



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

**INFLUENCIA DE PARÁMETROS ESTRESANTES EN LA COMPOSICIÓN  
BIOQUÍMICA DE UNA CIANOBACTERIA AISLADA EN LA PENÍNSULA DE  
SANTA ELENA.**

**PROYECTO DE TITULACIÓN**

**Previo a la obtención del Título de:**

**BIÓLOGO MARINO.**

**AUTOR**

**ARELYS LISANDRA INTRIAGO NAZARENO**

**TUTOR**

**BLGA. JANETH GALARZA TIPÁN, Ph. D**

**LA LIBERTAD – ECUADOR**

**2022**

UNIVERSIDAD ESTATAL  
PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

INFLUENCIA DE PARÁMETROS ESTRESANTES EN LA COMPOSICIÓN  
BIOQUÍMICA DE UNA CIANOBACTERIA AISLADA EN LA PENÍNSULA DE  
SANTA ELENA.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

Previo a la obtención del título de

BIÓLOGO MARINO

AUTOR:

ARELYS LISANDRA INTRIAGO NAZARENO

TUTOR:

BLGA. JANETH GALARZA TIPÁN, Ph.D.

LA LIBERTAD, ECUADOR.

2022

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad por las ideas, hechos, investigación y resultados expuestos en este trabajo de titulación pertenece exclusivamente al autor, el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



---

Arelys Lisandra Intriago Nazareno.

C.I. 0803445790

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi madre, Sra. Patricia Nazareno Bone, quien con esfuerzo y apoyo me motivó a lograr cumplir con esta meta.

A mis hermanas y hermanos por ser el pilar fundamental en mi vida.

A mi bien amada abuela, Sra. Simona Bone, por todo su amor, comprensión y consejos.

A mi hijo Cirilo Amadeus Baidal Intriago, por llenar de alegría mis días y ser la mayor fuente de motivación en mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco, en primer lugar, a Dios por brindarme el halo de vida hasta el presente y haber logrado culminar esta meta.

Mi madre por su apoyo y amor incondicional e inculcarme los valores que me constituyen como persona y profesional.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena por permitirme formar como profesional dentro de sus instalaciones.

A mi tutora Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D., al Blgo. Jimmy Villon Moreno, por su paciencia y dedicación durante todo el proceso educativo y de tesis.

Al Blgo. Douglas Vera, Blga. María Herminia Cornejo, Ph.D., y demás docentes y administrativos que me ayudaron con su apoyo y conocimiento.

A mis amigos y compañeros durante la formación profesional.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Blgo. Duque Marín Richard, M.Sc.  
Decano  
Facultad de Ciencias del Mar



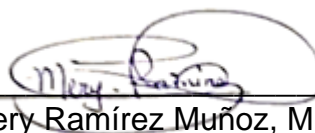
Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.  
Director  
Carrera de Biología Marina



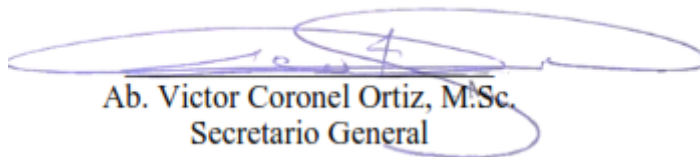
Firmado electrónicamente por:

