



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE CIANOBACTERIAS DE LA
REGIÓN LORETO – PERÚ, 2021**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA**

PRESENTADO POR:

RUTH CELESTINA CONDORI MAMANI

ASESORES:

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.

Blga. MARIANELA COBOS RUIZ, Dra.

Lic. SEGUNDO LEVI ESTELA MORENO, M.Sc.

IQUITOS, PERÚ

2023

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 019-CGT-UNAP-2023

En la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto, mediante Sala Presencial, a los 4 días del mes de agosto del 2023, a las 17.00 p.m horas se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: "CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE CIANOBACTERIAS DE LA REGIÓN LORETO-PERÚ, 2021", presentado por la Bachiller RUTH CELESTINA CONDORI MAMANI, autorizada mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 238-2023-FCB-UNAP, para optar el Título Profesional de BIÓLOGA, 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° 491-2022-FCB-UNAP, de fecha 08 de setiembre de 2022, integrado por los siguientes Profesionales:

- | | |
|---|--------------|
| - Blga. TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA, Dra. | - Presidente |
| - Blga. LUZ ESTHER VELA DE TUESTA, Dra. | - Miembro |
| - Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr. | - Miembro |

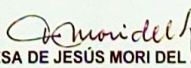
Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron absueltas:

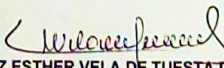
SATISFACTORIAMENTE

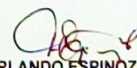
El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

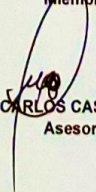
La sustentación pública y la Tesis han sido APROBADA con la calificación de MUY BUENA estando la Bachiller apto para obtener el Título Profesional de BIÓLOGA.


Siendo las 18.15 p.m horas se dio por terminado el acto de sustentación.

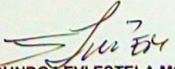

Blga. TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA, Dra.
Presidente


Blga. LUZ ESTHER VELA DE TUESTA, Dra.
Miembro


Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr.
Miembro


Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.
Asesor


Blga. MARIANELA COBOS RUIZ, Dra.
Asesora


LIC. SEGUNDO LEVI ESTELA MORENO, MSc.
Asesor

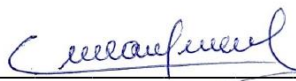


JURADOS CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



Blga. TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA, Dra

Presidente



Blga. LUZ ESTHER VELA DE TUESTA, Dra

Miembro



Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr.

Miembro

ASESORES



Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.

Asesor



Blga. MARIANELA COBOS RUIZ, Dra.

Asesora



Lic. SEGUNDO LEVI ESTELA MORENO, M.Sc.

Asesor

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD






17% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 16%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 7%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



DEDICATORIA

A mi mamita, que cada día lucha por darme lo mejor, me motiva a cumplir mis metas, el infinito amor que me muestra todos los días es un impulso para seguir adelante, quien con su apoyo económico y emocional fue posible la realización del proyecto.

Anastacia Mamani Chani

A mi tío, que cada día me apoya y está a mi lado, dándome
consejos.

Jose Usca Uharsa

A mis hermanos que son mis pilares de soporte.

Daniel, Miquias, Merica y Delia

AGRADECIMIENTO

Al Proyecto 018-2018-FONDECYT/BM “Adquisición de un Secuenciador Masivo NextSeq 550 como apoyo para la realización de estudios genómicos y metagenómicos de la biodiversidad de la Amazonia Peruana”.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por permitirme el uso de sus materiales, equipos y reactivos utilizados durante el desarrollo de la tesis.

A mis asesores, el Blgo. Juan Carlos Castro Gómez Dr, la Blga. Marianela Cobos Ruiz Dra, al Lic. Segundo Levi Estela Moreno MSc. quienes me brindaron sus conocimientos, para la realización de la tesis.

A la Ingeniera Margarita Milagros Torres Vásquez, por acompañarme los días de colecta y estar a mi lado, brindándome su confianza, su amistad, su apoyo incondicional fue gratificante.

A mis compañeros de laboratorio, Lucero Cabezudo, Tatiana Del Aguila, Miguel Grandez, por el apoyo en la realización de los ensayos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
PORTADA	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
JURADOS CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	iii
ASESORES	iv
RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Bases teóricas	10
1.3. Definición de términos básicos	12
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	16
2.1 Formulación de la hipótesis	16
2.2. Variables y su operacionalización	17

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	18
3.1 Diseño metodológico	18
3.3. Procedimientos de Recolección de Datos	19
3.4 Procesamiento y análisis de datos	25
3.5 Aspectos éticos	25
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	26
4.1 Identificación y aislamiento de cianobacterias provenientes de distintos tipos de reservorios	26
4.2 Evaluación del perfil de crecimiento de <i>Nostoc</i> sp y <i>Synechococcus</i> sp	27
4.3 Contenido de Lípidos totales, Carbohidratos y Proteínas	29
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	30
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	34
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	35
CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN	36
ANEXOS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Puntos de colecta de muestras	20
Figura 2. Cianobacterias aisladas, A: Nostoc sp; B: Synechococcus sp	27
Figura 3. Perfil de crecimiento de Nostoc sp en 10 días de evaluación	28
Figura 4. Perfil de crecimiento de Synechococcus sp en 10 días de evaluación.	29
Figura 5. Contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas de Synechococcus sp y Nostoc sp.	29

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Taxonomía de las cianobacterias aisladas	26

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
anexo 1. Composición del medio BG-11	46
anexo 2. Composición del medio CHU N°.10	47
anexo 3. Flujograma de los procedimientos realizados (colecta, identificación, aislamiento, perfil de crecimiento y perfil bioquímico).	48
anexo 4. Evaluación del perfil de crecimiento de Nostoc sp durante diez días.	49
anexo 5. Evaluación del perfil de crecimiento de Synechococcus sp durante diez días.	49
anexo 6. Pruebas bioquímicas realizados a Nostoc sp y Synechococcus sp y porcentaje obtenidos.	49
anexo 7. Analisis estadístico de t-Student, en relación con las pruebas bioquímicas.	50

RESUMEN

Las cianobacterias a lo largo de la historia se han utilizado como suplemento alimenticio, matriz para productos farmacéuticos, agentes anticancerígenos, y también han demostrado un gran potencial en biorremediación. Es por ello que, el objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar bioquímicamente cianobacterias de la Región Loreto, Perú. La recolección se realizó mediante una red de fitoplancton de 20 μm , y las muestras fueron enriquecidas con medios BG-11 y CHU N°10. Los aislamientos se realizaron mediante el método de vaciado en placas y diluciones seriadas. Para la identificación, se emplearon claves taxonómicas y se evaluó el perfil de crecimiento mediante el peso seco. Para las pruebas bioquímicas, se evaluaron siguiendo los métodos de lípidos por Flores et al. (2020), proteínas totales de Hartree (1972) y carbohidratos de Dubois et al. (1956), respectivamente. En el estudio se logró aislar dos especies: *Synechococcus* sp. y *Nostoc* sp. El perfil de crecimiento de *Nostoc* sp. alcanzó un máximo de 4,05 μg y un mínimo de 3,75 μg , mientras que *Synechococcus* sp. presentó un máximo de 9,20 μg y un mínimo de 8,55 μg . En términos bioquímicos, *Nostoc* sp. mostró un contenido del 3,43% de lípidos, 55,19% de carbohidratos y 23,53% de proteínas. Por su parte, *Synechococcus* sp. exhibió un 16,36% de lípidos, 17,48% de carbohidratos y 57,56% de proteínas. En conclusión, las cianobacterias aisladas en este estudio presentan valores óptimos de lípidos, carbohidratos y proteínas, lo que sugiere su potencial para futuras aplicaciones en la alimentación.

Palabras clave: Cianobacteria, aislamiento, lípidos, carbohidratos, proteína

ABSTRACT

Cyanobacteria have been used throughout history as a dietary supplement, as a matrix for pharmaceutical products, as anticancer agents, and they have also shown great potential in bioremediation. Therefore, the objective of this study was to isolate and biochemically characterize cyanobacteria from the Loreto Region, Peru. Collection was carried out using a 20 µm phytoplankton net, and samples were enriched with BG-11 and CHU N°10 media. Isolations were performed using the pour plate method and serial dilutions. For identification, taxonomic keys were used, and growth profile was evaluated by dry weight. For biochemical tests, lipid content was evaluated following Flores et al. (2020), total proteins by Hartree (1972), and carbohydrates by Dubois et al. (1956). The study succeeded in isolating two species: *Synechococcus* sp. and *Nostoc* sp. The growth profile of *Nostoc* sp. reached a maximum of 4.05 µg and a minimum of 3.75 µg, while *Synechococcus* sp. showed a maximum of 9.20 µg and a minimum of 8.55 µg. Biochemically, *Nostoc* sp. exhibited a 3.43% lipid content, 55.19% carbohydrates, and 23.53% proteins. Meanwhile, *Synechococcus* sp. displayed 16.36% lipids, 17.48% carbohydrates, and 57.56% proteins. In conclusion, the isolated cyanobacteria in this study show optimal values of lipids, carbohydrates, and proteins, suggesting their potential for future applications in food.

Keywords: Cyanobacteria, isolation, lipids, carbohydrates, proteins

INTRODUCCION

Las cianobacterias cuentan con una larga historia evolutiva, ya que fueron los principales productores de materia orgánica y los primeros organismos en liberar oxígeno molecular a la atmósfera primitiva⁽¹⁾, permitiendo el desarrollo de una tremenda biodiversidad de consumidores secundarios y terciarios, es por ello que son considerados como el grupo más importante⁽²⁾. En los últimos años se desarrollaron métodos no tóxicos y amigables con el medio ambiente con base a estos microorganismos, los avances biotecnológicos han demostrado el potencial que poseen^(3,4); con múltiples aplicaciones con en la elaboración de medicina humana, uso en las industrias de alimento y biofertilizantes⁽⁵⁾.

Cabe mencionar que las cianobacterias constituyen la base de la cadena trófica, de ecosistemas terrestres y acuáticos⁽⁶⁾, también son productoras de clorofilas, carotenoides, proteínas y ficobiliproteínas exopolisacáridos^(7,8); el conocimiento de sus características bioquímicas en cultivos de laboratorio ayuda a determinar su potencial biotecnológico convirtiéndose así en un grupo de alto valor económico y su potencial biotecnológico parece incrementarse⁽⁹⁾; las aplicaciones en las cuales contribuyen son la colonización de sustancias infértiles, fijación de nitrógeno, potencial en la biorremediación , tratamiento de residuos, son de gran interés para las investigaciones de nanopartículas⁽¹⁰⁾.

