estructurales de cianobacterias [11]. El estrés repentino puede provocar la descomposición de numerosas funciones celulares; sin embargo, durante la aclimatación posterior los procesos se reajustan o se inducen nuevas proteínas para hacer frente a las condiciones, este proceso explica la diversificación y vitalidad a largo plazo de las cianobacterias, y el desarrollo continuo y rápido de nuevos morfotipos y ecotipos; en consecuencia a este proceso es la complejidad de la diversidad de las cianobacterias, en la que se producen numerosos genotipos y morfotipos ecológicamente especializados [11].

### b) Clasificación de cianobacterias.

#### - Enfoque botánico

Fue el primero en poner su sello en la taxonomía de las cianobacterias. En cuanto a otras algas, la taxonomía clásica de las cianobacterias se basa en características

morfológicas y su nomenclatura se rige por el Código Botánico. Esto significa que cada especie nueva debe describirse en latín y que su referencia es un espécimen de herbario. Para las especies simples filamentosas (Oscillatoriaceae) y heterocistas (Nostocaceae y Stigonemataceae), los puntos de partida para la publicación válida de los nombres son las monografías escritas por Gomont (1892) y Bornet y Flahaut (1886-1888), respectivamente. Desde el siglo pasado, se han descrito numerosas nuevas especies. Entre los taxonomistas botánicos, existe la sospecha de que se han descrito demasiadas especies a lo largo de los años; muchos se basan en una sola diferencia de caracteres, como la presencia o ausencia de vaina o pequeñas desviaciones en las dimensiones o formas celulares [29].

El problema de la variabilidad morfológica ha llevado a Drouet a revisar profundamente la taxonomía. Él redujo drásticamente el número de especies a 62, seleccionando ciertas características morfológicas que él creía invariable con el medio ambiente. Más tarde, las hibridaciones ADN-ADN mostraron que los taxones colocados por Drouet en la misma especie eran genotípicamente diferentes [29].

Investigaciones realizadas publicaron una revisión taxonómica nueva y profundamente reorganizada, estaba basada en la definición de géneros más pequeños y más coherentes, intentaron integrar todos los caracteres bioquímicos, ultraestructurales y moleculares disponibles con su considerable experiencia taxonómica [29].

#### - Enfoque bacteriológico

Las cianobacterias son bacterias, su taxonomía debe tratarse en consecuencia y su nomenclatura debe regirse por el Código Bacteriológico. Por ejemplo, la referencia para cada especie se convertiría en un cultivo puro en lugar de un espécimen de

herbario. La posibilidad de tener el mismo organismo descrito con dos nombres diferentes en los códigos Botánico y Bacteriológico habría creado caos. Las concesiones mutuas y las adaptaciones de los dos Códigos han garantizado que las especies descritas válidamente en uno de ellos hayan sido reconocidas en el otro [29].

La base de la taxonomía bacteriológica de las cianobacterias fue publicada por Rippka et al. (1979) [29,30] Este sistema taxonómico, que aún depende en gran medida de la morfología, permite la identificación de las cepas de la Colección de Cultivos Pasteur a nivel genérico [30].

Los párrafos anteriores muestran que la taxonomía de las cianobacterias está en constante evolución. Aunque es confuso y no deseable, la clasificación y la nomenclatura pueden variar porque reflejan el estado actual del conocimiento [29].

### **c) Identificación molecular**

La combinación de enfoques moleculares y morfológicos para la taxonomía de las cianobacterias modernas es, esencial. Para tal evaluación de la diversidad de cianobacterias se deben utilizar los siguientes enfoques: (i) análisis moleculares, principalmente los relacionados con las relaciones filogenéticas, la diversidad de genotipos, los procesos de diversificación y la especiación; (ii) diversidad morfológica incluyendo la variación en la naturaleza y en la cultura; (iii) límites ecológicos, ecofisiológicos y biogeográficos; (iv) estudios ultraestructurales; (v) caracteres bioquímicos e información sobre procesos metabólicos especiales (producción de metabolitos secundarios, procesos de adaptación, etc.); (vi) corregir la designación formal de taxones que respeten las reglas de nomenclatura bacteriológicas y / o botánicas [11].

- Extracción de ADN

La obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN), es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos [31].

Esto consiste en extraer y aislar el ADN que se encuentra dentro de las células; para la presente investigación se extraerá el ADN de las células de las cianobacterias, a partir del ADN que será extraído se podrá partir a realizar los análisis posteriores como la espectrofotometría, electroforesis y PCR.

- Espectrofotometría UV-visible

Es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. El fundamento se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible, las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna [32].

Ley de Lambert-Beer: Esta ley expresa la relación entre absorbancia de la luz monocromática y la concentración de un cromóforo en solución [32].

$$A = \log I/I_0 = \epsilon \cdot c \cdot l$$

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, es decir, a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas, también depende la distancia que recorre la luz por la solución, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra mayor moléculas encontrará. La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de  $c$  altos,  $\epsilon$  varía con la concentración, debido a los fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc. [32].

- Electroforesis en geles de agarosa



Los aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, etc. poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o como aniones <sup>[33]</sup>. La electroforesis en gel de agarosa es la forma más efectiva de separar fragmentos de ADN de diferentes tamaños, desde 100 pb hasta 25 kb <sup>[34]</sup>. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa <sup>[33]</sup>.

Estos geles se colocan en una cubeta de electroforesis, sumergidas en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de ADN sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa <sup>[33]</sup>, los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma, es importante la utilización de marcadores moleculares de tamaño conocido porque nos permitirá calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema, en el caso de los geles de agarosa se le añade Bromuro de etidio <sup>[33]</sup>.

Cuando se coloca un campo eléctrico, los fragmentos de ADN migraran al ánodo, esto se debe a que la columna vertebral de fosfato del ADN se encuentra cargada negativamente debido al tampón <sup>[34]</sup>.

La velocidad de migración de una molécula de ADN a través de un gel está determinado por los siguiente: i) el tamaño de la molécula; ii) concentración de agarosa; iii) conformación del ADN; iv) voltaje aplicado, v) presencia de bromuro de etidio; vi) tipo de agarosa y; vii) tampón de electroforesis <sup>[34]</sup>. Las moléculas de ADN se pueden visualizar bajo luz ultravioleta después todo el procedimiento.

- Reacción en cadena de polimerasa

Es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos [35].

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima u oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg<sup>+</sup>), una solución amortiguadora o buffer y agua, todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión [35]. Esto se realizará en un equipo llamado termociclador, que está diseñado para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarias no se modifiquen en cada uno de los ciclos [35].

**Desnaturalización:** Las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el paso siguiente [35].

**Hibridación:** En esta etapa los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima, ésta generalmente oscila entre los 50-60°C. Si el diseño del primer es correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente [35].

**Extensión:** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir de 5' a 3'. La temperatura

óptima para esta reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional [35].

#### **d) Importancia de la Biología Molecular en la identificación de microorganismos**

Los datos moleculares proporcionan un criterio básico para la clasificación taxonómica, sin embargo, es demasiado simplista suponer que sugerirá un sistema filogenético correcto sin la cuidadosa combinación de datos genéticos con diversidad morfológica y variación, caracteres ecológicos y ecofisiológicos e información ultraestructural [11].

El sentido del nombre es de expresar un estatus taxonómico particular, se refiere a una cierta posición genética y cierto conjunto de caracteres bioquímicos, morfológicos y de cualquier otro tipo, conectadas con esta entidad genética, por lo tanto, la clasificación de las cianobacterias debe revisarse y basarse en estudios moleculares [11].

Las evaluaciones moleculares y bioquímicas de cepas de cianobacterias indican congruencia en general de la variación genotípica y fenotípica, las secuencias de los ácidos nucleicos de cepas y poblaciones es sin duda la base para la clasificación moderna de las cianobacterias [30]. Los enfoques moleculares se consideran más predictivos, por lo tanto, los trabajos basados únicamente en caracteres moleculares pueden proporcionar información sobre los genotipos existentes y su distribución aproximada en diversos ecosistemas. Sin los enfoques morfológicos complementarios, los datos moleculares solos tienen una capacidad limitada para reconocer la importancia ecológica de los diferentes genotipos, la variabilidad

morfológica in situ, los procesos de adaptación en curso y el origen continuo de nuevos ecosistemas y morfotipos de cianobacterias [11].

### **e) Caracterización bioquímica en cianobacterias**

#### **- Composición lipídica**

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas lineales con un grupo metil (CH<sub>3</sub>) y un grupo carboxilo al final [36]. Existe un amplio espectro de ácidos grasos de diferentes longitudes de cadenas de carbonos. Estos ácidos grasos también pueden presentar dobles enlaces, si solo presentan un enlace dentro de la estructura, se denomina ácidos grasos monoinsaturados, si hay dos o más dobles enlaces poliinsaturados y si por el contrario la cadena no presenta dobles enlaces, son designados saturados [37].

Los ácidos grasos poliinsaturados, se clasifican en n-6( $\omega$ -6) y n-3 ( $\omega$ -3) según la posición del doble enlace con respecto al medio terminal de la molécula. El principal ácido graso n-6 es el ácido linoléico (18:2  $\omega$ -6), presente en los aceites vegetales de maíz, girasol y soya. El ácido  $\gamma$ -linolénico (18:3  $\omega$ -3) predomina en las plantas; y aquellos ácidos grasos n-3 de cadena más larga, como el eicosapentanoico (EPA, 20:5  $\omega$ -3) y el decosahexanoico (DHA, 22:6  $\omega$ -3) abundan en los pescados, mariscos y aceites marinos [38].

Los principales componentes de la fracción lipídica en las microalgas son los triglicéridos o triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glucolípidos (predominantes en membranas de los cloroplastos), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos), aunque pueden presentarse compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, entre otros [39,40]

## - Carbohidratos

El polisacárido extracelular (EPS) de origen microbiano con una funcionalidad novedosa, propiedades fisicoquímicas reproducibles, costo y oferta estables, se convirtió en una mejor alternativa a los polisacáridos de origen vegetal y de algas. Los microorganismos son más adecuados que las macroalgas o las plantas superiores, ya que exhiben una alta tasa de crecimiento y son más susceptibles a la manipulación de las condiciones para mejorar el crecimiento y / o la producción de EPS [41].