**ISABEL JANETH  
GALARZA TIPAN**

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.  
Docente Tutor



Q.F. Mery Ramírez Muñoz, M.Sc.  
Docente del Área



Ab. Victor Coronel Ortiz, M.Sc.  
Secretario General

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	JUSTIFICACIÓN.....	5
3.	OBJETIVOS.....	8
3.1.	Objetivo General.....	8
3.2.	Objetivos Específicos .....	8
4.	HIPÓTESIS .....	9
5.	MARCO TEÓRICO .....	10
5.1.	Cianobacterias. ....	10
5.2.	Género Leptolyngbya .....	15
5.2.1.	Morfología.....	15
5.2.2.	Clasificación taxonómica. ....	17
5.2.3.	Reproducción. ....	18
5.2.4.	Hábitat y distribución.....	19
5.2.5.	Medios de cultivos para cianobacterias.....	21
5.2.6.	Cultivos a escala industrial.....	22
5.2.7.	Condiciones de estrés en cianobacterias .....	23
5.2.8.	Aplicaciones biotecnológicas de cianobacterias .....	25
5.2.9.	Composición Bioquímica.....	29
5.2.9.1.	Lípidos .....	31
5.2.9.2.	Las proteínas.....	32
5.2.9.3.	Humedad.....	33
5.2.9.4.	Cenizas.....	34
5.2.9.5.	Generación de pigmentos en cianobacterias.....	35
5.2.10.	Influencia de la irradiancia .....	35
6.	MARCO METODOLÓGICO .....	38
6.1.	Aislamiento y cultivo de cepa PM003.....	38
6.1.1.	Aislamiento de cepa PM003. ....	38
6.1.2.	Evaluación del crecimiento de cepa PM003 en dos medios de cultivo .....	40
6.1.2.1.	Crecimiento poblacional.....	44
6.1.2.2.	Tiempo de generación.....	44
6.2.	Bioensayo de estrés en la cepa PM003 para la producción de compuestos bioquímicos.....	44
6.3.	Evaluación de compuestos bioquímicos producidos por la cianobacteria PM003. ....	46
6.3.1.	Extracción y cuantificación de lípidos .....	46
6.3.2.	Extracción y cuantificación de proteínas.....	47
6.4.	Análisis estadístico .....	50
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	52

7.1.	Características morfológicas de la Cepa PM003 .....	55
7.2.	Evaluación del crecimiento de cepa PM003 en dos medios de cultivo.....	57
7.3.	Cultivo de cepa PM003 .....	59
7.3.1.	Crecimiento en tubos eppendorf Versus crecimiento en placas de agar.....	60
7.3.2.	Evaluación del cultivo y curva de crecimiento .....	61
7.3.3.	Análisis de la curva de crecimiento.....	64
7.4.	Respuesta al estrés lumínico de la Cepa PM003 .....	65
7.5.	Evaluación de compuestos bioquímicos producidos por la Cepa PM003.....	70
7.6.	Análisis estadístico .....	74
8.	CONCLUSIONES .....	76
9.	RECOMENDACIONES .....	78
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
11.	ANEXOS.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1.** METODOLOGÍA DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA ALGAL DE LA CEPA PM003. 42
- GRÁFICO 2.** SIEMBRA DE *LEPTOLYNGBYA* SP., EN MEDIO SÓLIDO Y LÍQUIDO. 54
- GRÁFICO 3.** PROCESO DE CULTIVO DE *LEPTOLYNGBYA* SP., A PARTIR DE UN CULTIVO PURO HASTA LA SIEMBRA EN MEDIO SÓLIDO. 60
- GRÁFICO 4.** PROCESO DE CULTIVO DE *LEPTOLYNGBYA* SP., A PARTIR DE PLACAS HASTA SU COSECHA. 61
- GRÁFICO 5.** CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PM003 CON MEDIO DE CULTIVO BG11 Vs. MEDIO GUILLARD F/2. 62
- GRÁFICO 6.** CARACTERÍSTICAS CON ESTRÉS VERSUS SIN ESTRÉS DE *LEPTOLYNGBYA* SP. 66
- GRÁFICO 7.** TASA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PM003 EN CONDICIONES DE ESTRÉS Y NO ESTRESADO 68
- GRÁFICO 8.** ANÁLISIS BIOQUÍMICO PROXIMAL DE BIOMASA ESTRESADA Y NO ESTRESADA. 74
- GRÁFICO 9.** INFORME DE RESULTADOS ANÁLISIS PROXIMALES DE LA CEPA PM003. EMITIDO POR FORTIDEX S.A **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

## ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA 1.** CONDICIONES DE ESTRÉS APLICADAS A LA CIANOBACTERIA PM003. 46
- TABLA 2.** PESO PROMEDIO DE LA BIOMASA DE LA CEPA PM003 CON MEDIOS DE CULTIVO GUILLARD /F2 Y BG11. 70
- TABLA 3.** ANÁLISIS BROMATOLÓGICO REALIZADO A LA CEPA PM003 72
- TABLA 4.** VALORES P OBTENIDOS EN LA PRUEBA T-STUDENT PARA MEDIAS DE DOS MUESTRAS INDEPENDIENTES. 75
- TABLA 5.** COMPOSICIÓN DE LOS ELEMENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO GUILLARD F/2 (LI & BRAND, 2007), USADO PARA EL CULTIVO DE LA CIANOBACTERIA PM003, EN AGUA DE MAR. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- TABLA 6.** COMPOSICIÓN DE LOS ELEMENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO BG-11 (SINGH ET AL., 2014) USADO PARA EL CULTIVO DE LA CIANOBACTERIA PM003, EN AGUA DE MAR. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

## **Glosario**

### **Agar:**

Polisacárido que se obtiene a partir de ciertas algas.

### **Alga:**

Vegetales macro o microscópicos, unicelulares o pluricelulares, viven en ambientes húmedos, terrestres y acuícolas.

### **Análisis proximal:**

Determinación de los porcentajes de humedad, grasa, fibra, cenizas, carbohidratos solubles y proteína en los alimentos.

### **Cenizas:**

Producto de una combustión completa formado, por sales alcalinas y térreas, sílice y óxidos metálicos.

### **Cianobacteria:**

Microorganismo fotosintético procarionte, provisto de clorofila y pigmentos que le proporcionan un color verdeazulado.

### **Estrés:**

Tensión provocada por situaciones agobiantes y que origina reacciones psicossomáticas.

### **Fosfatos:**

Abono inorgánico constituido por diversas clases de fosfatos solubles.

### **Humedad:**

Cantidad de vapor de agua presente en el aire con respecto a la máxima posible de presión y temperatura.

**Lípidos:**

Compuestos orgánicos que resultan de la esterificación de alcoholes, como la glicerina y el colesterol, con ácidos grasos.

**Lux:**

Iluminación de una superficie que recibe normal y uniformemente un flujo luminoso de 1 lumen por metro cuadrado.

**Medio Cultivo:**

Preparación artificial que contiene nutrientes y bajo condiciones favorables, permite el crecimiento de células, microorganismos, tejidos y vegetales.

**Nitratos:**

Sólido incoloro que forma cristales, soluble en agua y en alcohol, usado como oxidante, fundente de metales, producción de mezclas frigoríficas y fertilizantes.

**Nutrientes:**

Elemento químico esencial para la vida vegetal y el crecimiento de las plantas. Además del carbono, el oxígeno y el hidrógeno, procedentes del aire y del agua.

**Parámetros:**

Dato o factor que se toma como necesario para analizar o valorar una situación.

**Proteínas:**

Sustancia constitutiva de la materia viva, formada por una o varias cadenas de aminoácidos.

## Abreviaturas

<b>N</b>	Nitrógeno
<b>P</b>	Fósforo
<b>C</b>	Carbono
<b>H</b>	Horas
<b>° C</b>	Grado Celsius
<b>Sp</b>	Una sola especie sin nombre
<b>UPS</b>	Unidades prácticas de salinidad
<b>L</b>	Litros
<b>mL</b>	Mililitros
<b>M</b>	Molar
<b>Gr</b>	Gramo
<b>μ, μm</b>	Micra, milimicra
<b>TAG</b>	triacilglicéridos
<b>UV</b>	Rayo ultravioleta
<b>UVA</b>	Ultravioleta de longitud 315 a 400 nm
<b>UV-B</b>	Ultravioleta "Burn" longitud de 280 a 315 nm
<b>UVR</b>	Radiación ultravioleta
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenoico
<b>EPS</b>	Exopolisacárido
<b>FAME</b>	Éster metílico de ácido graso
<b>Nm</b>	Nanómetro
<b>klux</b>	Kilo Lux
<b>NPK</b>	Fertilizante N:15; P:15 y K:15