Algunas familias de cianobacterias son consideradas las “fábricas bioquímicas” más importantes del mundo biológico, también algunas especies son utilizadas como matriz para productos farmacéuticos, anticancerígenos, antipalúdico, antifúngico y antimicóticos⁽¹⁰⁾. Se encuentran en diversos hábitats como: suelo, agua estancada, charcos temporales⁽¹¹⁾. En ambientes

marinos, son la fuente primaria de nutrientes, por lo que son consideradas la base de la cadena alimenticia. Sin embargo, la mayor abundancia y diversidad de las mismas, se encuentra en ambientes de agua dulce^(12,13).

Todo esto adquiere una gran importancia debido a los problemas ambientales globales existentes en la actualidad, como la desnutrición, la contaminación de los ambientes acuáticos, entre otros⁽¹⁴⁾. En ese sentido, es importante contar con un banco de cepas de cianobacterias potencialmente para los procesos biotecnológicos, que contribuyan a futuras investigaciones y a mejorar el sistema económico del país.

Sin embargo existen obstáculos tecnológicos y económicos que deben solucionarse^(15,16), uno de los mayores es el aislamiento, selección, identificación, cultivo⁽¹⁷⁻²¹⁾, y caracterización de las cianobacterias a fin de conocer las diferentes aplicaciones que puedan tener. Sin embargo, los estudios sobre cianobacterias amazónicas realizadas a la fecha, solo se han limitado a su identificación taxonómica que es imprecisa, ya que se tiene que realizar caracterizaciones bioquímicas. Debido a estos vacíos de información y el desconocimiento es que nos impulsa a llevar a cabo la investigación sobre Aislamiento y caracterización bioquímica de cianobacterias en la Región Loreto. Por tanto, en esta investigación se propuso realizar una búsqueda exhaustiva de cianobacterias en diversos tipos de reservorios, charcos, agua estancada y sustratos para aislar, cultivar y caracterizarlas bioquímicamente, a fin de conocer sus características bioquímicas y potencialidades biotecnológicas. Por tanto, el objetivo general fue Aislar y caracterizar bioquímicamente cianobacterias de la Región Loreto y los objetivos específicos fueron: 1) Identificar y aislar cianobacterias provenientes de

distintos tipos de reservorios: charcos, agua estancada y sustratos, 2) Evaluar el perfil de crecimiento de cianobacterias aisladas y 3) Determinar el contenido de lípidos totales, carbohidratos y proteínas de las cianobacterias aisladas.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

En 2017 se realizó una investigación que incluyó a cianobacterias tropicales de Costa Rica de los géneros *Nostoc*, *Calothrix*, *Tolypothrix* y *Scytonemas*, y consistió en identificar y caracterizar molecularmente con la finalidad de que puedan ser utilizadas como potencial biotecnológico. Los DNA genómicos de las cepas se aislaron utilizando el protocolo de extracción por CTAB y el DNA obtenido se cuantificó con un NanoDrop 2000UV-Vis; también se realizó PCR de los genes 16sARNr y *rpoc1*, los productos derivados del PCR se movilizaron en un gel de agarosa al 1,5 % mientras que para el análisis filogenético se utilizó un protocolo alternativo que consistió en la limpieza y purificación del producto del PCR mediante precipitación con etanol 95% y acetato de sodio 3M. Las secuencias obtenidas fueron editadas en los programas bioestadísticos y también se buscó la similitud en NCBI. Los géneros identificados son relevantes por su capacidad de fijar nitrógeno y su notable potencial nutricional, farmacológico e industrial. El estudio concluye que, a partir de la identificación exitosa de cianobacterias en ambientes tropicales, se abre la puerta a investigaciones más profundas sobre sus propiedades biotecnológicas. Estas investigaciones permitirán evaluar su potencial y generar perspectivas futuras para su aplicación y la conservación de la biodiversidad⁽²²⁾.

En el año 2017 se desarrolló una investigación que incluyó como población de estudio a dos cepas de cianobacterias filamentosas, con la finalidad de observar la evolución del crecimiento y su composición bioquímica, estas cepas de estudio fueron *Nostoc* (AU0015) y *Anabaena* (M0F015), los cultivos

se realizaron por duplicado en dos volúmenes de 50 y 100 L y el medio de cultivo fue BG-11. El experimento se llevó a cabo utilizando un inóculo que representaba el 10% del volumen total. El ensayo se prolongó durante 40 días con aireación constante y agitación manual realizada tres veces al día. Durante este periodo, se monitorearon los cultivos mediante mediciones de turbidez y la determinación de la composición bioquímica en fase estacionaria. La masa seca se determinó mediante métodos gravimétricos, mientras que el contenido de pigmentos se evaluó a través de espectrofotometría mediante extracciones metabólicas para clorofila a y carotenoides. Además, la cantidad de proteínas se estimó utilizando el método Folin, los carbohidratos se midieron mediante el método fenol-ácido sulfúrico y, por último, el contenido de lípidos se determinó mediante el método de carbonización simple. Los resultados revelaron que *Anabaena* M0F015 presentó valores superiores en cuanto a la producción de masa seca, ficocianina, clorofila a ficoeritrina, proteínas y lípidos en comparación con los cultivos de *Nostoc* LAUN0015. Se destaca que *Anabaena* M0F015 exhibió un crecimiento significativamente mayor y una producción de biomasa seca superior ($p < 0,05$) en condiciones diazotróficas. En cuanto a la producción de carbohidratos *Nostoc* LAUN0015 alcanzó la máxima producción ($754,17 \pm 79,86 \mu\text{g mL}^{-1}$). Concluyendo que ambas especies estudiadas pudieron ser cultivadas a cielo abierto de forma efectiva, obteniendo resultados de crecimiento y producción de biomasa enriquecida⁽²³⁾.

En el año 2017, se llevó a cabo una investigación que se enfocó en la población de estudio de *Nostoc* sp., con el objetivo de analizar su composición bioquímica y toxicidad. Las muestras de las colonias fueron recolectadas en

diversos bofedales altoandinos ubicados en Perú y Chile. Posteriormente, las muestras fueron secadas y almacenadas en la oscuridad, a temperatura ambiente y en envases herméticos. Para la obtención de las proteínas totales, se empleó 1g de muestra utilizando el método de Kjeldhal. Los lípidos totales se midieron mediante el procedimiento Soxhlet, utilizando también 1g de muestra. La evaluación de las cenizas de la biomasa se realizó por gravimetría. El contenido de minerales metálicos y no metálicos se evaluó mediante espectrofotometría, mientras que el contenido de carbohidratos totales se determinó como porcentaje de extractos no nitrogenados. Para los análisis adicionales, las muestras fueron enviadas al laboratorio del Instituto de Tecnología de la Universidad de Chile. El perfil y la cuantificación de los aminoácidos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición Molecular de la Universidad Católica de Chile. El análisis de DNA y PCR se realizó en el Centro de Investigaciones Isla de la Cortajena, Sevilla y España. Los resultados obtenidos de las muestras de *Nostoc* sp. recolectadas en los humedales peruanos indicaron que las proteínas representaban entre el 30% y el 35%, los carbohidratos el 50%, y los lípidos el 17%. Además, el contenido de aminoácidos esenciales para los humanos alcanzó el 44%, y los ácidos grasos se encontraron en un 82%. El estudio concluyó que las macrocolonias de *Nostoc* sp. en los humedales altoandinos peruanos no generan la cianotoxina microcistina, ya que el gen *mycE* no está presente en su genoma, lo que sugiere que podrían considerarse inocuas para el consumo humano⁽²⁴⁾.

En el año 2016, se llevó a cabo una investigación que tuvo como población de estudio a *Spirulina maxima*, con el objetivo de evaluar dos métodos de cultivo, Zomouk y Schlosser. El propósito principal fue determinar cuál de

estos métodos generaba mayor reproducción y concentración de nutraceuticos, tales como proteínas, ficocianina y los pigmentos carotenos. El estudio se desarrolló en condiciones de laboratorio a lo largo de nueve días. La biomasa de *Spirulina máxima* fue cosechada mediante centrifugación, y la determinación de proteínas, carotenos y ficocianina se realizó siguiendo los protocolos específicos descritos en el manual de métodos y herramientas analíticos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: en el medio de cultivo Schlösser, se alcanzó un rendimiento de 9,98 mg/mL, mientras que en el medio Zarrouk fue de 6,78 mg/mL. Respecto al contenido de proteínas, se observó que en el medio Schlösser fue del 74%, en contraste con el medio Zarrouck, donde alcanzó el 37%. La concentración de los pigmentos y carotenos, fue significativamente mayor en el medio de cultivo Schlösser. Como conclusión, se determinó que *Spirulina maxima* cultivada en el medio Schlösser exhibió el mayor contenido de nutraceuticos. Estos resultados subrayan la importancia de la selección del medio de cultivo, especialmente a nivel de laboratorio, para maximizar la producción de componentes nutraceuticos en *Spirulina maxima*⁽²⁵⁾ .

En el 2009 se estudió a *Osillatoria* sp., aislada de una laguna de camarones que consistía en evaluar el crecimiento y la composición bioquímica. Se utilizó medios de cultivos compuesto por agua de mar, destilada y enriquecida con nutrientes mediante una serie de cuatro ensayos, se probó el efecto de salinidad a diferentes concentraciones de nutrientes equivalentes a 0,8 y 12 mM de NaNO₃, todos los cultivos fueron mantenidos en condiciones de laboratorio hasta alcanzar la fase estacional, la biomasa se cosechó por centrifugación a 14×10^3 g por 15 minutos, para el análisis bioquímico se

utilizó biomasa congelada a -20°C , excepto para el contenido de pigmentos y masa seca para los cuales se usó biomasa fresca. Los pigmentos liposolubles, clorofila a y carotenoides se midieron por HPLC mientras que el pigmento hidrosoluble, ficocianina se extrajo por el choque osmótico, los carbohidratos y el contenido de proteínas se midieron por el método de fenol ácido sulfúrico y el método de LOWRY *et al.*, la masa seca se determinó mediante el sistema de filtración Millipore y por ultimo para el análisis estadístico se llevaron a cabo con el programa SPSS 10.0 para Windows utilizando análisis de varianza de (ANOVA) . Los resultados mostraron lo siguiente que la cantidad máxima de masa seca se halló a 4 mM NaNO_3 y 70 UPS con $11,00 \pm 0,57 \text{ mg mL}^{-1}$ y el de proteínas a 12 mM y 35 UPS con $777,92 \pm 15,37 \mu\text{g mL}^{-1}$; el de carbohidratos totales y el trabajo concluyó que la *Oscillatoria* sp. Los resultados mostraron que fue capaz de crecer en todas las concentraciones de salinidades posibles; con alta producción de metabolitos en concentraciones intermedias y en concentraciones altas de nutrientes con salinidad. La capacidad que poseen las cianobacterias para adaptarse y aclimatarse a cambios ambientales demostró su versatilidad metabólica. Así como también, la estabilidad de los cultivos en fase estacionaria, constituyendo otro factor favorable para la producción de biomasa enriquecida con pigmentos de interés económico⁽²⁶⁾.