Los polisacáridos se caracterizan por una diversidad estructural extrema; como resultado, juegan papeles muy diversos en la naturaleza. Numerosos polisacáridos bacterianos están potencialmente disponibles, se sabe que están involucrados en la patogénesis, la simbiosis, la formación de biofilm, la protección contra la depredación fagocítica y la resistencia al estrés en microorganismos. Entre estos microbios, las cianobacterias se conocen desde hace tiempo como un potencial productor de EPS [41]. La presencia de proteínas, ácidos urónicos, ácido pirúvico y grupos O-metilo, O-acetilo y sulfato enfatiza la naturaleza compleja de las EPS cianobacterianas. Se han propuesto diversas aplicaciones de EPS de cianobacterias para diversas aplicaciones, como la mejora de la capacidad de retención de agua del suelo, la detoxificación de metales pesados y radionucleidos contaminados y la eliminación de materia sólida de los depósitos de agua [41]. A pesar de su distribución ubicua, existe una gran falta de conocimiento sobre los factores que regulan la síntesis de EPS y las propiedades físico-químicas de las EPS de cianobacterias.

## - Proteínas

Son las macromoléculas biológicas más abundantes y están presentes en todas las células, estas son los instrumentos moleculares mediante los cuales se expresa la

información genética <sup>[42]</sup>. Todas las proteínas están constituidas a partir del mismo ubicuo de 20 aminoácidos, unido de forma covalente en secuencias lineales características <sup>[42]</sup>.

La estructura de las proteínas están divididas en cuatro partes: i) estructura primaria, es la secuencia de los aminoácidos en una cadena polipeptídica; ii) estructura secundaria, es el plegado de segmentos de polipéptidos cortos y contiguos, hacia unidades ordenadas de manera geométrica; iii) estructura terciaria, es el montaje de unidades estructurales secundarias hacia unidades funcionales de mayor tamaño como el péptido maduro y los dominios que los componen; y por último iv) estructura cuaternaria, es el número y los tipos de unidades polipeptídicas de proteínas oligoméricas y su disposición espacial <sup>[43]</sup>.

#### - Ácidos Grasos

Son ácidos carboxílicos con cadenas de hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos, en algunos ácidos grasos esta cadena está completamente saturada y sin ramificar, otros contienen uno o más dobles enlaces, unos cuantos contienen anillos de tres carbonos, grupos hidroxilos o grupos metilos ramificados <sup>[42]</sup>.

Las propiedades físicas de los ácidos grasos y de los compuestos que los contienen vienen determinadas en gran parte por la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada, esta explica la poca solubilidad en agua, mientras más larga sea la cadena acílica grasa y menor el número de dobles enlaces, menor será la solubilidad en agua <sup>[42]</sup>. El grupo ácido carboxílico es polar, de ahí la ligera solubilidad en agua de los ácidos grasos de cadena corta <sup>[42]</sup>.

#### - Porcentaje de Humedad y contenido de Cenizas

El porcentaje de humedad que contienen las cianobacterias es mayor en contraste con las que se presenta en otro tipo de organismos y su variación se encuentra en función de las condiciones ambientales. En general el porcentaje de humedad en cianobacterias oscila entre el 80% y el 99%, estos porcentajes son comunes en cianobacterias de ambientes terrestres y tienen relación directa con la producción de algún tipo de exopolisacárido que funciona como reservorio de humedad que les permite sobrevivir en condiciones secas. En cuanto al contenido de cenizas se lo identifica como el material que más varía a lo largo del crecimiento cianobacteriano y dependientemente de la especie su valor oscila entre el 2% hasta aproximadamente el 50% [44].

### 1.3. Definición de términos básicos

**Absorbancia:** Es un concepto más relacionado con la muestra, puesto que nos indica la calidad de luz absorbida por la misma.

**Ácidos nucleicos:** Polinucleótidos que se encuentran en la naturaleza en los que los residuos nucleotídicos están unidos en una secuencia específica mediante enlaces fosfodiéster, ADN y ARN.

**ADN:** Polinucleótido con una secuencia específica de unidades de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente mediante enlaces 3',5'-fosfodiéster, actúa como portador de información genética

**Aerobio:** Organismo que vive en el aire y que requiere oxígeno como aceptador electrónico terminal en la respiración.

**Agarosa:** La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros Gellidium y Gracillaria.

**Aislamiento:** En este caso, nos referimos a aislamiento a la acción de separar a las células de las cianobacterias, para posteriormente ser cultivadas solas, para así poder tener una colonia pura sin ninguna otra célula diferente a la que se aísla.

**Aminoácidos:** Ácidos carboxílicos con un sustituyente  $\alpha$ -amino; son los elementos primarios que constituyen las proteínas.

**Caracterización:** Es la acción de describir a los organismos, esta caracterización puede ser una caracterización morfológica, molecular o bioquímica; en la caracterización morfológica se describen las la forma de la célula o de los órganos visibles, es decir, se describe todo lo visible de la célula; en la caracterización molecular se ve el genomas de la célula o también se puede caracterizar genes en



específicos que está expresando la célula; finalmente en la caracterización bioquímica se describe todos los componentes que produce la células, estos pueden ser lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas, polifenoles, etc.

**Cianobacterias:** son microorganismos procariontes, aeróbicos, cuentan con un mecanismo fotosintético, tienen la capacidad de fijar nitrógeno. Estas microalgas son capaces de producir metabolitos secundarios o toxinas perjudiciales para el ser humano, animales y plantas.

**Eutrofización:** Es el enriquecimiento en nutrientes de un ecosistema acuático, se refiere específicamente al aporte más o menos masivo de nutrientes inorgánicos N y P en un ecosistema acuático con la entrada de agua restringida

**Fenotipo:** Características observables de un organismo.

**Genotipo:** Constitución genética de un organismo a diferencias de sus características físicas o fenotipo.

**Identificación:** Para el presente trabajo, cuando hablamos de identificación nos referimos a conocer la especie de cianobacteria que es mediante técnicas moleculares.

**Morfotipo:** Grupo de organismos que no puede diferenciarse a ojo desnudo o con herramientas sencillas.

**Péptidos:** Dos o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos.

**Transmitancia:** Es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, y la cantidad de luz que incidió en ella

**Taq Polimerasa:** La polimerasa Taq es un tipo de ADN polimerasa termoestable, nombrada de esta forma debido a que es producida por la bacteria *Thermus aquaticus* (T-*aq*) y a partir de la cual fue aislada en el año 1968 por Thomas D. Brock. A menudo suele abreviarse como "Taq Pol" (o simplemente como "Taq"), y es frecuentemente utilizada en las técnicas de PCR, un método que se utiliza para amplificar secuencias cortas de ADN.

## CAPITULO II: HIPOTESIS Y VARIABLES

### 2.1. Formulación de la hipótesis

Las especies de cianobacterias aisladas e identificadas morfológica y molecularmente presentan diferencias significativas en su composición bioquímica.

### 2.2. Variables y definiciones operacionales

<b>Variable</b>	<b>Tipo</b>	<b>Indicador</b>	<b>Medios de verificación</b>
Especies de cianobacteria	Cualitativo	Morfología Amplificación del gen 16S	Resultados de la Reacción en Cadena de Polimerasa
Composición bioquímica	Cuantitativo	Lípidos Totales (% peso seco de la biomasa)	cuaderno de laboratorio, base de datos en Excel y registro fotográfico
		Carbohidratos (% peso seco de la biomasa)	
		Proteínas (% peso seco de la biomasa)	
		Cenizas (% peso seco de la biomasa)	

## **CAPITULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1. Tipo y diseño**

El presente trabajo fue una investigación de carácter cuantitativo, observacional-descriptivo, esto nos permitió aislar, identificar molecular y caracterizar bioquímicamente, de acuerdo a las mediciones de las variables planteadas y planificación de toma de datos es transversal-prospectivo.

El diseño de investigación fue de carácter descriptivo, en la que se describió morfológicamente antes de su identificación molecular, también se describieron las características bioquímicas de las microalgas encontradas.

En el presente trabajo de investigación se aisló, identificó molecularmente y determinó las concentraciones de los componentes bioquímicas de las cianobacterias que se encontraron en los puntos de muestreo establecido (Amazonas, Ucayali e Itaya), primero se colectaron las muestras con una red de arrastre fitoplanctónico, se cultivó en un medio enriquecido durante 2 semanas, se realizó una identificación preliminar que estuvo basada en características morfológicas de las cianobacterias, luego para tener una identificación más confiable se aplicaron métodos moleculares, que consistieron en la extracción del ADN posteriormente se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). Se realizó la caracterización bioquímica de las cepas aisladas para poder tener mayor información acerca de las cualidades que estas poseen.

### **3.2. Diseño muestral**

El área muestral para la colecta de agua estuvo constituido por tres ríos que son el Amazonas, Itaya y Ucayali. Los puntos de muestreo fueron seleccionados por conveniencia del presente trabajo de investigación, por lo tanto, no se tuvo en cuenta ningún criterio estadístico para seleccionar las zonas de muestreo.

Las muestras colectadas fueron tomadas de los cuerpos de agua pertenecientes a los ríos mencionadas anteriormente; se colectaron de dos puntos de los ríos con tres repeticiones por cada punto de colecta. Las muestras se colectaron de la superficie hasta los 20 cm debajo de la superficie.

La población estuvo constituida por todas las especies o géneros de cianobacterias colectadas de los diferentes ríos de la Región Loreto. El muestreo fue de carácter probabilístico. El criterio de selección será exclusivo, debido a que sólo se tomaron al grupo de las cianobacterias que se encuentren en los puntos de muestreo establecidos.

### **3.3. Procedimiento de recolección de datos**

#### **3.3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética (LByB) de la Universidad Científica del Perú - UCP (ver Figura 1), ubicado en la Av. Abelardo Quiñones Km 2.5 en el distrito de San Juan Bautista de la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas, departamento de Loreto-Perú y en las instalaciones de la Unidad Especializada de Biotecnología (UEB) del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía, de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), localizada en el distrito de San Juan Bautista de la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas, departamento de Loreto-Perú.