## RESUMEN

Las cianobacterias del género *Leptolyngbya*, son microorganismos autótrofos, formadores de biopelículas, fijadores de nitrógeno, ricas en minerales y compuestos bioquímicos interesantes para su aplicación biotecnológica. Sin embargo, para la Península de Santa Elena, no existen reportes sobre estudios taxonómicos, cultivos o componentes bioquímicos. Por lo que, este trabajo propone determinar la producción bioquímica mediante métodos analíticos de *Leptolyngbya* aislada de Palmar, Santa Elena-Ecuador, sometida a estrés. La metodología consistió en probar métodos de aislamiento y cultivos utilizando los medios Guillard F/2 y BG11, bajo condiciones controladas a 30 UPS, aireación manual frecuente, temperatura 23° C, iluminación 4200 lux, fotoperíodo 12:12 h, para estresar a 42000 lux. La producción de biomasa se evaluó por el método de Betawati-Prihantini et al., (2019). La composición de lípidos, proteínas, cenizas, humedad fueron evaluados siguiendo metodologías establecidas por diversos investigadores. Los resultados indican que el mejor método de aislamiento fue dilución seriada 1:10 y siembra en superficie por agotamiento (Alonso-Urmeneta et al. 2000). *Leptolyngbya* sp., crece en Guillard F/2, máximo crecimiento en el día 11 y produjo 200 gr de biomasa húmeda. El análisis proximal bajo condiciones normales: 1,2 mg\*gr<sup>-1</sup> lípidos; 63,6 mg\*gr<sup>-1</sup> proteínas; 89,42 mg\*gr<sup>-1</sup> humedad y 39 mg\*gr<sup>-1</sup> de cenizas. Mientras que, bajo estrés: 0,6 mg\*gr<sup>-1</sup> lípidos; 72 mg\*gr<sup>-1</sup> proteínas; 87,35 mg\*gr<sup>-1</sup> humedad y 53,6 mg\*gr<sup>-1</sup> cenizas. De acuerdo con los resultados se pudo determinar que las condiciones de cultivo promueven la producción de compuestos bioquímicos.

**Palabras claves:** *Leptolyngbya*, cultivo, estrés lumínico, análisis bioquímicos, lípidos, proteínas.

## ABSTRACT

The cyanobacteria of the genera *Leptolyngbya* are autotrophic, biofilm-forming, nitrogen fixing microorganisms, rich in minerals and biochemical compounds of interest for biotechnological application. However, for the Santa Elena Peninsula, there are no reported taxonomic studies, cultures or biochemical components. Thus, this study proposes to determine the biochemical production by analytical methods of *Leptolyngbya* isolated from Palmar, Santa Elena-Ecuador, subjected to stress. Methodology consisted of testing isolation and culture methods using Guillard F/2 and BG11 media, under controlled conditions at 30 UPS, frequent manual airing, temperature 23° C, illumination 4200 lux, photoperiod 12:12 h, to stress at 42000 lux. Biomass production was evaluated by the method of Betawati-Prihantini et al., (2019). Lipids, protein, ash, humidity composition were evaluated following methodologies established by various researchers. These results indicate that the best isolation method was 1:10 serial dilution and surface inoculation by depletion (Alonso-Urmeneta et al. 2000). *Leptolyngbya* sp. grew in Guillard F/2, maximum growth on day 11 and produced 200 g of wet biomass. Proximal analysis under normal conditions: 1.2 mg\*gr<sup>-1</sup> lipids; 63.6 mg\*gr<sup>-1</sup> protein; 89.42 mg\*gr<sup>-1</sup> moisture and 39 mg\*gr<sup>-1</sup> ash. While under stress: 0.6 mg\*gr<sup>-1</sup> lipids; 72 mg\*gr<sup>-1</sup> proteins; 87.35 mg\*gr<sup>-1</sup> humidity and 53.6 mg\*gr<sup>-1</sup> ash. According to the results it could be determined that the culture conditions promotes the production of biochemical compounds.