En el año 2000 se desarrolló la investigación que consistió en la caracterización bioquímica de polímeros extracelulares (EPS) de dos especies de cianobacterias *Synechocystis* sp y *Oscillatoria* sp, que fueron aislados de estromatolitos marinos modernos en Highbome, se caracterizaron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional, los cultivos

estaban en medio CHU N°10. Para Los análisis de monómeros de carbohidratos las muestras fueron purificados y se hidrolizaron utilizando 1M de HCL metanolico durante 16 horas a 80°C y las azucares liberadas se derritieron con Tris-sil para finalmente ser analizada por cromatografía de gases; para la evaluación del contenido de ácido úrico se midió utilizando carbazol en ácido sulfúrico al 80% con adición de iones de borat, para el contenido de glicosaminoglicanos se usó el azul de dimetil metileno y el contenido de proteínas se evaluó utilizando el método de Bradford utilizando BioRad Protein Assay Kint. Los resultados mostraron que *Synechocystis* sp., posee 0,35% ($3,53 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{mg EPS} \pm \text{SD}$) y *Oscillatoria* sp. posee 0,63% ($6,33 \pm 1,53 \mu\text{g}/\text{mg EPS} \pm \text{SD}$) de proteínas, el contenido de glicosaminoglicanas GAGS fue de $4,40 \pm 0,17$ y $11,00 \pm 1,00$ respectivamente , y el ácido úrico de *Synechocystis* sp fue de $4,63 \pm 2,65$ y de *Oscillatoria* sp fue de $39,00 \pm 2,65$, y el contenido de carbohidratos (%) de *Synechocystis* fue de (glucosa 58,3 , galactosa 19,0, xilosa 7,3, arabinosa 7,4, ramnosa 5,4, fucosa 2,6) y de *Oscillatoria* sp., fue de (glucosa 26,7 , galactosa 37,1, xilosa 13,4, arabinosa 1,8, ramnosa 7,5, fucosa 13,5). El trabajo concluyó que el contenido de proteínas de *Synechocystis* sp. y *Oscillatoria* sp., fueron bajos con 0,35% y 0,63% respectivamente⁽²⁷⁾.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Cultivo de cianobacterias

Las condiciones de cultivo en cianobacterias dependen de la especie que se desea cultivar y de los ensayos experimentales planificados, se realizan en medios controlados que optimizan la utilización de la luz y la cosecha de las células; generalmente se realiza en medios líquidos y sólidos que estén enriquecidos con nutrientes⁽²⁸⁾. En la mayoría de las investigaciones los cultivos de cianobacterias se mantienen hasta alcanzar la fase estacionaria, y según la proporción de nutrientes que se agregue al cultivo esto tendrá un aumento en la producción de pigmentos, biomasa, metabolitos entre otros, otros factores externos como la temperatura, humedad relativa, flujo de aire concentración de CO₂, iluminación, entre otros influyen en el cultivo^(26,28). Mientras que los cultivos se realicen en medios controlados se podrá conocer sus características fisiológicas, bioquímicas e interpretar de manera más eficiente los resultados⁽⁹⁾. El fotobiorreactor es adecuado para realizar el cultivo de cianobacterias, generando aumentos significativos de biomasa y metabolitos⁽²⁹⁾.

1.2.2. Clasificación de cianobacterias

Se las considera bacterias en el sentido de que no tienen una membrana que rodea el núcleo y la ausencia de plastidios; ausencia de mitocondrias, sistemas de Golgi y retículo endoplasmáticos, y también porque tienen subunidades ribosómicas 16S y 23S. Otra similitud es la acumulación de cianoficina (almidón de cianofitas) como sustancia de reserva, similar al glucógeno y la ausencia de formas de reproducción sexual. Además, las estructuras químicas de la pared celular de las cianobacterias están, formadas

por peptidoglucano, como la mureína, glucopéptidos, mucopéptidos, que es similar a las bacterias Gram negativas^(30,31). Comparado con otros procariotas, pueden ser células grandes, con diversas formas morfológicas, están presentes unicelulares, filamentosas, ramificadas o no, y con diferentes tamaños. También forman colonias con diferentes grados de complejidad, las cianobacterias tienen una característica que muy pocos procariotas poseen, la capacidad de llevar a cabo diferenciación celular⁽³²⁾.

1.2.3. Importancia de Cianobacterias

Producen una enorme cantidad de metabolitos con interés terapéutico, que incluyen antivirales, antitumorales, inhibidores de enzimas, protectores de luz ultravioleta entre otros efectos⁽³³⁾. Los metabolitos secundarios son de interés, mediante recombinación génica; estos constituyen una fuente alternativa de proteínas, son prometedores en la búsqueda de nuevos productos bioactivos, debido a las altas cantidades de aminoácidos esenciales en su biomasa. Además, que la biomasa obtenida; puede ser utilizada como alternativa para la obtención de energía sostenible y como suplemento alimenticio. Y dan origen al ciclo del nitrógeno que es de gran importancia para la vida en la tierra⁽³²⁾.

1.2.4. Técnicas de Aislamiento de cianobacterias

Para poder realizar las técnicas de aislamiento se tiene que conocer las características morfológicas para poder determinar que técnica será más adecuado para realizar el aislamiento; entre las técnicas están el aislamiento con micropipetas que consiste en aislar una cianobacterias con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta reducida y/o capilar , en muchos casos se preparan los capilares a partir de una pipeta Pasteur y también está el

aislamiento en placas con agar se puede usar de manera complementaria al aislamiento con capilares , para garantizar un aislamiento puro⁽²⁸⁾.

1.2.5. Ciclo de vida de las cianobacterias

Constituye un aspecto fundamental debido a sus implicaciones tanto taxonómicas como fisiológicas y relacionadas con el cultivo⁽³⁴⁾. Este proceso se resume en las siguientes etapas: a) fragmentación de los tricomas, b) ampliación de los hormogonios celulares, c) procesos de maduración y d) elongación de tricomas. Durante esta fase, los tricomas maduros se dividen en varios filamentos más pequeños, conocidos como hormogonios, mediante la formación previa de células especializadas llamadas necridios celulares⁽³⁵⁾.

1.2.6. Caracterización bioquímica

La taxonomía de cianobacterias modernas debe complementarse con métodos bioquímicos, porque han facilitado estudios más complejos independientes del cultivo e identificación y difíciles de cultivar. Además, no requieren cultivos axénicos. La importancia del enfoque polifásico, que combina observaciones morfológicas con datos bioquímicos para mejorar la taxonomía de las cianobacterias es incuestionable. Las caracterizaciones bioquímicas de estos microorganismos juegan un papel importante en su estudio y así poder determinar el potencial biotecnológico que poseen⁽²²⁾.

1.3. Definición de términos básicos

Cianobacterias: Organismos fotoautótrofos, presentan clorofila a como pigmento fotosintético primario y ficobiliproteínas como pigmentos auxiliares. Poseen un pigmento característico de verde-azulado que es producido por las ficobilinas⁽³⁶⁾.

Aislamiento: Proceso que consiste en la extracción de un microorganismo de su ambiente natural, mediante técnicas o métodos; con el fin de realizar investigaciones futuras, tiene como objetivo conseguir una población de cianobacterias partiendo de un solo individuo, las técnicas de aislamiento a usar dependen de las dimensiones de las cianobacterias, de su movilidad y su morfología⁽²⁸⁾.

Medios de cultivo: Conjunto de sustancias que simulan las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos, que generalmente está compuesto por, micronutrientes y macronutrientes, tiene como finalidad incrementar la producción de los componentes nutracéuticos como; proteínas y los pigmentos carotenos y ficocianinas de la cianobacterias⁽³⁶⁾.

Carbohidratos: Son compuestos esenciales de los organismos vivos y son la clase más abundante de moléculas biológicas, que contienen C₆, H₁₂ y O₆. Durante el metabolismo se queman para producir energía, y liberan dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O)⁽³⁷⁾.

Proteínas: Son macromoléculas compuestas principalmente por carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno, y a veces contienen fósforo, azufre y otros elementos como magnesio, cobre y hierro en cantidades más pequeñas. Están formadas por cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro ⁽³⁸⁾. Las cianobacterias, por ejemplo, tienen niveles significativos de proteínas, incluidas aquellas que forman parte de sus sistemas fotosintéticos⁽³⁷⁾.

Lípidos totales: Los lípidos son una clase de biomoléculas orgánicas que incluyen una amplia variedad de compuestos insolubles en agua, pero

solubles en solventes orgánicos como el éter, el cloroformo y la acetona. Los lípidos desempeñan funciones esenciales en los organismos vivos y se dividen principalmente en tres categorías principales: grasas, fosfolípidos y esteroides⁽³⁷⁾. Entre los lípidos más representados se encuentran el β -caroteno, la fucoxantina (hasta el 70% del contenido total de carotenos) y el tocoferol ⁽³⁹⁾.

Fotosíntesis: Proceso en el cual la energía de la luz pasa a ser energía química en forma de azúcar, se crean moléculas de glucosa (y otros azúcares) a partir de H₂O y CO₂, mientras que se libera oxígeno como subproducto, este proceso es fundamental para el desarrollo de la vida. El pigmento encargado de captar la luz es la clorofila a⁽⁶⁾.

Reservorio: Estructura construida con tierra impermeabilizada que se utiliza para captar y almacenar agua de lluvia directa o escorrentía en un área específica ⁽⁴¹⁾.

Charco: líquido, detenida en un hoyo o cavidad de la tierra o del piso, se podría decir que es un pequeño sudor de agua, pero no es suficiente como para conformar un lago. El agua de charco también es conocida por ser el hábitat de vida de muchos microorganismos acuáticos⁽⁴⁰⁾.

Lago: es un cuerpo de agua dulce que está separado del mar y no tiene conexión directa con él. Recibe agua principalmente de ríos, aunque en algunos casos la mayor parte del caudal proviene de las lluvias que caen directamente sobre el lago⁽⁴¹⁾.

Sustrato: Base fundamental de la vida en un ecosistema, puede estar compuesto por elementos tanto bióticos como abióticos. Por ejemplo, las algas que viven incrustadas en una roca pueden ser el sustrato para otro animal que vive en la parte superior de las algas⁽⁴⁰⁾.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 Formulación de la hipótesis

Existen cianobacterias con alto contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos totales presentes en reservorios como charcos, agua estancada y sustratos.