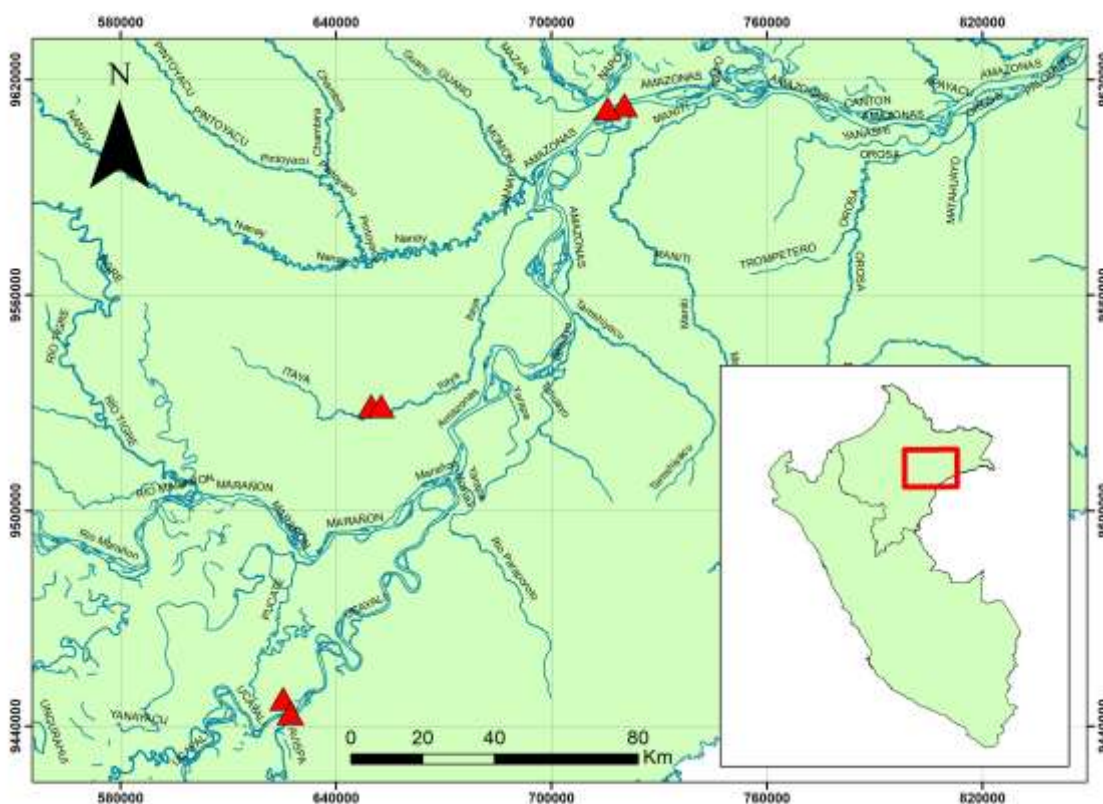


**Figura 1.** Lugar de ejecución de los procedimientos de laboratorio. Universidad Científica del Perú

### **3.3.2. Colecta de muestras biológicas y enriquecimiento inicial**

Las muestras biológicas se obtuvieron de tres ríos de la región Loreto (Amazonas, Itaya y Ucayali) se seleccionaron dos puntos de colecta las cuales se colectaron muestras en un total de tres veces (ver Figura 2). Se colectaron 500 mL de muestra en botellas de plástico previamente esterilizado con hipoclorito de sodio. La colecta de las muestras se realizó por medio de filtración con una red fitoplanctónica de 20  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro <sup>[45]</sup>. Se obtuvo un total de 500 mL de muestras de aguas superficiales, sólo se colectaron muestras de agua de los primeros 20 cm de profundidad. El transporte de la muestra a las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética se hicieron protegidos de la luz (ver en Anexo 1). Luego, 500  $\mu\text{L}$  de la muestra se transfirió a microtubos de 2 mL y se agregó 500  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo respectivo, este procedimiento se repitió con todos los medios de cultivos respectivamente ASM1, Bold Basal Medium (BBM)m BG11, CHU # 10 y Cyanophycean Medium (ver Anexo 8-12); con sus dos repeticiones (la primera

sin modificación a los medios de cultivos y la segunda con medios con ausencia de nitrógeno).



**Figura 2.** Puntos de colecta de muestras de agua de los ríos Amazonas, Itaya y Ucayali.

### 3.3.3. Aislamiento, cultivo y cosecha de las cianobacterias

Después del cultivo inicial, las cianobacterias fueron aisladas utilizando dos técnicas; Lavado celular y en placas con agar <sup>[46]</sup> (ver Anexo 2). Se colocó una alícuota de 10  $\mu$ L de la muestra en un portaobjetos de vidrio estéril, y con ayuda del microscopio de luz invertida se recogió sólo una célula con una micropipeta que contiene un filtro. Una vez colectada la célula o filamento se transfirió a una alícuota de medio de cultivo estéril de forma que la célula o filamento se vaya lavando, este proceso se repitió por entre 5 a 10 veces, dependiendo de la facilidad que estas tienen para separarse de otros microorganismos. Finalmente, la gota con una sola célula de microalgas se transfirió a un microtubo con 20  $\mu$ L de medio de cultivo,

seguido de la inoculación en placas Petri que contenía medio de cultivo suplementado con 1,5% de agar. Las colonias individuales que crecieron en la placa se inocularon en medio líquido y se cultivaron en las condiciones descritas posteriormente [2], todos estos procesos se realizaron por triplicado. A medida que la biomasa de los cultivos cianobacterianos aumentaron se transfirieron a matraces de Erlenmeyer y los cultivos cianobacterianos se mantuvieron en las siguientes condiciones de cultivo:  $25 \pm 1$  °C usando  $80 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$  con luz blanca fluorescente y agitación continua a 100 rpm por varias semanas hasta observar cambios en la coloración del cultivo [2].

Las cianobacterias se cosecharon por centrifugación, se colocó 50 mL del cultivo en tubos para centrifuga (Corning®) y se procedió a centrifugar a 4500 rpm a 10°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se resuspendió con 30 mL de suero fisiológico.

#### **3.3.4. Identificación molecular de las cianobacterias aisladas**

Primero se purificó el ADN genómico de acuerdo al protocolo descrito y modificado de Castro et al. [2] (ver en Anexos Foto 4), que implica el empleo del detergente iónico Bromuro de hexadeciltrimetilamonio junto con enzimas (proteasas y ribonucleasas) y extracción con solventes orgánicos para eliminar los contaminantes.

La biomasa fresca fue triturada en un mortero y pilón con 500  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción CTAB pH. 8.5 (300 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM de EDTA; 2 M de NaCl; 2% (p/v) de CTAB y 2% (p/v) de PVP) hasta completar 1 mL, con 10  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K (20 mg/mL), ~100 mg de arena estéril y 2% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol. El tampón de extracción fue previamente atemperado a 65°C. Luego el homogenizado fue transferido a tubos de 2 mL (~ 1mL por cada tubo). Se añadió



150  $\mu$ L de SDS y homogenizó. Seguidamente, se incubó a 65°C por 60 min con homogenización lenta por inversión cada 15 min. Luego, se agregó 1 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) frío e incubó en hielo por ~15 min. Seguidamente, fue centrifugado a 18000 x g por 15 min. Al sobrenadante (~1 mL), lo transferimos a tubos nuevos de 2 mL y se agregó 250  $\mu$ L de acetato de potasio 5M y 100  $\mu$ L de etanol absoluto refrigerado; homogenizar por inversión y añadir 800  $\mu$ L cloroformo-alcohol isoamílico. Seguidamente, se centrifugó a 18000 x g por 10 min. Luego, se extrajo 750  $\mu$ L de sobrenadante y añadió 630  $\mu$ L de isopropanol y 100  $\mu$ L de Acetato de Potasio 3M.

Dejar incubar por 18 a 20 horas, luego centrifugar a 18000 g por 25 min. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió con 500  $\mu$ L de etanol al 70%, incubar por 15 min y luego centrifugar a 18 000 g por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y lavó con 300  $\mu$ L de etanol absoluto y centrifugó a 18000 g por 5 min. Se descartó el etanol y evaporara los residuos de etanol en baño seco a 50°C por 5 min. Luego se resuspendió con 35  $\mu$ L del buffer TE y almacenó a -20°C.

La calidad y cantidad del ADN genómico fue determinado mediante varias aproximaciones metodológicas, Primero, por espectrofotometría para determinar la cantidad (ng/mL, A260nm) y la calidad del ADN genómico purificado (ratios de calidad A260nm/A280nm y A260nm/A230nm), empleando un espectrofotómetro NanoDrop 2000. El segundo método, fue mediante análisis electroforético en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad (calidad) del ADN genómico purificado [45].

Para identificar molecularmente si las cepas aisladas pertenecen al grupo de las cianobacterias, el ADN genómico purificado se amplificó siguiendo el protocolo de Klindworth et al. [47] usando cebadores que hibridan en sitios flanqueantes de las

regiones variables V3 y V5 (ver Figura 2 en anexo) del gen ribosomal 16S (337F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3', 926R: 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3'). Para este ensayo se empleó como control positivo de amplificación el ADN genómico de la cianobacteria *Arthrospira platensis*, que previamente se purificó con el protocolo mencionado. Los productos de amplificación obtenidos (amplicones) fueron separados en gel de agarosa al 2% y visualizados con un transiluminador de luz UV y registrados fotográficamente. Para constatar los resultados obtenidos inicialmente, los ensayos se volvieron a realizar en un total de 3 veces.