**Key words:** *Leptolyngbya*, culture, light stress, biochemical analysis, lipids, proteins.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son eucariotas o procariotas, autótrofos, heterótrofos o mixotróficos con capacidad de usar elementos disponibles en el medio como recurso energético; para generar compuestos complejos como pigmentos, péptidos, proteínas, carbohidratos, terpenoides, ácidos grasos, flavonoides, compuestos fenólicos, vitaminas, porfirinas, entre otros compuestos orgánicos y la síntesis de toxinas (Galarza, 2019; Llopiz, 2016). Habitan en medios acuáticos y en áreas alta humedad, de distribución cosmopolita, estos aprovechan la energía solar, nutrientes para crecer y proliferar (Moya-Serrano, 2015). Es importante destacar que de acuerdo con Daniel et al.,(2017) el término microalga incluye a dos tipos celulares: procariotas (cianobacterias) y eucariota (resto de microalgas). Resaltando la validez de uso del término microalga o cianobacteria (Tovar & Ruíz, 2016), al referirse a ambos.

Entre las cianobacterias, encontramos a la familia Leptolyngbyaceae presenta una forma celular filamentosa, segmentada, carente de membrana nuclear (Galindo-Alcázar, 2018), pertenece a un grupo heterogéneo de especies con filamentos finos (0.5 a 3.5  $\mu\text{m}$ ) (Stoyanov et al., 2016). Son conocidas por su versatilidad, debido a que se adaptan con rapidez, constituyendo un grupo diverso (Rodríguez, 2017).

De acuerdo con su morfología se dividen en 5 grupos: unicelulares con división binaria, unicelulares con fisión múltiple, filamentosas con heterocistos, filamentosas sin

heterocistos y filamentosas ramificadas. Siendo los órdenes más representativos: Chroococcales, Synechococcales, Nostocales y Oscillatoriales (Romero et al., 2017).

Las Synechococcales, son las cianobacterias filamentosas más estudiadas para la producción de metabolitos de interés, proceso que lo hace posible gracias a su estructura genética y metabolismo celular (Kim & Kang, 2016; Jovel, 2019). Por lo que su utilidad comercial, farmacéutico o alimenticio es cada vez más atraído debido a los beneficios de estos sobre la salud animal, ambiental y humana (Agudelo, 2019).

Antes de definir la utilidad de la biomasa de cianobacteria, esta debe ser sometida a un análisis bioquímico proximal para conocer sus propiedades a través de un conjunto de métodos que determinan la composición y el contenido de: humedad, proteína, lípidos, carbohidratos, cenizas entre otros, además de evaluar el contenido nutricional para ser utilizados como alimento (Moncayo, 2017). Está descrito, que, para mejorar la producción de metabolitos en cianobacterias, deben ser cultivadas en ambientes controlados en algunos casos sometidas a factores estresantes tales como: alta irradiación, deficiencia de sales (nitrato de sodio) en el medio de cultivo (Méndez, 2018; Gómez, 2018).

Está descrito que la alta irradiancia estimula a la producción de carotenoides y exopolisacáridos (Rosales-Loaiza et al., 2017). La deficiencia de sales provoca varios efectos inhibidores sobre los procesos bioenergéticos: reducción de la asimilación de N/P, síntesis de aminoácidos y proteínas, afecta la fotosíntesis y fosforilación oxidativa, se inhibe el crecimiento (Ma & Wang, 2021); además, se estimula la bioproducción de alcanos (kageyama et al., 2015).



Los medios de cultivo utilizados para cianobacterias poseen considerable concentración de sales nitrogenadas, fosfatadas, metales trazas y vitaminas que aportan los nutrientes necesarios para procesos metabólicos (Nandagopal et al., 2021; Ohkubo & Miyashita, 2017). Debido a la universalidad de sus componentes, estos medios pueden ser reproducidos en la mayor parte de laboratorios de cultivo (Tang et al., 2021). Los que mayor éxito han logrado en la productividad de cianobacterias, son: Medio Guillard F/2; WC (Chu #10 de Wright, Medio de cultivo BG-11 Singh & Kumar, 2021; Gérin et al., 2020; Peagles & Guedes, 2021).