2.2. Variables y su operacionalización

Variable	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de medición	Categoría	Valores de la categoría	Medios de verificación
Caracterizar bioquímicament e cianobacterias de la Región. Loreto-Perú,2021.	Proceso por el cual se podrá conocer la biomasa, lípidos, proteínas entre otros, a través de diferentes métodos	Cualitativo	Identificación y aislamiento de especies de cianobacterias	Nominal	Media	Cel./mL	Registro de especies de cianobacterias identificadas y aisladas.
		Cuantitativo	Perfil de crecimiento y producción de biomasa	Nominal	Media	Cel./mL mg/mL	Registro de peso seco cada dos días.
			Producción de lípidos totales	Razón	Alta Media Baja	76-100% 40-75% 0-40%	Registro de datos de pesado
			Contenido de proteínas y Carbohidratos	Razón	Alta Media Baja	76-100% 40-75% 0-40%	Longitud de onda de 650 nm. Longitud de onda de 485 nm.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Diseño metodológico

Fue observacional, puesto que, las cianobacterias estudiadas se colectaron en cuerpos de agua en los que aún no se realizaron estudios (charco, agua estancada y sustrato) y para la evaluación del perfil de crecimiento se utilizó medio de cultivo CHU N°10. Para determinar la cantidad de lípidos, carbohidratos y proteínas se realizaron con protocolos. Además, la investigación fue transversal porque las variables fueron medidas en un tiempo específico. Según la planificación de la toma de datos fue prospectivo porque los datos fueron obtenidos a medida que se realizaron los procedimientos correspondientes.

3.2 Diseño muestral

3.2.1. Población universo

La población estuvo constituida por todas las especies de cianobacterias.

3.2.2. Población de estudio

La población estuvo constituida por todas las cianobacterias presentes en reservorios como charcos, agua estancada y sustrato de la región Loreto.

3.2.3. Tamaño de la población de estudio

La población que se tomó en cuenta son las especies de cianobacterias colectadas en reservorios como charcos, agua estancada y sustrato, población finita y geográficamente disponible en el área de estudio.

3.2.4. Selección de la muestra

Fue un estudio no experimental de tipo transversal y el criterio de selección fue exclusivo, debido a que solo se tomarán el grupo de las cianobacterias que se encuentren en los hábitats establecidos.

3.2.5 Criterios de selección

Criterios de inclusión: Todas las cianobacterias identificadas y aisladas.

Criterio de exclusión: Todas las cianobacterias que no presentaron un crecimiento óptimo.

3.3. Procedimientos de Recolección de Datos

3.3.1. Colecta, identificación y aislamiento de cianobacterias provenientes de distintos tipos de reservorios.

a. Colecta de cianobacterias

El muestreo se realizó en el mes de noviembre, en los puntos geográficos ($3^{\circ}42'10.6''\text{S}-73^{\circ}14'53.0''\text{O}$, $3^{\circ}44'56.7''\text{S}-73^{\circ}14'30.9''\text{O}$ y $3^{\circ}46'11.9''\text{S}-73^{\circ}16'55.3''\text{O}$). La colecta se realizó en los diferentes hábitats (reservorios como charcos, agua estancada y sustratos (figura 1)). El proceso de colecta se adecuó en los distintos niveles de profundidad. Opcionalmente, la colecta se realizó empleando una red de fitoplanctónica de 20 μm . Se colectó en frascos con tapa rosca de 200 mL hasta un 90% para poder homogenizar posteriormente, los frascos estaban apropiadamente rotulados (indicando el lugar de colecta, coordenadas, fecha y hora de colecta) se colocó en recipientes refrigerados y protegidos de la luz. Se realizó anotaciones de las condiciones ambientales al momento de realizar la colecta como temperatura, nublado o despejado, presencia de viento o lluvia, color del agua. Se

registraron los valores de los parámetros fisicoquímicos (Nitrato, Nitrógeno, Hierro+, Hierro ferroso y pH) que fue realizado con equipo portátil y/o kits comerciales⁽²⁸⁾.

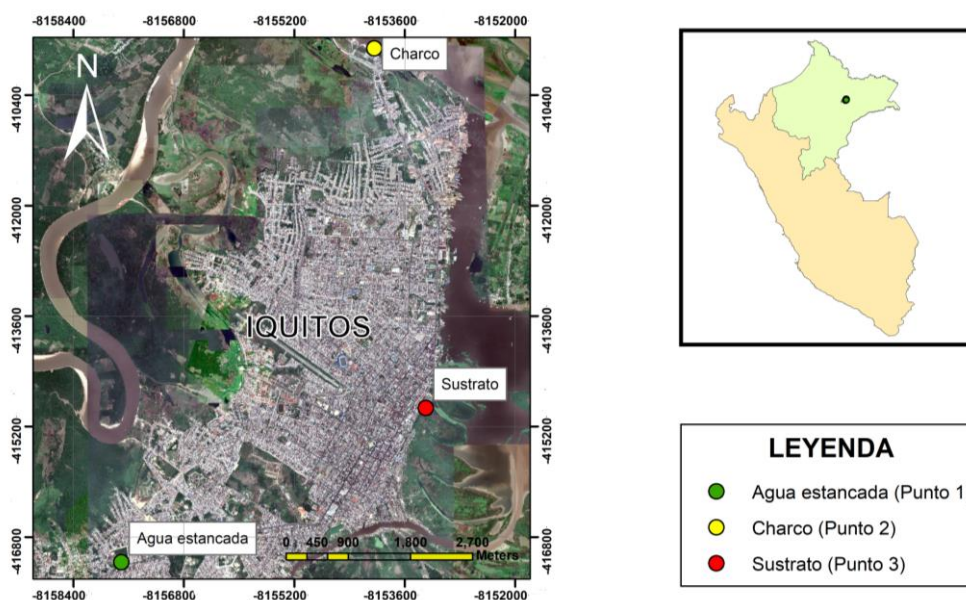


Figura 1. Puntos de colecta de muestras

El transporte de la muestra a las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú-UCP, se realizó protegidos de la luz, en los frascos correctamente identificados, se los llevo inmediatamente a las instalaciones del laboratorio. Se transfirió 500 μ L de la muestra en microtubos de 1,5 mL y se agregó 500 μ L de los medios de cultivo respectivamente BG11 y CHU N°10 con tres repeticiones cada uno.

b. Identificación de cianobacterias encontradas en cada tipo de reservorio.

Se utilizó un microscopio de luz Invertida marca Leica modelo DMi1, con el objetivo de 10X y 40X. Esto facilitó la identificación de las células, descartando los residuos y demás partículas con tamaño similar a las cianobacterias. Se identificaron mediante claves taxonómicas de cianobacterias que poseían

ilustraciones, en este caso se clasificó a nivel de orden, familia y género, adaptados al sistema propuesto por Desikachary y Komárek y Anagnostidis^(40,40–43).

C. Aislamiento de cianobacterias

Las muestras fueron previamente enriquecidas con medio CHU N°10 y BG11, suplementado con fuentes de nitrógeno. Para el aislamiento, se utilizó dos métodos; lavado celular y vaciado en placas de Petri⁽⁴⁴⁾.

El proceso de aislamiento por lavado celular, consistió en colocar con la micropipeta, una alícuota de 10 μ L de la muestra en un portaobjetos de vidrio estéril, y se colocó bajo el microscopio, donde las células de interés se “succionaron” y se traspasaron a una lámina portaobjeto que contiene una gota del medio CHU N°10 o BG 11 estéril. Este procedimiento se desarrolló de manera rápida y cuidadosa. Se realizaron al menos cinco transferencias sucesivas en gotas con medios de cultivo estéril, hasta la obtención de un solo tipo de célula deseada. Luego de la obtención de células aisladas se procedió a la transferencia en un microtubo de 1,5 mL que contendrá el medio de cultivo estéril (20-30 μ L)⁽²⁸⁾.

El aislamiento en placas con agar se realizó para purificar los cultivos, se procedió a colocar 900 μ L de muestra en tubos de 1,5 mL estériles; se realizó las diluciones en control, 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 con los respectivos medios de cultivo, se realizó por triplicado cada una de las diluciones, esterilizamos las placas con la ayuda del mechero; luego se sometió a UV en una cabina de flujo laminar por un periodo de tiempo de 45 minutos. El medio con agar (15 g por 1L) se autoclavó a 121°C por 30 minutos, y cuando la

temperatura descendió a 80 °C, se procedió a colocar 12 mL a cada una de las placas Petri dejándolos en reposo 30 minutos, se añadió 10 µL de la suspensión de las muestras, con ayuda del asa de siembra estéril se procedió a realizar la siembra por agotamiento, teniendo cuidado al no tocar los bordes de la placa Petri. Inmediatamente se cubrió con la tapa, se selló con parafilm y se rotuló^(43,44).

Las primeras colonias se observaron después de treinta días, teniendo en cuenta, las condiciones de cultivo que son: fotoperiodo de 12h luz/12h oscuridad, intensidad de luz de 100 µE. m². S⁻¹, y temperatura ambiente de 25°C. Posteriormente se observaron las colonias en el microscopio de luz Invertida marca Leica modelo DMI1, el proceso es bajo un estricto control de higiene y en un medio estéril. La actividad se realizó las veces que fueron necesario hasta asegurar el éxito del aislamiento de un solo tipo de cianobacterias. Cuando el cultivo aumentó su biomasa se transfirió en matraces de Erlenmeyer ⁽²⁸⁾.

3.3.2. Evaluación del perfil de crecimiento

Para *Nostoc* sp., la evaluación se realizó por duplicado por el método gravimétrico, el cual consistió en la diferencia de peso seco, donde se procedió a colocar 1,5 mL de la muestra a 20 tubos de vidrio con 4 mL de medio CHU N°10 que estuvieron sometidos a las mismas condiciones de 250 µE. m². S⁻¹ con 12h luz /12h oscuridad, temperatura de 25°C, con agitación constante de 180 rpm, para un óptimo crecimiento⁽²⁶⁾. La evaluación se realizó cada dos días. La biomasa fue recuperada mediante centrifugación en una centrifuga refrigerada modelo UNIVERSAL 320R (HETTICH Alemania) a 5°C por 10 min a 4500 rpm. En la determinación de los pesos de la biomasa seca

se empleó una balanza analítica modelo ABJ-NM/ABJ-N (KERN Alemania). Para la eliminación de la humedad se realizó en estufa modelo LSIS-B2V/EC 55 (ECOCELL, Alemania), a 37°C por 48 horas bajo condiciones de oscuridad, el procedimiento se repitió hasta la obtención de la fase estacionaria que fue en diez días^(16,45).