### **3.3.5. Prueba de la axenicidad de los cultivos**

Para demostrar que los cultivos de ambos géneros de cianobacterias eran axénicos (ausencia de contaminación con microalgas) se procedió a amplificar el ADN genómico purificado siguiendo el protocolo de Cobos et al. [2] en un total de 3 veces para demostrar que los resultados obtenidos son fiables, usando cebadores que hibridan en sitios flanqueantes de la región ITS2 (ITS2F: 5'-GAGCATGTCTGCCTCAGC-3', ITS2R: 5'-GGTAGCCTTGCCTGAGC-3') y permiten amplificar una región de ~300 pb (ver Figura 2 en anexo) siempre que exista ADN genómico de microalgas, (p.ej., clorofitas), protozoos y/o de hongos. Se empleó como controles positivos de amplificación el ADN genómico purificado de las microalgas *Ankistrodesmus falcatus* y *Chlamydomonas reinhardtii*. Los amplicones obtenidos fueron resueltos en gel de agarosa al 2% y visualizados en un transiluminador de luz UV y registrados fotográficamente

### **3.3.6. Caracterización bioquímica de Cianobacterias**

Se determinó el contenido de lípidos, carbohidratos, proteínas y cenizas. La extracción de lípidos totales se realizó según Yu *et al.* [48], la determinación de proteínas se realizó por triplicado de acuerdo al protocolo descrito por Hartree *et*

*al.*<sup>[49]</sup> y para la cuantificación de carbohidratos se aplicó el método de Dubois *et al.*<sup>[50]</sup> previa hidrólisis ácida con HCl 2N.

a) Lípidos totales

Consistió en transferir la biomasa seca a morteros para su trituración con 8 mL de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1). El extracto obtenido se transfirió a microtubos de 2 mL y se añadió 100 µL de NaCl 0,9% por cada 1000 µL de extracto. La solución se homogenizó en vortex por 30 s y se centrifugó a 23000 g a 4°C por 5 min. La fase clorofórmica se filtró con filtros para jeringa de 0,45 µm y se transfirieron a vasos de precipitado de peso conocido. Los restos celulares y otros componentes fueron retenidos en la fase intermedia (entre fases acuosa y clorofórmica) y fueron tratados varias veces con la solución extractora de lípidos (cloroformo:metanol) después de su homogenización en el vortex y centrifugación. Todos los extractos con solventes orgánicos fueron filtrados y transferidos al mismo vaso de precipitado. Los solventes orgánicos se evaporaron del vaso de precipitado en un hotplate a 50°C por 4 horas. Luego los componentes lipídicos retenidos en el vaso de precipitado fueron secados a 50°C por 4 horas. Finalmente, el vaso de precipitado se atemperó a 25°C y determinar su peso. Por diferencia de peso del vaso de precipitado con y sin los lípidos se determinó la cantidad de lípidos totales obtenidos. Con la siguiente ecuación propuesta por Yu *et al.*<sup>[48]</sup>:

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = \frac{P_L}{P_M} \times 100\%$$

Donde PL es el peso seco de los lípidos totales y PM es el peso seco de las microalgas.

b) Proteínas

Solución A. 2 g de tartrato de potasio y sodio y 100 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> son disueltos en 500 ml de NaOH 1 N y diluido con agua hasta 1 litro.

Solución B: 2 g de tartrato de potasio y sodio y 1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se disuelven en 90 ml de agua y se agregan 10 ml de NaOH 1N.

Solución C. 1 volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu se diluyó con 15 volúmenes de agua. Esta solución debe estar entre 0,15 N y 0,18 N cuando se tituló a pH 10 con NaOH 1 +N. Si la acidez supera los 0,18 N Debe ajustarse con NaOH.

Los ensayos se realizaron en tubos de ensayo de 13 mm de diámetro. Las muestras de proteína se diluyeron a 1 ml con agua y se tratan con 0,9 ml de la solución A. Se preparó un blanco y un patrón de la misma forma. Los tubos se colocaron en un baño de agua María a 50°C durante 10 min, se enfrían a temperatura ambiente (21-25°C) y se tratan con 0,1 ml de la solución B. Las soluciones se dejan a temperatura ambiente durante al menos 10 min, luego se añadió 3 ml de la solución C, se homogenizó rápidamente para asegurar la mezcla por 1 seg. Los tubos se calentaron nuevamente a 50°C durante 10 min y se enfrían a temperatura ambiente. Las absorbancias se leyeron en cubetas de 1 cm a 650 nm.

#### c) Carbohidratos totales

Para la cuantificación de los carbohidratos totales primero se hizo la hidrólisis total de la biomasa siguiendo el protocolo de Hoebler <sup>[51]</sup>. en un tubo de ensayo se colocó 0.5 g de biomasa seca, se añadieron 5 mL de ácido sulfúrico al 72%. Luego se colocó en baño María a 30°C durante 1 h. el contenido del tubo se transfirió luego a un matraz de 250 mL y se añadió 139 mL de agua destilada. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Posteriormente se realizó la determinación por colorimetría del contenido de azúcares totales siguiendo el protocolo de Dubois <sup>[50]</sup>. Se determinó por el método del reactivo fenol sulfúrico, se preparó una solución del fenol al 5% (p/v), a 1 mL de muestra adecuadamente diluida se añadió un volumen igual de solución de fenol y

5 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se homogenizó luego en un agitador vórtex. La reacción se dio a los 10 minutos y finalmente se colocó en un baño de agua fría durante 15 minutos. La densidad óptica de cada mezcla se leyó en un espectrofotómetro a 490 nm.

### **3.3.7. Análisis estadísticos**

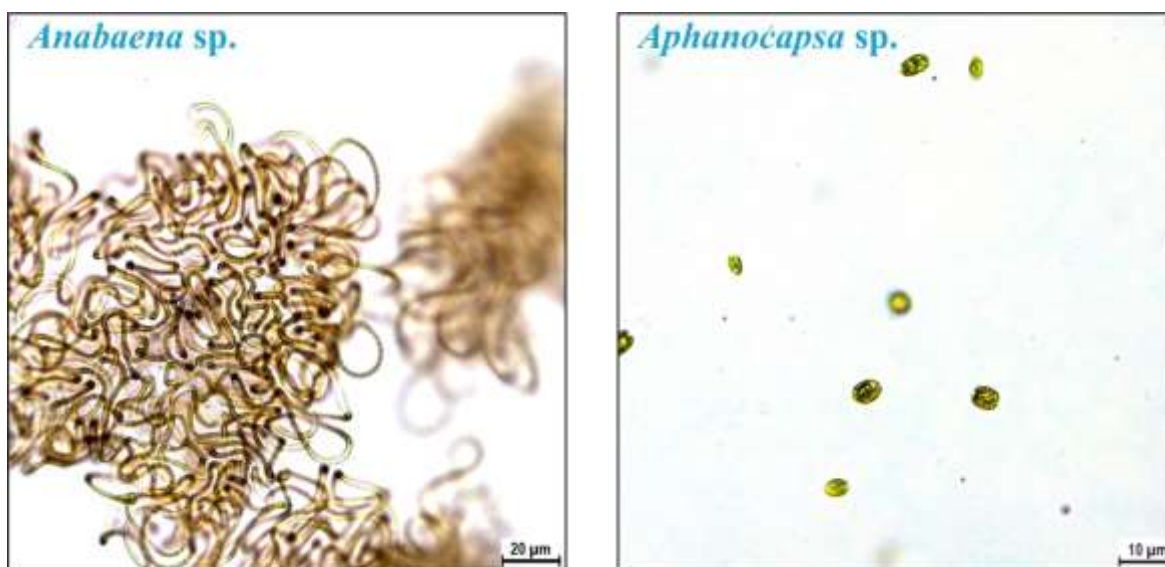
Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa libre R (versión 3.4.4. The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). La normalidad de los datos bioquímicos se determinó empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar si existen diferencias estadísticamente significativas en la composición bioquímica de ambos géneros de cianobacterias se empleó la prueba t de Student. Se consideraron que existen diferencias estadísticas significativas con valores  $P < 0,05$ .

## CAPITULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Aislamiento y Cultivo de Cianobacterias Nativas

Se aislaron y cultivaron dos géneros de cianobacterias; *Anabaena* sp. y *Aphanocapsa* sp. Ésta última fue colectada en muestras de agua provenientes del río Itaya, mientras que *Anabaena* sp. fue colectada en el río Amazonas. De tal manera, no se logró aislar ni cultivar ninguna cianobacteria proveniente del río Ucayali.

En la Figura 3 se muestra los dos géneros de cianobacterias *Anabaena* sp. y *Aphanocapsa* sp. aisladas y cultivadas en condiciones de laboratorio. El aislamiento se logró con la aplicación de dos métodos: por lavado celular y siembra en placa con agar que garantizó la obtención de cultivos unialgales.

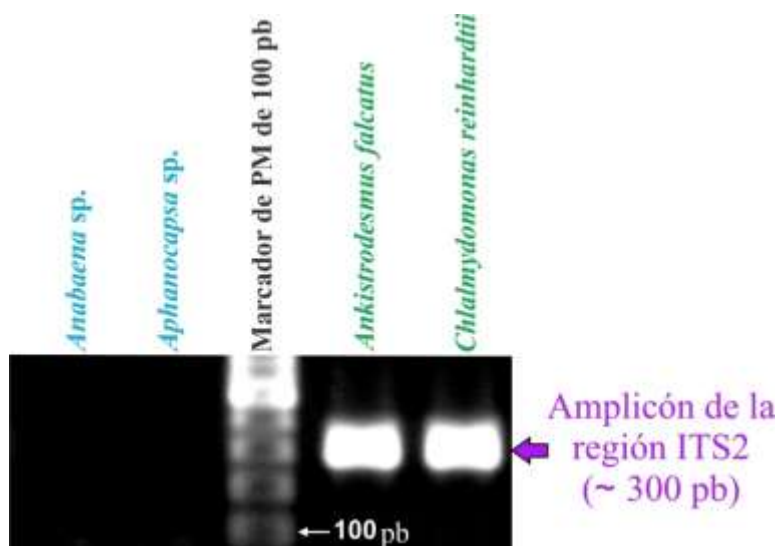


**Figura 3.** Microfotografías que muestran las características de los dos géneros de cianobacterias aisladas (*Anabaena* sp. y *Aphanocapsa* sp.).