En el Ecuador se registra la producción de cianobacterias con fines aplicativos como biofertilizante agrícola en las plantaciones de arroz en la zona litoral del país (Rigonato, 2017; Freire et al., 2016). Además, como suplemento alimenticio natural con beneficios importantes (Barahona et al., 2020). Así mismo se han experimentado adaptaciones salinas para mejorar la composición bioquímica demostrando que es posible modificar los componentes del medio de cultivo a condiciones ambientales de tal manera que favorezcan al crecimiento y a la producción de determinados metabolitos (Romero et al., 2017; López, 2019).

Las pocas investigaciones reportadas para Ecuador, nos indica que buscan mejorar los medios de cultivo para el crecimiento de cianobacterias, sin embargo, no están reportadas la composición bioquímica en cepas nativas de la Península de Santa Elena. Con estos antecedentes, y conociendo la importancia de conocer y utilizar los metabolitos producidos por cianobacterias, en este trabajo se propone determinar la producción

bioquímica proximal de una cianobacteria sometida a condiciones de estrés perteneciente a la familia Leptolyngbyaceae aislada desde la zona costera de la Península de Santa Elena, registrada con el código PM003 (proyecto INCYT-PNF-2017M3112/MAE-DNB-CM-2018-00).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las cianobacterias también llamadas algas verdeazuladas son un grupo de procariotas capaces de realizar fotosíntesis, son una fuente renovable prometedora de metabolitos secundarios bioactivos poco estudiados y explotados biotecnológica y comercialmente.

En décadas recientes estudios de identificación de cianobacterias presentes en el ambiente se han desarrollado a la par con investigaciones de la composición de las cianobacterias, estas están ampliamente distribuidas a lo largo de cuerpos de agua de todo el mundo, con ejemplares relevantes que poseen gran capacidad adaptativa que les permite sobrevivir en ambientes extremos, aunque son escasos los datos sobre algunos géneros potencialmente productores como es *Leptolyngbya* sp.

En el Ecuador, existen pocos reportes de cultivo de cianobacterias, estos se han convertido en referente para la introducción de nuevos estudios que permitan ahondar en la investigación del compendio microalgal, hasta el momento mínimamente conocido.

Las investigaciones científicas en el Ecuador han sido encaminadas a analizar población, diversidad e identificaciones taxonómicas del banco de cianobacterias ampliamente distribuidas en el país, dejando de lado estudios acerca de géneros como *Leptolyngbya* sp., ignorando el potencial biotecnológico de esta y los posibles metabolitos que produce.

Mientras que, para la Península de Santa Elena no existen cultivos ni a pequeña ni a gran escala para la producción de biomasa de cianobacterias, desconociendo la población acerca de los beneficios de este grupo de microalgas, las cuales no poseen estudios

preliminares acerca de la variedad de géneros presentes en el perfil costero peninsular, en que medios de cultivo crecen, su composición proximal, respuesta ante factores estresantes, adaptación de medios de cultivo y condiciones controladas, entre otros datos relevantes que comprenden su importancia y posible aplicación. No se conoce la composición bioquímica de esta cianobacteria ni de otras Synechococcales nativas. A pesar de presentar estudios taxonómicos de microalgas para Santa Elena estos no se enfocan en cianobacterias, por lo tanto, no se posee información preliminar ni antecedentes de su cultivo, en consecuencia, se desconocen datos cruciales de su biología.

Este déficit de información científica acerca de las cianobacterias se debe principalmente al desinterés del colectivo, laboratorios con insuficientes equipos de trabajo, elevados costos de materiales y reactivos; ergo, géneros como *Leptolyngbya* sp., no figuran como especies de potencial interés de estudio no reportan registros, se ignoran sus propiedades, funciones biológicas y posibles usos. No obstante, a pesar de las desventajas funcionales antes mencionadas que presenta el cultivo de cianobacterias, es posible desarrollar una verdadera industria enfocada en su cultivo y evaluación.