Para *Synechococcus* sp. , se colocaron por triplicado 10 mL de la muestra en 90 mL de medio obteniendo un volumen de 100 mL en matraces de 250 mL⁽⁴⁶⁾ las muestras estuvieron sometidos a las mismas condiciones de 250 µE. m². S⁻¹ con 12 luz /12 oscuridad, temperatura de 25°C y aireación constante, con agitación constante de 180 rpm, para un óptimo crecimiento⁽⁴⁷⁾. Se evaluó el crecimiento cada dos días, se extrajo 2 mL del cultivo para el peso, y se procedió a centrifugar a 5°C por 10 min a 14000 rpm y luego se descartó el sobrenadante obteniendo solamente el precipitado, La biomasa seca se obtuvo mediante secado en estufa a 37°C por 24 horas bajo condiciones de oscuridad⁽⁴⁶⁾, el procedimiento se realizó durante diez días⁽⁴⁸⁾.

El crecimiento se calculó teniendo en cuenta la diferencia de peso en los días de evaluación.

3.3.3. Contenido de Lípidos totales, Carbohidratos y Proteínas

El contenido de Lípidos totales, Carbohidratos y Proteínas se evaluó a partir de muestra fresca liofilizada, para lo cual se cosecharon los cultivos que alcanzaron un volumen de 2 L, empleando tubos falcon estériles de 15 mL a 4500 rpm por 10 minutos a 5°C.

a. Evaluación del contenido de Lípidos totales

El contenido de lípidos totales se determinó de acuerdo a Flores *et al.*,⁽⁴⁹⁾ el mismo que consistió en pesar 25 mg de biomasa liofilizada y se extrajeron los lípidos con 3 mL de la mezcla de solventes cloroformo-metanol (1:1), la extracción se realizó dos veces. Se utilizó un baño de ultrasonido Branson 2510 con hielo, a temperatura aproximada de 4°C, por 30 min para mejorar la extracción. Luego, se añadió 2,1 mL de cloruro de potasio 0,88% (w/v) al extracto. La fase orgánica fue separada y evaporada con nitrógeno gaseoso para obtener el extracto seco de lípidos. Los extractos se almacenaron en vacío y oscuridad durante 14 h y luego fueron pesados.

b. Evaluación del contenido de Proteínas totales

El contenido de Proteínas totales se determinó de acuerdo a Hartree 1972.,⁽⁵⁰⁾ el mismo que consistió en pesar 5 mg de biomasa liofilizada y se hidrolizó con 5 mL de hidróxido de sodio NaOH 0,5 N a una temperatura de 75 °C durante 60 min. Luego se tomó una alícuota de 500 µL de la solución y se adicionó 0,9 mL de reactivo A (hidróxido de sodio 0,5 N, carbonato de sodio anhidro 10 % y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 0,2 %), seguido de una incubación a 50 °C durante 10 minutos, luego se adicionó 0,1 mL de reactivo B (hidróxido de sodio 0,1 N, sulfato de cobre pentahidratado 1 % y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 2 %) y finalmente se añadió 3 mL de reactivo C (reactivo fenol según FolinCiocalteau: Agua 2:15 v/v). Las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 650 nm en el espectrofotómetro UV Varian Cary 50 Bio y se cuantificó el contenido de proteínas usando una curva de calibración con Albúmina Suero Bovino 300 µg/mL.

c. Evaluación del contenido de Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos totales se determinó de acuerdo a Dubois *et al* 1956.,⁽⁵¹⁾ el mismo que consistió en pesar 5 mg de biomasa liofilizada y se hidrolizó con 5 mL de ácido sulfúrico H₂SO₄ 1 N a una temperatura de 97 °C, 60 min. Luego se tomó una alícuota de 200 µL de la solución y se añadió 1 mL de fenol 5%, se incubó la muestra a temperatura ambiente por 1 hora y se añadió 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Después de 30 minutos se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 485 nm en un espectrofotómetro UV Varian Cary 50 Bio y se cuantificó el contenido de carbohidratos usando una curva de calibración con D-Glucosa anhidra 200 µg/mL.

3.4 Procesamiento y análisis de datos

Para determinar si existen diferencias significativas entre la cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos se utilizó t de Student. El análisis estadístico mencionado se realizó mediante el programa jamovi 2005 y fueron diseñados en el programa Excel de Microsoft office.

3.5 Aspectos éticos

Durante la ejecución de la investigación no se utilizó muestras biológicas obtenidas de animales o humanos. Sin embargo, para evitar la ocurrencia de accidentes y/o riesgos se siguieron las normas de bioseguridad establecidas para laboratorios⁽⁵²⁾.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Identificación y aislamiento de cianobacterias provenientes de distintos tipos de reservorios

Se identificaron seis (06) cianobacterias; *Oscillatoria* sp, *Anabaena* sp, *Calotix* sp, *Nostoc* sp, *Synechococcus* sp y *Fisherella* sp. De los cuales, se logró el aislamiento de dos especies; *Nostoc* sp. y *Synechococcus* sp, (Tabla 1). Se logró un mejor aislamiento de las cianobacterias mediante la técnica de sembrado en placa, por la técnica de diluciones seriadas y los medios utilizados fueron BG-11 y CHU N° 10 (Anexo 1 y 2).

Tabla 1. Taxonomía de las cianobacterias aisladas

Dominio	Filo	Clase
Bacteria	Cianobacteria	Cyanophyceae

Orden	Familia	Genero
Nostocales	Nostocaceae	<i>Nostoc</i> sp (Komarek & Anagnostidis, 1989)
Synechococcales	Synechococcaceae	<i>Synechococcus</i> sp (Nägeli, 1849)

Las dos cianobacterias, no presentaron malformaciones en su estructura morfológica, pudiéndose visualizar características representativas del género al que corresponde. El género *Nostoc* sp estudiado presentó las siguientes características morfológicas con vaina mucilaginosa firme, de color amarillo a marrón oscuro, tricomas curvados irregulares, aglomerados en las colonias. El género *Synechococcus* sp estudiado son células solitarias o en pares, de

forma ovalada, posee bordes irregulares. Y no tan larga como se menciona en la clave utilizada (Figura 2).

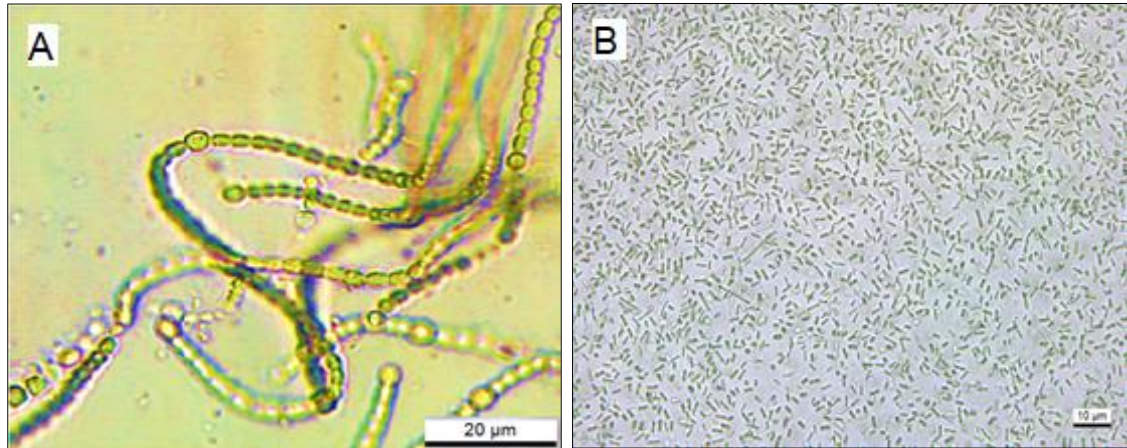


Figura 2. Cianobacterias aisladas, A: *Nostoc* sp; B: *Synechococcus* sp

Los valores obtenidos de los parámetros químicos fueron; para P1 y P3 (pH:7,5, Nitrato:1, Nitrógeno: 0,05, Hierro + :2ppm, Hierro Ferroso 0,5) y P2 (pH:6, Nitrato:2, Nitrógeno:2,4, Hierro + 0,5ppm, Hierro Ferroso 0,3)

4.2 Evaluación del perfil de crecimiento de *Nostoc* sp y *Synechococcus* sp

Para la evaluación del perfil de crecimiento se tuvo en cuenta el peso seco de la biomasa. El cultivo inició con $3,45 \mu\text{g} \pm 0,07$ (en 2mL de la muestra) de biomasa seca que corresponde al día cero, en el segundo día de evaluación se obtuvo $3,45 \mu\text{g} \pm 0,07$ (sin variación alguna), en el cuarto día se obtuvo $3,75 \mu\text{g} \pm 0,07$, en el sexto y octavo día fue donde se observó el mayor crecimiento en relación al peso seco de $4,05 \mu\text{g} \pm 0,21$ y $4,00 \mu\text{g} \pm 0,42$, y al termino de los diez días se manifestó una disminución en el crecimiento que fue de $3,75 \mu\text{g} \pm 0,21$. En el cultivo se expresó la fase de adaptación hasta el

segundo día, seguido de la fase exponencial que corresponde hasta el sexto día, luego se muestra la fase estacionaria hasta el día ocho y finalmente la disminución del crecimiento (Figura 3) (Anexo 4).

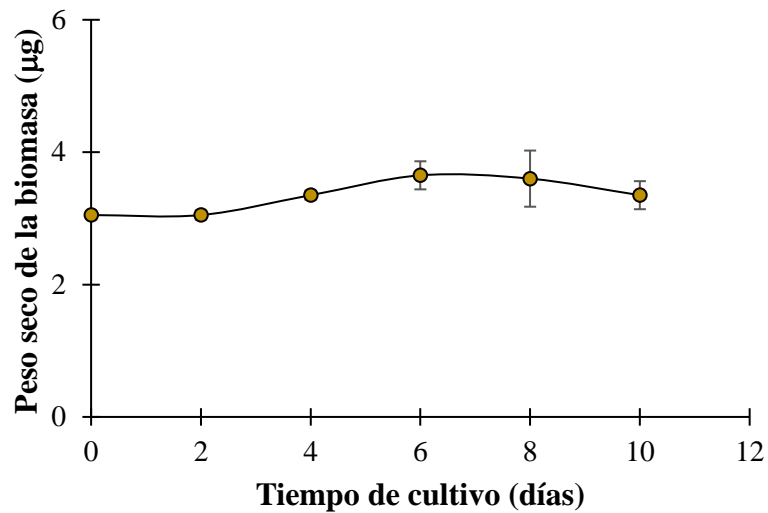


Figura 3. Perfil de crecimiento de *Nostoc* sp en 10 días de evaluación

Se inició con $0,45 \mu\text{g} \pm 1,69$ (2mL de muestra) de biomasa seca que corresponde al día cero, en el segundo día de evaluación se obtuvo $1,05 \mu\text{g} \pm 0,21$, en el cuarto día se obtuvo $3,75 \mu\text{g} \pm 0,21$, en el sexto y octavo día fue donde se observó el mayor crecimiento en relación al peso seco de $5,95 \mu\text{g} \pm 0,35$ y $9,20 \mu\text{g} \pm 0,28$, y al termino de los diez días se manifestó una disminución en el crecimiento que fue de $8,55 \mu\text{g} \pm 0,35$. En el cultivo se expresó la fase de adaptación hasta el segundo día, seguido de la fase exponencial que corresponde hasta el octavo día, y finalmente en el día diez se manifestó la fase de decaimiento celular (Figura 4)(Anexo 5).