### 4.2. Evaluación de la axenicidad de los Cultivos de Cianobacterias

La axenicidad de los cultivos de ambos géneros de cianobacterias se corroboró mediante la técnica de la RCP (Figura 4) empleando cebadores específicos para la región ITS2, propia de microorganismos eucariotas que podrían contaminar los

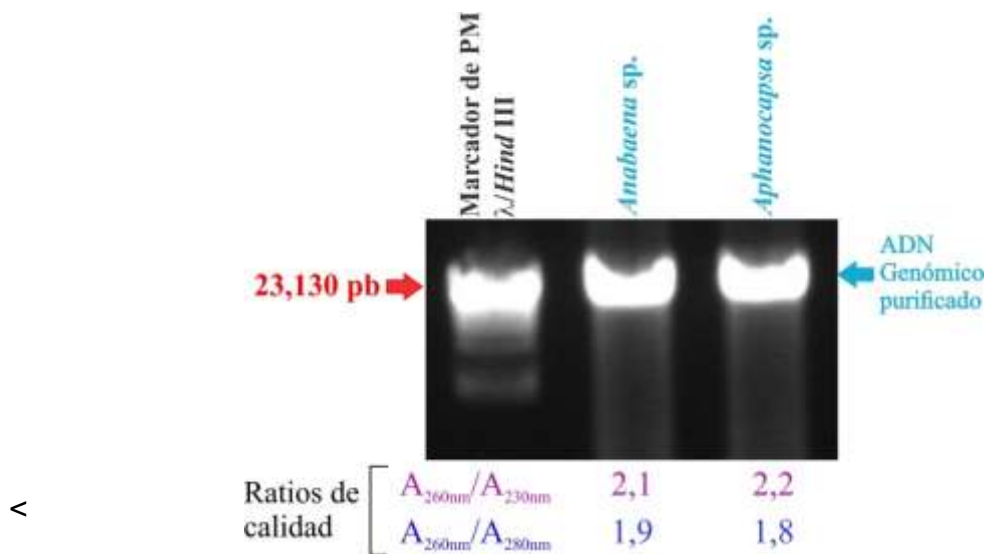
cultivos (p.ej., microalgas, hongos, u otros microorganismos eucariotas). Los resultados muestran que ambos cultivos son axénicos, toda vez que no mostraron amplicones correspondientes a la región ITS2, que sí se observa en los controles positivos, constituidos por ADN genómico de dos especies de microalgas (*Ankistrodesmus falcatus* y *Chlamydomonas reinhardtii*).



**Figura 4.** Análisis electroforético de los amplicones obtenidos después de amplificar las muestras de ADN genómico mediante la RCP empleando los cebadores ITS2F y ITS2R.

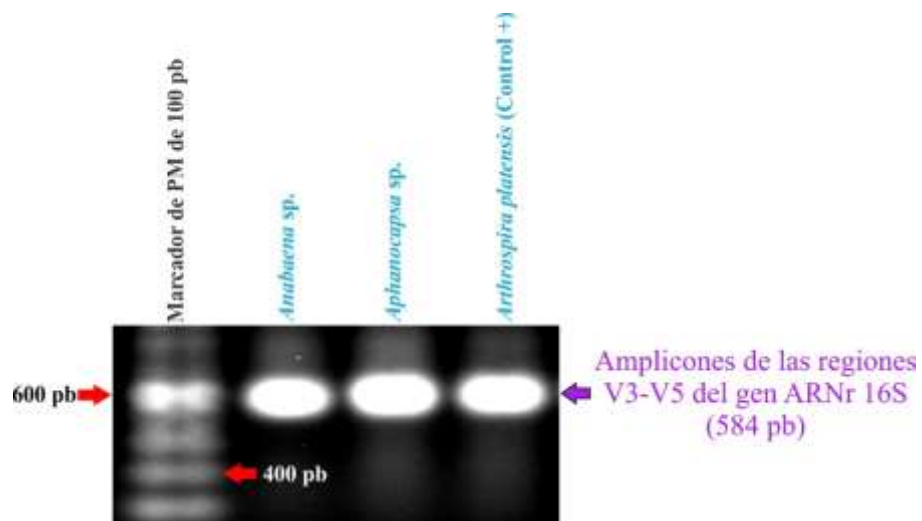
#### 4.3. Purificación de ADN Genómico e identificación molecular

Con el protocolo estandarizado se ha podido purificar el ADN genómico de los dos géneros de cianobacterias (Figura 5). Las muestras de ADN genómico obtenidas se caracterizaron por su elevada calidad con ratios  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  de 2,1 a 2,2 y de  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  de 1,8 a 1,9. Estos análisis espectrofotométricos nos indican que el ADN obtenido no presenta contaminantes comunes como las proteínas, compuestos fenólicos y/o polisacáridos, respectivamente (Figura 5). Adicionalmente, el análisis electroforético nos muestra que el ADN genómico no presenta degradación (ADN íntegro) ni contaminación con polisacáridos, toda vez que no se evidenció retención del ADN genómico en los pocillos.



**Figura 5.** Análisis electroforético y espectrofotométrico del ADN genómico purificado de los dos géneros de cianobacterias aisladas y cultivadas (*Anabaena* sp. y *Aphanocapsa* sp.)

Asimismo, en base a las características morfológicas y la amplificación exitosa mediante la técnica de RCP (Figura 6) de un segmento que incluye las regiones variables V3 al V5 del ARNr 16S de ambas muestras de ADN genómico de los géneros aisladas corresponden al grupo de las cianobacterias.

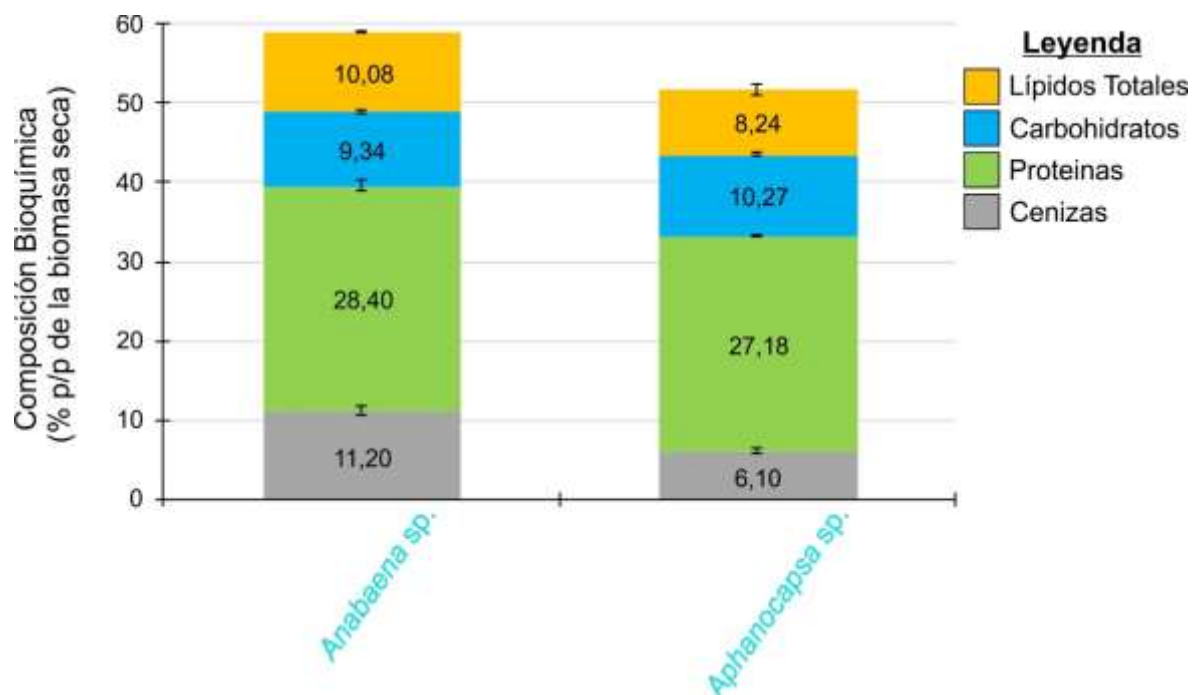


**Figura 6.** Análisis electroforético de los amplicones obtenidos después de amplificar las muestras de ADN genómico mediante la técnica RCP empleando los cebadores 337F y 926R de las dos géneros de cianobacterias aisladas y cultivadas (*Anabaena* sp. y *Aphanocapsa* sp.)



#### 4.4. Caracterización bioquímica de las cianobacterias aisladas

Los análisis bioquímicos muestran que existen diferencias estadísticamente significativas (valores t de Student de 4 a -13,25,  $P < 0,05$ , ver Tabla 1 en anexo) en la composición de ambos géneros de cianobacterias, tanto a nivel de lípidos totales, carbohidratos, proteínas y cenizas (Figura 7).



**Figura 7.** Contenido de Lípidos totales, carbohidratos, proteínas y cenizas de los dos géneros de cianobacterias aisladas (*Anabaena sp.* y *Aphanocapsa sp.*).

## CAPITULO V: DISCUSIÓN

### 5.1. Aislamiento y Cultivo de Cianobacterias Nativas

En el presente trabajo de investigación se logró aislar y cultivar en condiciones de laboratorio dos géneros nativos de cianobacterias de la Amazonia peruana (Figura 3). El éxito en este proceso lo podemos atribuir a los métodos de aislamiento de cianobacterias implementados en base a los protocolos descritos previamente por Rippka, Allen y Castenholz <sup>[52-54]</sup>. Con estas aproximaciones metodológicas ha sido posible aislar ambos tipos de cianobacterias unicelular y filamentosa, tal como ha sido reportado previamente <sup>[55-57]</sup>. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación corrobora que los métodos de aislamiento publicados son efectivos para el aislamiento de cianobacterias nativas de la Amazonía peruana. Una contribución importante de nuestro trabajo es el aislamiento de la cianobacteria *Aphanocapsa* sp., toda vez que estudios realizados en nuestro país no reportan a este género y mucho menos su aislamiento y cultivo. Sin embargo, Cobos et al. <sup>[58]</sup> reportan la existencia de la cianobacteria *Anabaena* sp. en la cuenca del río Itaya, pero este microorganismos no había sido aislado aún.