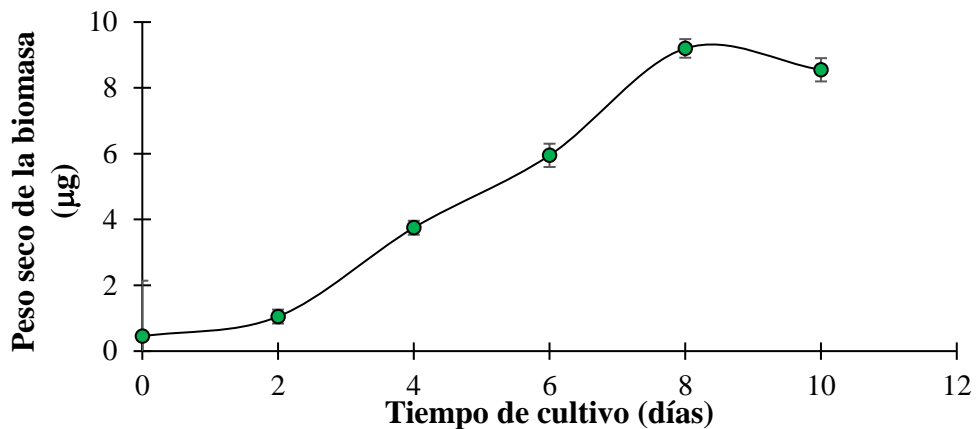


Figura 4. Perfil de crecimiento de *Synechococcus sp* en 10 días de evaluación.

4.3 Contenido de Lípidos totales, Carbohidratos y Proteínas

El contenido de lípidos totales (%) de *Nostoc sp* y *Synechococcus sp* fue de $3,43 \pm 0,34$ y $16,36 \pm 0,23$. El de carbohidratos de *Nostoc sp* y *Synechococcus sp* fue de $55,19 \pm 0,61$ y $17,48 \pm 0,28$ y el contenido de proteínas de *Nostoc sp* y *Synechococcus sp* fue $23,53 \pm 1,39$ y $57,56 \pm 1,15$. La especie *Synechococcus sp* mostró mayor contenido de lípidos totales y proteínas que *Nostoc sp*, sin embargo, el contenido de carbohidratos fue menor que de *Nostoc sp* (Ver Figura 5) y (Anexo 6).

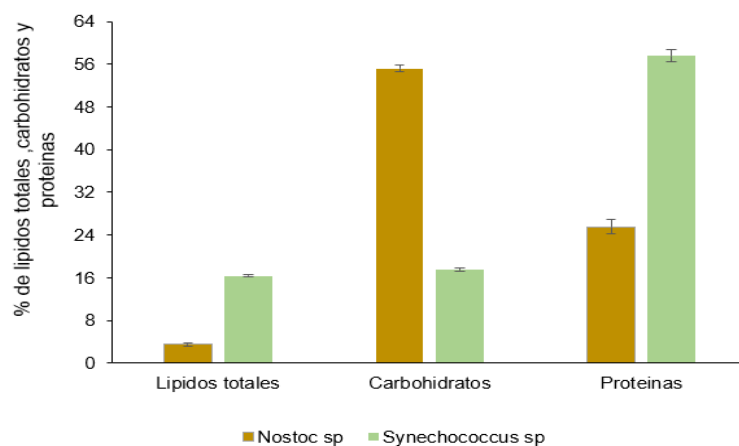


Figura 5. Contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas de *Synechococcus sp* y *Nostoc sp*.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Las cianobacterias poseen una diversidad morfológica características, pudiendo ser filamentosas o unicelulares, también crecen en diferentes ambientes (terrestres, acuáticos). A lo largo de la historia, han sido empleadas para usos en la industria. Entré los más representativos se encuentra, como suplemento alimenticio, en la extracción de compuestos químicos de interés como pigmentos fluorescentes, drogas y toxinas, y como biofertilizantes⁽¹⁰⁾. Por último, gracias a las nuevas tendencias de producción sostenible, se han convertido en organismos de interés en procesos de producción biotecnológica.

Identificación y aislamiento de cianobacterias

En el presente estudio, se colectó muestras de agua de diferentes tipos de reservorios con la finalidad de obtener células aisladas y realizar estudios bioquímicos, para la obtención de células aisladas, se seleccionó el medio BG-11 y CHU N°10 , sin embargo Allen *et al.*,⁽⁵³⁾ mencionan que el uso de medios sin fuente de nitrógeno es recomendado para el aislamiento de cianobacterias. Pero Kawaguchi *et al.*, y Jaiswal *et al.*,^(27,46) mencionan que, los medios que cumplen los requerimientos necesarios de sales minerales y apoyado en investigaciones anteriores, muestran que las cianobacterias presentan un mejor crecimiento.

Para el éxito del aislamiento de *Nostoc* sp y *Synechococcus* sp , intervinieron varios factores, por un lado las condiciones de aislamiento, mantenimiento, el medio de cultivo, es por ello que Rippka *et al.*,^(1,54) utilizó las técnicas manuales de diluciones seriadas y vaciados en placas, además Reppka *et al.*,^(2, 55)

manifestó que las técnicas empleadas en el estudio favorece el crecimiento y separación de las cianobacterias filamentosas, y el desarrollo de las unicelulares, además de ser una técnica eficiente para la eliminación de contaminantes biológicos. Por otra parte, la combinación de las técnicas de diluciones seriadas y el vaciado en placa, permitió el aislamiento y desarrollo de las cianobacterias unicelulares que presentó un desarrollo más lento ,aunque Castenholz *et al.*,⁽⁵⁵⁾ mencionan que las cianobacterias unicelulares poseen mejores valores de crecimiento. En el estudio se logró aislar cianobacterias unicelular mediante la combinación de técnicas ya mencionadas, lo cual en el estudio realizado por Solorzano *et al.*,⁽⁴⁴⁾ no se logró aislar cianobacterias unicelulares utilizando las mismas técnicas ya mencionadas. Por otra parte el uso de las claves de identificación utilizadas en el estudio, también fueron utilizados por Solorzano *et al.*,⁽⁴⁴⁾ donde lograron corroborar la identificación taxonómica hecha con base en caracteres morfológicos con análisis moleculares y bioinformáticas.

Perfil de crecimiento de *Nostoc* sp y *Synechococcus* sp

En el presente estudio se realizó el perfil de crecimiento de *Nostoc* sp., por peso seco de la biomasa, pudimos obtener un mayor crecimiento a partir del sexto y octavo día y una disminución del crecimiento al finalizar el ensayo (10 días), lo cual es casi similar al estudio realizado por Herrera *et al.*,⁽⁴⁵⁾ donde también utilizaron peso seco, y evaluaron cada dos días durante 21 días, sus resultados mostraron un crecimiento lento los primeros siete días y una fase de crecimiento exponencial entre los días 7 y 11, manteniendo un crecimiento constante durante los 21 días de evaluación. Sin embargo Addel K.,⁽⁵⁶⁾ estudiaron *Nostoc* sp., con las condiciones similares empleadas en el

presente estudio, muestra una fase de adaptación los primeros cuatro días, seguido de una fase exponencial hasta el octavo día.

El incremento de la densidad celular de *Synechococcus* sp, con medio BG-11, se ha descrito para otras cepas de esta cianobacterias, en las cuales se demostró una correlación positiva entre el crecimiento y el medio de cultivo, además del efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento Hu Q *et al.*,⁽⁵⁷⁾. En el estudio realizado por Rosales *et al.*,⁽⁴⁷⁾ donde consideraron una baja iluminación, obtuvieron mayores valores de crecimiento en el décimo día de evaluación con $3,80 \pm 0,37 \mu\text{g}$, lo cual es inferior a los resultados obtenidos en este estudio ya que se obtuvo un mayor crecimiento en el octavo día con $9,20 \pm 0,28$. Pero Jaiswal *et al.*,⁽⁴⁶⁾ evaluó por espectrofotometría, y consideraron valores altos de intensidad de $400 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y evaluaron cada dos horas por tres días , logrando obtener un crecimiento exponencial las primeras 24 horas de evaluación y la observación de la fase estacionaria, lo cual es similar a los resultados obtenidos donde se puede apreciar el crecimiento exponencial los primeros ocho días de evaluación. También estudios realizados por Rosales *et al.*,⁽⁵⁸⁾ donde evaluaron el crecimiento cada tres días por 21 días con diferentes intensidades lumínicas, mostró que tienen un mayor crecimiento con $156 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ donde obtuvieron un mayor crecimiento al noveno día ($1,49 \pm 0,11 \text{ mg mL}^{-1}$) de evaluación y una ligera disminución al décimo día, los datos estuvieron en relación con la densidad celular y el peso seco.

Contenido de Lípidos, Carbohidratos y Proteínas

En el estudio realizado *Nostoc* sp obtuvo 3,43 % de lípidos, 55,19% de carbohidratos y 23,53 % de proteínas. Asimismo estudios realizados por

Galetovic *et al.*,⁽²⁴⁾ con muestras fresca de los humedades andinos, logran obtener valores superiores en proteínas con 30,4 %, carbohidratos 61% y en menor porcentaje el contenido de lípidos con 1,7% , lo cual es superior en el estudio realizado. Ruiz *et al.*,⁽⁴⁵⁾ evaluó la cantidad de proteína y carbohidrato obtenidos con peso seco es de 16% y 50% respectivamente lo cual es inferior a los resultados obtenidos en el estudio. La cantidad de proteínas reportados por Becker *et al.*,⁽⁵⁹⁾ para *Synechococcus sp.*, *Spirulina sp.*, *Anabaena sp.*, *Cylindrica sp* y *Arthospira sp.*, fue entre el 45% y 63%, lo cual es casi similar a los resultados obtenidos para *Synechococcus sp* que fue de 57,56%, pero para *Nostoc sp* obtuvimos 23,53 %. Sin embargo los resultados obtenidos difieren a los de Gonzales *et al.*,⁽⁶⁰⁾ las especies de *Spyrogira sp.* y *Synechocystis* registraron 6% y 20% de proteína.