Interesantemente, con las aproximaciones metodológicas empleadas se lograron obtener cultivos unialgales de ambos géneros de cianobacterias y fueron axénicos, es decir libre de contaminación con microorganismos eucariotas (p.ej., microalgas, protozoos, hongos, etc.). Para lograr esta condición, no fue necesario el uso de antibióticos o inhibidores del crecimiento de microorganismos eucariotas (p.ej., cicloheximida, imipenem, etc.) empleados por otros investigadores <sup>[59,60]</sup>. Consecuentemente, los géneros aisladas son apropiadas para los estudios bioquímicos realizados y servirán como material biológico para futuros estudios ómicos (p.ej., genómico, transcriptómico, proteómico, metabolómico, lipidómica,

alimentómica, etc.) tal como ha sido reportado para otras cianobacterias alrededor del mundo [61–64].

## **5.2. Purificación de ADN genómico e identificación molecular**

En base a las características morfológicas evidenciadas en las observaciones microscópicas se pudo reconocer que los géneros aislados corresponden con las cianobacterias (Figura 3). Sin embargo, para corroborar estas observaciones se emplearon herramientas moleculares, primero para purificar el ADN genómico de ambos géneros y luego amplificar una región específica (regiones variables V3 y V5) del gen 16 S presente en las cianobacterias y otros microorganismos procariotas. El ADN purificado se caracterizó por su alta calidad y cantidad apropiadas para los análisis moleculares (Figura 3). De acuerdo a Sambrook [65] los ratios de calidad obtenidos sugieren ausencia de contaminantes que son comunes en las muestras de ADN genómico, tales como proteínas, polisacáridos y otros metabolitos. Adicionalmente, la amplificación exitosa de las regiones V3 y V5 del gen ribosomal 16S nos indica claramente que los géneros aislados son cianobacterias, toda vez que el operón del ARNr y en particular el gen ribosomal 16S (ver Anexo 6) está presente en las cianobacterias y otros procariotas tal como lo indican otros autores [66,67]. Consecuentemente, la amplificación y por ende la identificación de esta región es empleada frecuentemente para identificar estos microorganismos [7,68]. Sin embargo, para una identificación taxonómica a nivel de especie será necesario, en una siguiente etapa de nuestra investigación, secuenciar estas regiones amplificadas.

## **5.3. Caracterización bioquímica de las cianobacterias aisladas**

En la caracterización bioquímica se pudo evidenciar que las dos especies de cianobacterias presentaron diferencias estadísticamente significativas en el

contenido de lípidos totales, carbohidratos, proteínas y cenizas (Figura 5, Tabla A1 en anexo). Estos resultados están respaldados por otras investigaciones a nivel bioquímico de otras especies de cianobacterias como *Anabaena* spp., *Arthrospira* spp., *Oscillatoria* spp., *Synechocystis* spp, etc. [69-71]. Cabe resaltar, que ambas especies aisladas sobresalieron por el alto contenido de proteínas, en comparación con otros componentes bioquímicos analizados. Probablemente, una importante fracción de estas proteínas cianobacterianas están constituidas por las ficocianinas, proteínas comúnmente presentes en estos microorganismos [72-74] y que cumplen roles fundamentales en la fotosíntesis y la eliminación de radicales libres por su potente actividad antioxidante [74-77]. En las siguientes etapas de análisis bioquímicos y moleculares de estas especies de cianobacterias aisladas se deberá identificar estas proteínas y otros compuestos bioactivos con potencial nutracéutico y biotecnológico aplicables en los distintos campos tales como, farmacéutica, nutracéutica, acuicultura, agronomía, biorremediación, etc.

## **CAPITULO VI: CONCLUSIONES**

1. Se ha logrado aislar con éxito y cultivar en condiciones de laboratorio dos géneros de cianobacterias provenientes de los ríos Amazonas e Itaya; no se pudo aislar ninguna cianobacteria proveniente del río Ucayali.
2. Se ha identificado molecularmente a los dos géneros de cianobacterias aisladas a través de la amplificación exitosa de las regiones V3 y V5 del gen ribosomal 16S que nos indica claramente que los géneros aislados son cianobacterias.
3. Los géneros de cianobacterias aisladas presentaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de lípidos totales, carbohidratos, proteínas y cenizas.

## **CAPITULO VII: RECOMENDACIONES**

1. Continuar con el aislamiento, cultivo y caracterización bioquímica y molecular de nuevas de cianobacterias.
2. Realizar análisis ómicos (genómico, transcriptómico, proteómico, metabolómico, etc.) de las cianobacterias aisladas.
3. Crear un banco de cianobacterias aisladas de las diferentes cuencas de la Amazonía peruana.

## CAPITULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Ortega H, Chocano L, Palma C, Samanez I. Biota acuática en la Amazonía Peruana: diversidad y usos como indicadores ambientales en el Bajo Urubamba (Cusco - Ucayali). Rev Peru Biol [Internet] 2011 [citado 2018 ago 29];17(1). Available from: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/47>
2. Cobos M, Paredes J, Maddox J, Vargas-Arana G, Flores L, Aguilar C, et al. Isolation and Characterization of Native Microalgae from the Peruvian Amazon with Potential for Biodiesel Production. *Energies* 2017;10(2):224.
3. Diaz Calampa LV, Urcia Saboya MA. Aislamiento e Identificación de Microalgas Oleaginosas en las Cuencas de los Rios Amazonas, Itaya y Nanay-2013. 2014;
4. Roset J, Aguayo S, Muñoz M. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev Toxicol* 2001;18:65-71.
5. Benning LG, Phoenix VR, Yee N, Tobin MJ. Molecular characterization of cyanobacterial silicification using synchrotron infrared micro-spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 2004;68(4):729-41.
6. Campos A, Vasconcelos V. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *Int J Mol Sci* 2010;11:268-87.
7. Lyra C, Suomalainen S, Gugger M, Vezie C, Sundman P, Paulin L, et al. Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001;51:513-26.

8. Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 1992;72:445-59.
9. Rouhiainen L, Sivonen K, Börner T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol* 2003;180:402-10.
10. Dyble J, Paerl HW, Neilan BA. Genetic Characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Isolates from Diverse Geographic Origins Based on *nifH* and *cpcBA*-IGS Nucleotide Sequence Analysis. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 2002;68(5):2567-71.
11. Komárek J. Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *Algae* 2006;4(21):349-75.
12. Chonudomkul D, Yongmanitchai W, Theeragool G, Kawachi M, Kasai F, Kaya K, et al. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology* 2004;48:345-55.
13. Řeháková K, Jhohansen JR, Casamatta DA, Xuesong L, Vicent J. Morphological and molecular characterization of selected desert soil cyanobacteria: three species new to science including *Mojavia pulchra* gen. et sp. nov. *Phycologia* 2007;46(5):481-502.
14. Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, Börner T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol* 2003;180:402-10.



15. Huang H-H, Camsund D, Lindblad P, Heidorn T. Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Research* 2010;38(8):2577-93.
16. Mankiewicz-Boczek J, Kokociński M, Gagała I, Pawełczyk J, Jurczak T, Dziade J. Preliminary molecular identification of cylindrospermopsin-producing Cyanobacteria in two Polish lakes (Central Europe). *FEMS Microbiol Lett* 2012;326:173-9.
17. Lemus N. Growth and biochemical profile of *Chaetoceros muelleri* cultured in batch and semicontinuous systems. *Cienc Mar* 2006;32(3):597-603.
18. Quevedo HJM, Cabrales MMQ, Arceo AA, Nazario H. COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD PROTÉICA DE LA BIOMASA AUTOTRÓFICA DE *CHLORELLA VULGARIS*. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1999;13(2):6.
19. Paredes Rodríguez JD. Impacto de la eliminación de nitrógeno en la acumulación de lípidos totales en cinco especies de microalgas oleaginosas. 2014;
20. Barcia Ferreira SM. Efecto de tres medios de cultivos en la producción de biomasa y contenido de lípidos totales en microalgas amazónicas (*Scenedesmus* sp. y *Ankistrodesmus* sp.). 2014;
21. Vasquez García OE. Efecto de la intensidad luminosa en la producción de biomasa microalgal y acumulación de lípidos totales en cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas. 2015;

22. Casuso Wong MZ. Efecto de diferentes tiempos de exposición de CO<sub>2</sub> en la producción de biomasa y acumulación de lípidos totales en cuatro especies de microalgas amazónicas. 2015;
23. Perez Gallardo SL. Evaluación de la remoción de contaminantes en lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas. 2015;
24. Lopez Sulla LK. Efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas. 2015;
25. Amasifuen del Águila KA. Perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. sometidas a diferentes concentraciones de nitrato. 2017;
26. Guerrero Tenazoa ML, Tello Orbe AJ. Purificación de ADN genómico y ARN total de tres especies de microalgas oleaginosas *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. 2016;
27. Rodriguez Mashacuri HN. Clonación molecular y caracterización de la Acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) de *Ankistrodesmus* sp. una enzima clave para la biosíntesis de ácidos grasos. 2017;
28. Quiblier C, Wood S, Echenique-Subiabre I, Heath M, Villeneuve A, Humbert J-F. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria e Ecology, toxin production and risk management. *Water Research* 2013;1-16.
29. Wilmotte A. Molecular Evolution and Taxonomy of the Cyanobacteria [Internet]. En: Bryant DA, editor. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer

Academic Publishers; 2004 [citado 2018 sep 6]. página 1-25. Available from:  
[http://link.springer.com/10.1007/0-306-48205-3\\_1](http://link.springer.com/10.1007/0-306-48205-3_1)

30. Stanier RY, Deruelles J, Rippka R, Herdman M, Waterbury JB. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology* 1979;111(1):1-61.
31. Cervantes Gonzales JL. Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. *Rev Medica Hered* 2013;14(4):230.
32. Díaz NA, Ruiz JAB, Reyes EF, Cejudo AG, Novo JJ, Peinado JP, et al. Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. :8.
33. Peña CAP, Dapena JD, Martínez E, Ruiz JAB, García C. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. :8.
34. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp [Internet]* 2012 [citado 2018 sep 17];(62). Available from: <http://www.jove.com/video/3923/>
35. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2013;2(2):70-8.
36. Huang G, Chen F, Wei D, Zhang X, Chen G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl Energy* 2010;87(1):38-46.

37. Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy* 2011;88(10):3402-10.
38. Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res* 2011;45(1):11-36.
39. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ* 2010;14(2):557-77.
40. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 2008;54(4):621-39.
41. Parikh A, Madamwar D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology* 2006;97:1822-7.
42. Nelson DL, Cox MM. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En: Lehninger: Principios de Bioquímica. página 75-116.
43. Kennelly PJ, Rodwell VW. Proteínas: órdenes de estructura superiores. En: HARPER. BIOQUÍMICA ILUSTRADA. MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.; 2012.
44. Moncayo Medina A. Caracterización Morfológica, Análisis Proximal y Análisis Microbiológico de una muestra de la Cianobacteria *Nostoc sp.*, recolectada en el páramo de Papallacta. [Internet]. 2017;Available from:

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9327/3/T-UCE-0008-001-2017.pdf>

45. Cobos M, Castro J, Vargas G. Protocolos para el aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de microalgas oleaginosas. Iquitos-Perú: 2016.
46. Richmond A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology [Internet]. Blackwell Science; 2004 [citado 2018 oct 5]. Available from: <http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=9e074d250deaae72b8c04aeb8cb9a559>
47. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013;41(1):e1.
48. Yu X, Zhao P, He C, Li J, Tang X, Zhou J, et al. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour Technol* 2012;121:256-62.
49. Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972;48(2):422-7.
50. DuBois Michel, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith Fred. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 1956;28(3):350-6.
51. Hoebler C, Barry JL, David A, Delort-Laval J. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral

- monosaccharides by gas-liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1989;37(2):360-7.
52. Rippka R. [1] Isolation and purification of cyanobacteria [Internet]. En: *Methods in Enzymology*. Academic Press; 1988 [citado 2019 feb 1]. página 3-27. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687988670042>
  53. Castenholz RW. [3] Culturing methods for cyanobacteria [Internet]. En: *Methods in Enzymology*. Academic Press; 1988 [citado 2019 feb 1]. página 68-93. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687988670066>
  54. Allen MM. Simple Conditions for Growth of Unicellular Blue-Green Algae on Plates. *J Phycol* 1968;4(1):1-4.
  55. Uma VS, Gnanasekaran D, Lakshmanan U, Dharmar P. Survey and isolation of marine cyanobacteria from eastern coast of India as a biodiesel feedstock. *Biocatal Agric Biotechnol* 2020;24:101541.
  56. Thilak TS, Madhusoodanan PV, Pradeep NS, Prakashkumar R. Isolation and taxonomy of the blue-green algae (Cyanobacteria), *Nostoc* and *Anabaena* in Kerala State, India. *Acta Bot Hung* 2020;62(1-2):163-74.
  57. Prihantini NB. Morphological identification, isolation, and culturing of cyanobacteria derived from hot spring of Cisolok and Galunggung Mountain based on enrichment method. *J Phys Conf Ser* 2020;1442:012069.
  58. Ruiz MC, Gómez JC, Chávez J del Á, Bosmediano HS. Identificación de microalgas oleaginosas en el Área de Concesión para conservación, cuenca alta del río Itaya. Loreto-Perú. *Cienc Amaz Iquitos* 2012;2(2):162-8.

59. Sena L, Rojas D, Montiel E, González H, Moret J, Naranjo L. A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. cyanobacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2011;27(5):1045-53.
60. Vaara T, Vaara M, Niemelä S. Two Improved Methods for Obtaining Axenic Cultures of Cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 1979;38(5):1011-4.
61. Schwarz D, Orf I, Kopka J, Hagemann M. Recent Applications of Metabolomics Toward Cyanobacteria. *Metabolites* 2013;3(1):72-100.
62. Nakajima T, Kajihata S, Yoshikawa K, Matsuda F, Furusawa C, Hirasawa T, et al. Integrated Metabolic Flux and Omics Analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under Mixotrophic and Photoheterotrophic Conditions. *Plant Cell Physiol* 2014;55(9):1605-12.
63. Lin W-R, Tan S-I, Hsiang C-C, Sung P-K, Ng I-S. Challenges and opportunity of recent genome editing and multi-omics in cyanobacteria and microalgae for biorefinery. *Bioresour Technol* 2019;291:121932.
64. Yang Y, Feng J, Li T, Ge F, Zhao J. CyanOmics: an integrated database of omics for the model cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Database* [Internet] 2015 [citado 2020 oct 15];2015. Available from: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bau127/24331>
65. Sambrook J, Frisch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

66. Pomati F, Sacchi S, Rossetti C, Giovannardi S, Onodera H, Oshima Y, et al. The Freshwater Cyanobacterium *Planktothrix* Sp. Fp1: Molecular Identification and Detection of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *J Phycol* 2000;36(3):553-62.
67. Neilan BA, Burns BP, Relman DA, Lowe DR. Molecular Identification of Cyanobacteria Associated with Stromatolites from Distinct Geographical Locations [Internet]. <https://home.liebertpub.com/ast2004> [citado 2020 oct 15];Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/153110702762027853>
68. Jirů Komárek. Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *Algae* 2006;4(21):349-75.
69. Kawaguchi T, Decho AW. Biochemical Characterization of Cyanobacterial Extracellular Polymers (EPS) from Modern Marine Stromatolites (Bahamas). *Prep Biochem Biotechnol* 2000;30(4):321-30.
70. Okajima K, Yoshihara S, Fukushima Y, Geng X, Katayama M, Higashi S, et al. Biochemical and Functional Characterization of BLUF-Type Flavin-Binding Proteins of Two Species of Cyanobacteria. *J Biochem (Tokyo)* 2005;137(6):741-50.
71. Cobos, M., Pérez, S., Braga, J. *et al.* Nutritional evaluation and human health-promoting potential of compounds biosynthesized by native microalgae from the Peruvian Amazon | SpringerLink [Internet]. [citado 2020 oct 15];Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-020-02896-1>



72. Patel A, Mishra S, Pawar R, Ghosh PK. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expr Purif* 2005;40(2):248-55.
73. Abd El-Baky HH, El-Baroty GS. Characterization and bioactivity of phycocyanin isolated from *Spirulina maxima* grown under salt stress. *Food Funct* 2012;3(4):381-8.
74. Bhat VB, Madyastha KM. Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285(2):262-6.
75. Bhat VB, Madyastha KM. C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275(1):20-5.
76. Edwards MR, MacColl R, Eisele LE. Some physical properties of an unusual C-phycocyanin isolated from a photosynthetic thermophile. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 1996;1276(1):64-70.
77. Gantar M, Simović D, Djilas S, Gonzalez WW, Miksovská J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. *J Biotechnol* 2012;159(1-2):21-6.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Secuencia de fotografías de la Colecta de muestras de agua en los distintos puntos de muestreo



**Anexo 2.** Secuencia de fotografías del cultivo inicial de las muestras de agua



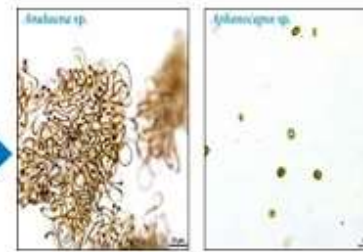
**Anexo 3.** Secuencia fotográfica de aislamiento, cultivo y cosecha de biomasa de cianobacterias