Investigaciones realizadas por Singh *et al.*,⁽⁶¹⁾ mencionan que existe una diferencia entre la cantidad de polisacáridos en cianobacterias filamentosas con presencia de heterocistes y cianobacterias unicelulares, lo cual se evidencia en el presente estudio realizado donde obtuvimos para *Nostoc sp* que es una cianobacteria con presencia de heterocistos (55,19%) y para *Synechococcus sp* que una cianobacteria unicelular (17,48%). Asimismo Beckern (59) reportó el contenido de carbohidratos totales para cianobacterias con y sin capacidad fijadora de nitrógeno como *Anabaena sp.* (30%) , *Spirulina sp* (14%), *Synechococcus sp* (15%) mostrando que las cepas que no poseen heterocistos *Spirulina sp* y *Synechococcus sp* presentaron menor porcentaje de carbohidratos.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- Se logró el aislamiento y la obtención de biomasa de 02 cianobacterias provenientes de diferentes tipos de reservorios, empleando los métodos de vaciado en placas y diluciones seriadas.
- El perfil de crecimiento de *Synechococcus* sp., tuvo mayor crecimiento al octavo día con $9,20 \mu\text{g} \pm 0,28$ y *Nostoc* sp., tuvo mayor crecimiento al sexto día con $4,05 \mu\text{g} \pm 0,21$. Pero ambas especies empezaron a disminuir su crecimiento al décimo día.
- Las cianobacterias aisladas presentan valores óptimos de lípidos, carbohidratos y proteínas, por lo que se les puede considerar como un potencial para futuras aplicaciones en la alimentación. Se obtuvo mayor contenido de lípidos y proteínas en *Synechococcus* sp.
- La investigación realizada contribuyo con dos especies de cianobacterias que poseen gran potencial en los diferentes procesos biotecnológicos.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Tener en cuenta el crecimiento de las células aisladas, ya que estas toman un buen tiempo para lograr adaptarlas a las condiciones de laboratorio.
- Continuar con el aislamiento de cianobacterias con la finalidad de obtener un banco de cepas, y lograr conocer sus características bioquímicas y moleculares, los cuales puedan ser utilizados con fines biotecnológicos.
- Realizar ensayos con diferentes intensidades lumínicas y con diferentes medios de cultivos que contengan o no nitrógeno.

CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Pentecost A, Whitton BA. Subaerial Cyanobacteria. En: Whitton BA, editor. Ecology of Cyanobacteria II. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 291-316. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-3855-3_10
2. Guéguen N, Maréchal E. Origin of cyanobacterial thylakoids via a non-vesicular glycolipid phase transition and their impact on the Great Oxygenation Event. *J Exp Bot.* 13 de mayo de 2022;73(9):2721-34.
3. Brayner R, Barberousse H, Hemadi M, Djedjat C, Yéprémian C, Coradin T, et al. Cyanobacteria as Bioreactors for the Synthesis of Au, Ag, Pd, and Pt Nanoparticles via an Enzyme-Mediated Route. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007;13.
4. Lengke MF, Fleet ME, Southam G. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Filamentous Cyanobacteria from a Silver(I) Nitrate Complex. :6.
5. Rajneesh, Singh SP, Pathak J, Sinha RP. Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. *Renew Sustain Energy Rev.* marzo de 2017;69:578-95.
6. Martínez MGO, Ortega JLG, Ramos CAZ. Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México. *Rev Mex Biodivers.* 2014;85.
Disponible en:
<http://www.revista.ib.unam.mx/index.php/bio/article/view/1087>

7. Ventosa A, Nieto JJ. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol.* enero de 1995;11(1):85-94.
8. Lagarde D, Beuf L, Vermaas W. Increased Production of Zeaxanthin and Other Pigments by Application of Genetic Engineering Techniques to *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Appl Environ Microbiol.* enero de 2000;66(1):64-72.
9. Jonte Gómez LD valle, Rosales-Loaiza N, Bermúdez-González JL, Morales Avendaño ED. Cultivos discontinuos alimentados con urea de la cianobacteria *Phormidium* sp. en función de la salinidad y edad del cultivo. *Rev Colomb Biotecnol.* 1 de diciembre de 2013;15(2):38.
10. Mosulishvili LM, Kirkesali EI, Belokobylsky AI, Khizanishvili AI, Frontasyeva MV, Pavlov SS, et al. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*. *J Pharm Biomed Anal.* agosto de 2002;30(1):87-97.
11. Adrián SJL, Medina RCB. La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán; 2005. (La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán). Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=F_T0BUqzVhsC
12. Wehr JD, Sheath RG, Kociolek JP, editores. *Front Matter.* En: *Freshwater Algae of North America (Second Edition).* Boston: Academic Press; 2015.

p. i-ii. (Aquatic Ecology). Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012385876409989>

8

13. Shukla D, Vankar PS, Srivastava SK. Bioremediation of hexavalent chromium by a cyanobacterial mat. *Appl Water Sci.* diciembre de 2012;2(4):245-51.
14. Hernández-Pérez A, Labbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. *Rev Biol Mar Oceanogr.* agosto de 2014;49(2):157-73.
15. Khoo HH, Sharratt PN, Das P, Balasubramanian RK, Naraharisetti PK, Shaik S. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons. *Bioresour Technol.* mayo de 2011;102(10):5800-7.
16. Delrue F, Setier PA, Sahut C, Cournac L, Roubaud A, Peltier G, et al. An economic, sustainability, and energetic model of biodiesel production from microalgae. *Bioresour Technol.* 1 de mayo de 2012;111:191-200.
17. Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out Report. 1998 jul p. NREL/TP-580-24190, 15003040. Report No.: NREL/TP-580-24190, 15003040. Disponible en: <http://www.osti.gov/servlets/purl/15003040-tW7nZs/native/>
18. Duong VT, Li Y, Nowak E, Schenk PM. Microalgae Isolation and Selection for Prospective Biodiesel Production. *Energies.* junio de 2012;5(6):1835-49.

19. Wijffels RH, Barbosa MJ. An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*. 13 de agosto de 2010;329(5993):796-9.
20. Georgianna D, Mayfield S. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*. 16 de agosto de 2012;488:329-35.
21. Larkum AWD, Ross IL, Kruse O, Hankamer B. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnol.* abril de 2012;30(4):198-205.
22. Corrales Morales M, Villalobos K, Rodríguez Rodríguez A, Muñoz Simón N, Umaña-Castro R. Identificación y caracterización molecular de cianobacterias tropicales de los géneros *Nostoc*, *Calothrix*, *Tolypothrix* y *Scytonema* (Nostocales: Nostocaceae), con posible potencial biotecnológico. *UNED Res J* . 28 de septiembre de 2017;9(2). Disponible en: <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/cuadernos/article/view/1710>
23. Rosales-Loaiza N, Díaz L, Aiello-Mazzarri C, Avendaño EM. Cultivos a cielo abierto de las cianobacterias *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* M0F015 para la producción de biomasa enriquecida. Pruebas piloto para cultivos masivos. 48(3):7.
24. Galetovic A, Araya JE, Gómez-Silva B. Composición bioquímica y toxicidad de colonias comestibles de la cianobacteria andina *Nostoc* sp. Llayta. *Rev Chil Nutr.* 2017;44(4):360-70.
25. Rodríguez Q, Vega A, Domínguez B, Verduzco C. Selección de un medio de cultivo a nivel laboratorio para el cultivo de la cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira maxima*) y cuantificación de los nutraceuticos. 2016;1:6.

26. Fuenmayor G, Jonte L, Loaiza NR, Morales E. Efecto de la salinidad y la concentración de nutrientes sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria autóctona *oscillatoria* sp. MOF-06. 2009;17(1). Disponible en:
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/9913>
27. Kawaguchi T, Decho AW. Biochemical Characterization of Cyanobacterial Extracellular Polymers (EPS) from Modern Marine Stromatolites (Bahamas). *Prep Biochem Biotechnol.* enero de 2000;30(4):321-30.
28. Marianela C, Juan C, Gabriel V. Protocolo para el aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de microalgas oleaginosas. 2016.
29. Mérida LGR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E. Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias. *Cienc Tecnol.* :11.
30. Tucci A, C.L S, Azevedo M, Malone C, Werner V, Rosini E, et al. Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. 2019.
31. Graham LE, Wilcox LW. *Algae* [Internet]. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 2000. Disponible en:
<http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/40964928.html>
32. Maria Luisa Peleato Sanches. Las cianobacterias: cooperacion versus competencia. 2011. Disponible en:
<http://www.raczar.es/webracz/ImageServlet?mod=publicaciones&subMod=discursos&archivo=PeleatoD.pdf>

33. Skulberg OM. Cyanobacteria/cyanotoxin research—Looking back for the future: The opening lecture of the 6th ICTC, Bergen, Norway. *Environ Toxicol.* junio de 2005;20(3):220-8.
34. Revival: Handbook of Microalgal Mass Culture (1986). Routledge & CRC Press. Disponible en: <https://www.routledge.com/Revival-Handbook-of-Microalgal-Mass-Culture-1986/Richmond/p/book/9781138559646>
35. Bryant, D.A. The cyanobacterial photosynthetic apparatus comparisons to those of higher plants and photosynthetic bacteria. 1986. Disponible en: <https://eurekamag.com/research/029/313/029313564.php>
36. Espinoza-Gallardo D, Contreras-Porcía L, Ehrenfeld N. β -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Rev Biol Mar Oceanogr.* abril de 2017;52(1):33-49.
37. Albert L, David M, Nelson M. Principios de Bioquímica de Lehninger | Grupo A - Principios de Bioquímica de Lehninger - Artmed. 1970. Disponible en: <https://loja.grupoa.com.br/principios-de-bioquimica-de-lehninger-8ed-p1020572>
38. Victoria Luque Guillén. Estructura y propiedades de las proteínas. Disponible en: https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf
39. Silvia Guzmán Trampe. Los Microbios y la Ecología. 2017. Disponible en: <file:///C:/Users/HP/Downloads/MicrobiosEcologia.pdf>

40. Komarek J, Anagnostidis K, Komarek, JIRI. Cyanoprokaryota 2. Teil / 2nd part: Oscillatoriales. Wiesbaden: Springer Spektrum; 2008. 759 p. (Freshwater Flora of Central Europe).
41. Komárek J, Büdel B, Gärtner G, Krienitz L, Schagerl M. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota: 3. Teil / 3rd part: Heterocytous Genera. Berlin Heidelberg; 2013. 1149 p.
42. Komárek J. Cyanoprokaryota: Teil 1 / Part 1: Chroococcales. Heidelberg; 2008. 554 p.
43. Ruiz MC, Gómez JCC, Chávez JDÁ, Bosmediano HS. identificación de microalgas oleaginosas en el área de concesión para conservación, cuenca alta del río itaya. Loreto-Perú. Cienc Amaz Iquitos. 28 de diciembre de 2012;2(2):162-8.
44. Solórzano GG. Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos. Polibotánica. 1 de enero de 2011; Disponible en: https://www.academia.edu/3412019/CARACTERIZACION_MORFOLOGICA_Y_MOLECULAR_DE_CIANOBACTERIAS_FILAMENTOSAS_AISLADAS_DE_FLORECIMIENTOS_DE_TRES_LAGOS
45. Herrera Pérez RM. Evaluación de los exopolisacáridos producidos por una cepa nativa de cianobacteria *Nostoc* sp. Como sustrato en la producción de bioetanol. 2012; Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11522>

46. Jaiswal D, Sengupta A, Sohoni S, Sengupta S, Phadnavis AG, Pakrasi HB, et al. Genome Features and Biochemical Characteristics of a Robust, Fast Growing and Naturally Transformable Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 Isolated from India. *Sci Rep.* diciembre de 2018;8(1):16632.
47. Rosales N, Jonte L, Morales E. Crecimiento y Composición Bioquímica de *Synechococcus* sp. Modulados por Nitrato de Sodio. *Bol Cent Investig Biológicas* [Internet]. 2006 [citado 29 de julio de 2022];40(2). Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/53>
48. 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. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 de marzo de 2001;51(2):513-26.
49. Flores Ramos L, Ruiz Soto A, Oscanoa Huaynate AI, Cervantes Gallegos MA. Extracción e identificación de lípidos polares de las microalgas *Nannochloropsis oceanica* y *Desmodesmus asymmetricus*. *Rev Colomb Quím.* 1 de mayo de 2020;49(2):3-11.
50. Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* Agosto de 1972;48(2):422-7.
51. DuBois Michel, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith Fred. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem.* 1 de marzo de 1956;28(3):350-6.