Aislamiento de las cianobacterias por capilaridad



Aislamiento de las microalgas por placas con agar



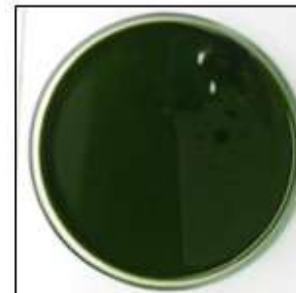
Géneros cianobacterianos aislados



Cultivos cianobacterianos

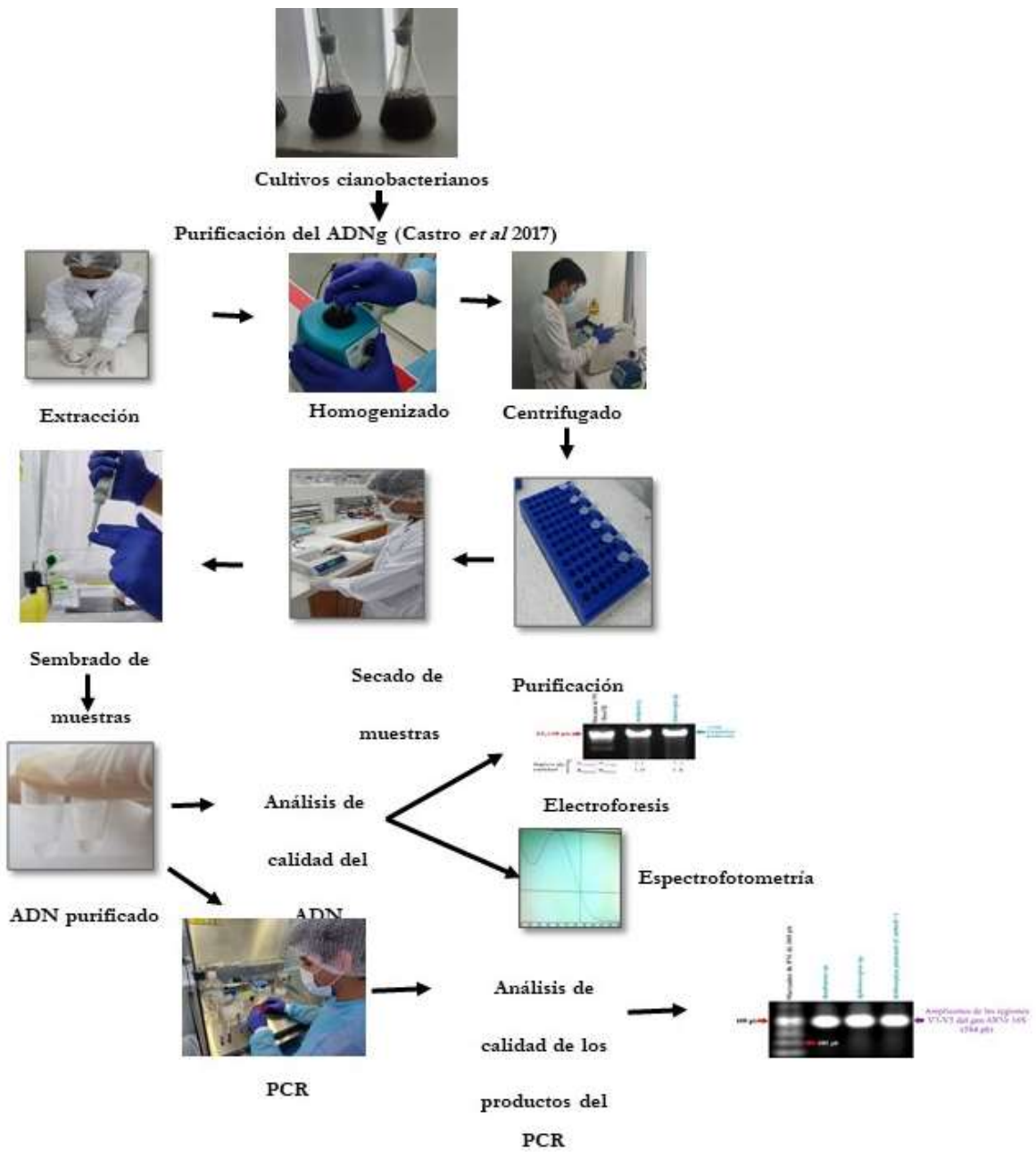


Cosecha de cianobacterias por centrifugación



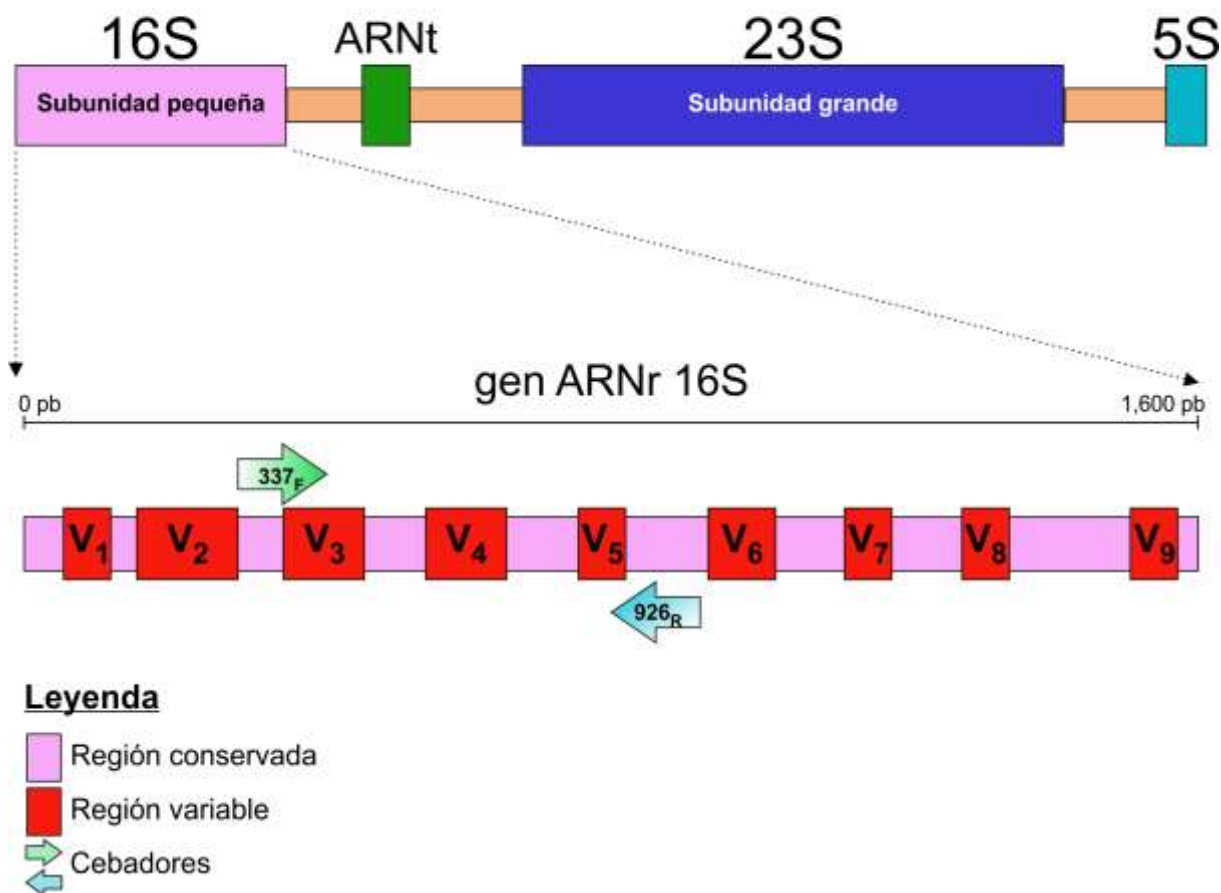
Biomasa de cianobacterias

**Anexo 4.** Secuencia fotográfica de identificación molecular de las cianobacterias.



**Anexo 5.** Organización del Operón ARNr de cianobacterias y otros procariontes, estructura del gen ribosomal 16S y zonas de hibridación de los cebadores 337F y 926R

## Operón ARNr de Procariontes



**Anexo 6.** Resultados del análisis estadístico mediante la prueba t de Student de los parámetros bioquímicos entre las dos especies de cianobacterias aisladas y cultivadas (*Anabaena* sp. y *Aphanocapsa* sp.) en condiciones axénicas

Parámetro Bioquímico	t	gl	P (ambas colas)	Diferencia de la media	Error estándar de la diferencia	95% del intervalo de confianza de la diferencia	
						Bajo	Alto
Lípidos	-4,025	4	0,016	-0,06000	0,01491	-0,10139	-0,01861
Carbohidratos	4,000	4	0,016	0,02667	0,00667	0,00816	0,04518
Proteínas	-4,000	4	0,016	-0,01333	0,00333	-0,02259	-0,00408
Cenizas	-13,250	4	0,000	-0,17667	0,01333	-0,21369	-0,13965

**Anexo 7.** Resultados de la prueba estadística de Kolmogorov–Smirnov de una muestra para determinar la normalidad de los datos

<b>Variable<sup>1</sup></b>	<b>Hipótesis Nula</b>	<b>Significancia<sup>2,3</sup> (p)</b>	<b>Decisión</b>
Contenido de lípidos	La distribución del contenido de lípidos es normal con una media de 1,70 y una desviación estándar de 0,037	0,20	Se retiene la hipótesis nula
Contenido carbohidratos	La distribución del contenido de carbohidratos es normal con una media de 1,73 y una desviación estándar de 0,016	0,20	Se retiene la hipótesis nula
Contenido de proteínas	La distribución del contenido de proteínas es normal con una media de 2,01 y una desviación estándar de 0,008	117,00	Se retiene la hipótesis nula
Contenido de cenizas	La distribución del contenido de cenizas es normal con una media de 1,67 y una desviación estándar de 0,098	0,20	Se retiene la hipótesis nula

**Leyenda:**

<sup>1</sup>El contenido de los componentes bioquímicos (lípidos, carbohidratos, proteínas y cenizas) es expresado como el porcentaje en peso de la biomasa seca de las cianobacterias.

<sup>2</sup>El nivel de significancia es  $p < 0,05$

<sup>3</sup>El nivel de significancia fue corregido con la prueba de Lilliefors

**Anexo 8.** Composición del medio ASM-1

Componente	Concentración final (mM)
NaNO <sub>3</sub>	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub>	0.2
MgCl <sub>2</sub>	0.2
CaCl <sub>2</sub>	0.2
Na <sub>2</sub> EDTA	0.02
FeCl <sub>3</sub>	0.004
Metales traza	Concentración final (µM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	40
CoCl <sub>2</sub>	0.08
CuCl <sub>2</sub>	0.0008
MnCl <sub>2</sub>	7
ZnCl <sub>2</sub>	3.2

**Anexo 9.** Composición del medio Bold's Basal Medium

Componente	Concentración final (mM)
NaNO <sub>3</sub>	2.94
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.43
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.29
MgSO <sub>4</sub>	0.3
CaCl <sub>2</sub>	0.17
NaCl	0.43
Na <sub>2</sub> EDTA	0.134
FeSO <sub>4</sub>	0.018
Metales traza	Concentración final (µM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.7
CuCl <sub>2</sub>	6.3
MnCl <sub>2</sub>	7.3
ZnSO <sub>4</sub>	30.7
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	4.9

**Anexo 10.** Composición del medio BG11

Componente	Concentración final (mM)
NaNO <sub>3</sub>	17.65
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.18
MgSO <sub>4</sub>	0.3
CaCl <sub>2</sub>	0.25
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.19
Na <sub>2</sub> EDTA	0.003
Citrato de amonio férrico	0.03
Ácido cítrico	0.029
Metales traza	Concentración final (µM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46
CoCl <sub>2</sub>	0.17
CuSO <sub>4</sub>	0.32
MnCl <sub>2</sub>	9.2
ZnSO <sub>4</sub>	0.77
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1.6

**Anexo 11.** Composición del Medio Cyanophycean

Componente	Concentración final (mM)
KNO <sub>3</sub>	17.65
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.18
MgSO <sub>4</sub>	0.3
Solución P-IV	Concentración final (µM)
Na <sub>2</sub> EDTA	12
FeCl <sub>3</sub>	2.16
MnCl <sub>2</sub>	1.26
ZnCl <sub>2</sub>	0.22
CoCl <sub>2</sub>	0.05
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.1



**Anexo 12.** Composición del medio Chu N°10

Componente	Concentración final (mM)
NaNO <sub>3</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05
MgSO <sub>4</sub>	0.15
CaCl <sub>2</sub>	0.33
NaHCO <sub>3</sub>	0.15
Citrato férrico	0.13
Sol Metasilicato	
HCl	0.1
Metasilicato de sodio	0.2
Metales traza	Concentración final (µM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100
Na <sub>2</sub> EDTA	1.48
CuSO <sub>4</sub>	0.78
MnCl <sub>2</sub>	0.63
CaCl <sub>2</sub>	1.8
ZnSO <sub>4</sub>	1.53
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.52