52. Arboleda Perdomo I. Normas de bioseguridad en el laboratorio. Biomédica. 1 de diciembre de 1988;8(3-4):78.
53. Allen MM. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. J Phycol. marzo de 1968;4(1):1-4.
54. Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria. En: Methods in Enzymology. Elsevier; 1988. p. 3-27. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687988670042>
55. Castenholz RW. Culturing methods for cyanobacteria. En: Methods in Enzymology. Elsevier; 1988. p. 68-93. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687988670066>
56. Abdel-Basset R, Friedl T, Mohr KI, Rybalka N, Martin W. High growth rate, photosynthesis rate and increased hydrogen(ases) in manganese deprived cells of a newly isolated *Nostoc*-like cyanobacterium (SAG 2306). Int J Hydrog Energy. septiembre de 2011;36(19):12200-10.
57. Hu Q, Westerhoff P, Vermaas W. Removal of Nitrate from Groundwater by Cyanobacteria: Quantitative Assessment of Factors Influencing Nitrate Uptake. Appl Environ Microbiol. enero de 2000;66(1):133-9.
58. Rosales-Loaiza N, Guevara M, Lodeiros C, Morales E. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. Rev Biol Trop. junio de 2008;56(2):421-9.

59. Becker EW. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv.* marzo de 2007;25(2):207-10.
60. González López CV, García M del CC, Fernández FGA, Bustos CS, Chisti Y, Sevilla JMF. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour Technol.* octubre de 2010;101(19):7587-91.
61. Singh S, Das S. Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide. *World J Microbiol Biotechnol.* 1 de septiembre de 2011;27(9):1971-80.

ANEXOS

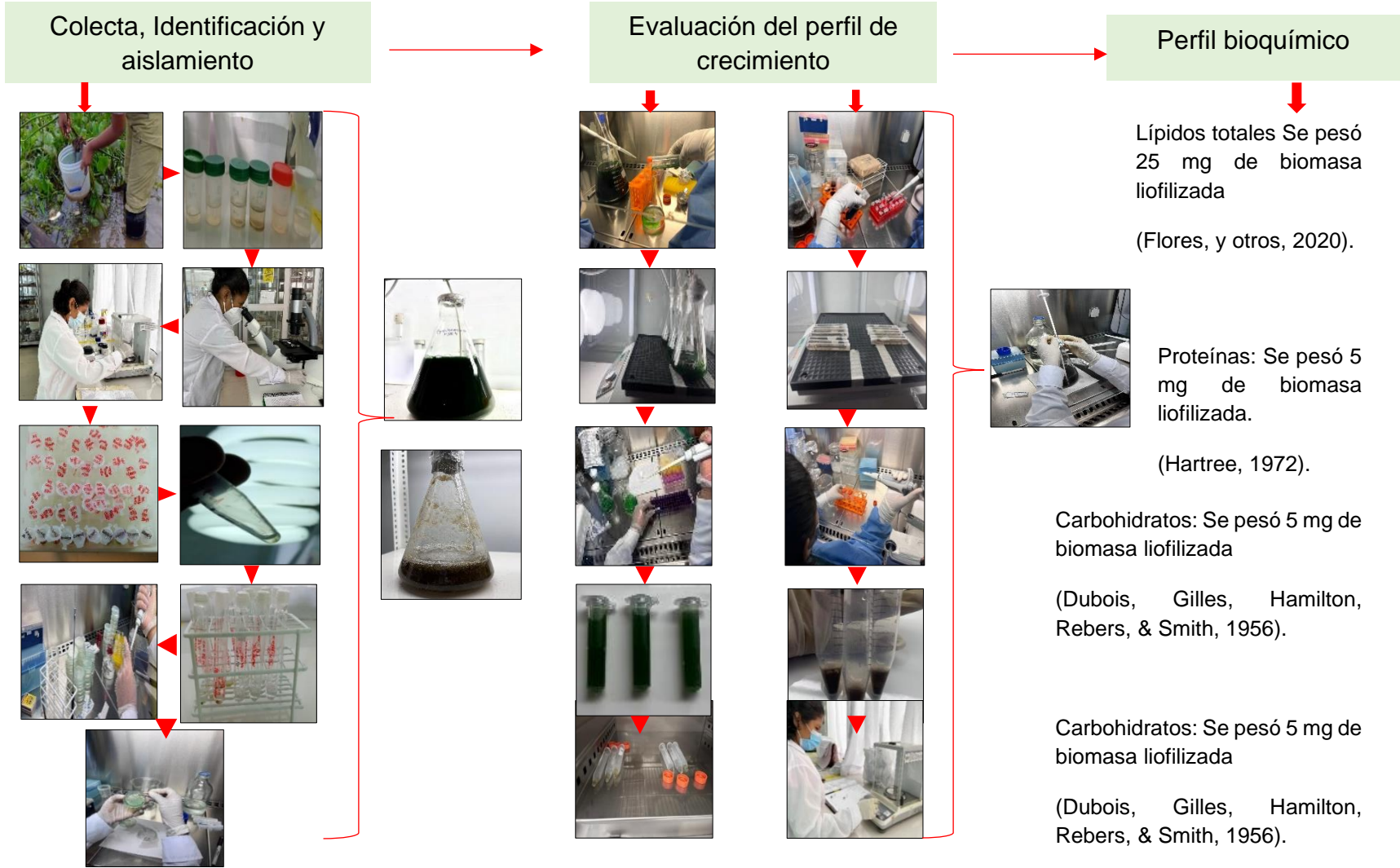
anexo 1. Composición del medio BG-11

Medio de Cultivo BG-11	
Solucion 1	Concentración g/L
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,1 g
Citrato de Amonio Férrico	0,6 g
Ácido Cítrico · 2H ₂ O	0,6 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	3,6 g
Solucion 2	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,5 g
Solucion 3	
K ₂ HPO ₄	3,05 g
Solucion 4	
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,08 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,05 g
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,39 g
Adición de compuestos para completar un litro de medio BG-11	
Soluciones	Adición por L de H ₂ O
Solución 1	10mL
Solución 2	10mL
Solución 3	10mL
Na ₂ CO ₃	0,02g
Solución 4	1mL
NaNO ₃	1,5g

anexo 2. Composición del medio CHU N°.10

Medio de Cultivo CHU N° 10	
Solución Stock	Concentración para 1000 mL
1. CaCl ₂ · 2H ₂ O	36.7 g
2. MgSO ₄ · 7H ₂ O	36,9 g
3. NaHCO ₃ + Bicarbonato de Sodio	12,6 g
4. K ₂ HPO ₄	8,7 g
5. NaNO ₃	8,5 g
6. C ₆ H ₅ FeO ₇ · H ₂ O	3,35 g
7. HCL	5mL
8. Silicato	10mL
Solución de micronutrientes	Concentración para 1000mL
9. NaEDTA	50 mg
H ₃ BO ₃	618 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	19,6mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	44mg
CaCl ₂ ·6H ₂ O	20mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	12,6mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	12,6mg

anexo 3. Flujo de los procedimientos realizados (colecta, identificación, aislamiento, perfil de crecimiento y perfil bioquímico).



anexo 4. Evaluación del perfil de crecimiento de *Nostoc sp* durante diez días.

Peso seco - <i>Nostoc sp</i>				
Dias	T1	T2	Promedio µg	DS
0	3,4	3,5	3,45	0,07
2	3,5	3,4	3,45	0,07
4	3,7	3,8	3,75	0,07
6	4,2	3,9	4,05	0,21
8	4,3	3,7	4,00	0,42
10	3,9	3,6	3,75	0,21

anexo 5. Evaluación del perfil de crecimiento de *Synechococcus sp* durante diez días.

Peso seco - <i>Synechococcus sp</i>					
Dias	T1	T2	T3	Promedio µg	DS
0	0,4	0,5	0,4	0,43	0,06
2	1,2	0,9	0,6	0,90	0,30
4	3,9	3,6	2	3,17	1,02
6	5,7	6,2	4,7	5,53	0,76
8	8,5	9	9,4	8,97	0,45
10	8,3	8,1	8,8	8,40	0,36

anexo 6. Pruebas bioquímicas realizados a *Nostoc sp* y *Synechococcus sp* y porcentaje obtenidos.

% De Pruebas Bioquímicas			DS
<i>Nostoc sp</i>	Lípidos totales	16,36	0,34
	Carbohidratos	17,48	0,61
	Proteínas	57,56	1,39
<i>Synechococcus sp</i>	Lípidos totales	3,48	0,23
	Carbohidratos	55,19	0,28
	Proteínas	25,53	1,15

anexo 7. Analisis estadístico de t-Student, en relación con las pruebas bioquímicas.

t-Student (0,05)		
	<i>Nostac sp</i>	<i>Synechococcus sp</i>
Lípidos		
media	16.36	3.48
Ds	0.34	0.23
var	0.1156	0.0529
var pondera (1 y 2)	0.08425	
Tcalc	54.33354	
Carbohidratos		
media	17.48	55.19
Ds	0.61	0.28
var	0.3721	0.0784
var pondera (1 y 2)	0.22525	
Tcalc	-97.2884	
Proteína		
media	57.56	25.53
Ds	1.39	1.15
var	1.9321	1.3225
var pondera (1 y 2)	1.6273	
Tcalc	30.74399	