Por lo tanto, iniciar un estudio direccionado al cultivo ante determinadas condiciones de estrés ambiental, otorga un preámbulo para las futuras investigaciones a realizarse respecto a su producción a nivel industrial y en base a los diferentes fines científicos y productivos de *Leptolyngbya* sp. El hito inicial de este estudio proporcionará información sobre la composición bioquímica de *Leptolyngbya* sp., resaltando la necesidad de realizar los análisis bioquímicos de las grasas, proteínas, cenizas y carbohidratos ya que estos datos son la base para determinar el potencial uso en

aplicaciones biotecnológicas, que posteriormente la comunidad y academia podrán disponer para emprender proyectos de aplicación.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Determinar la producción bioquímica proximal mediante métodos analíticos de una cianobacteria filamentosa (cepa PM003) aislada de la Península de Santa Elena sometida a condiciones de estrés.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Experimentar el crecimiento de la cianobacteria en medio de cultivo específico para lograr la mayor biomasa microalgal.
- Establecer las condiciones de estrés que la cianobacteria requiera para la expresión de los productos bioquímicos.
- Evaluar la producción de compuestos bioquímicos en cianobacterias en condiciones normales de cultivo y en condiciones de estrés.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las condiciones de cultivo bajo estrés influyen en la producción de compuestos bioquímicos en la cianobacteria cepa PM003 favoreciendo la producción de bio-productos de interés.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Cianobacterias.

Las cianobacterias son los únicos que llevan a cabo la fotosíntesis oxigenada y presumiblemente proporcionaron la primera fuente significativa de O<sub>2</sub> en la Tierra primitiva. La evolución de la fotosíntesis oxigénica en las antiguas cianobacterias transformó la Tierra, proporcionando en última instancia las condiciones que dieron paso a formas de vida multicelulares complejas (Hamilton et al., 2018).

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos que se encuentran en la mayoría de los ambientes acuáticos (Andreeva et al., 2020), con disponibilidad lumínica y una fuente de energía; no obstante, cada cianobacteria tiene necesidades específicas para un óptimo crecimiento. Forman parte de los microorganismos más importantes en la Tierra, debido a su capacidad única de fijar el nitrógeno atmosférico y representa el 85% del flujo neto de nitrógeno en el bento, aunque la importancia de este proceso varía estacionalmente (Awasthi & Singh, 2021).

La capacidad de muchas especies para fijar N<sub>2</sub> proporciona una ventaja competitiva cuando las concentraciones de N son bajas. En las cianobacterias, esta fijación gaseosa tiene lugar dentro del heterocisto (Stal, 2017), que es una célula especializada de paredes gruesas con frecuencia con un nódulo de cianoficina, un polímero de dos aminoácidos, en uno o ambos extremos de la célula. Sin embargo, una serie de cianobacterias tienen estrategias fisiológicas que les permiten fijar N<sub>2</sub> en condiciones bien oxigenadas incluso sin un heterocisto (He et al., 2021) y esto se vuelve más generalizado en condiciones



microóxicas. Así, por ejemplo, en el Mar Báltico, donde la salinidad es mucho menor que la de los demás océanos (Olofsson et al., 2020).

La fijación de  $N_2$  ocurre principalmente en los heterocistos. Recientemente se ha descubierto que las cianobacterias son las principales fijadoras de  $N_2$  en los océanos (Bentzon-Tilia, et al. 2015).

Existen asociaciones simbióticas que incluyen cianobacterias y en la mayoría de los casos es la capacidad de la cianobacteria para fijar  $N_2$  crucial para la formación de proteínas y transferencia a especies simbiote mediante la transformación del Nitrógeno en sustancias asimilables (Bentzon-Tilia, et al. 2015). Algunas de estas asociaciones simbióticas tienen un largo historial geológico, mientras que otros dependen de la actividad nitrificante frecuente por una cepa compatible de una cianobacteria particular, como ocurre con *Nostoc* sp. (Ramanan et al. 2016).

La mayoría de las cianobacterias produce pigmentos en alta concentración: ficobilina, ficocianina, que da a las células un color azulado cuando está presente, y es responsable del nombre algas azul-verdosas; en algunos casos presentan el pigmento accesorio rojo llamado ficoeritrina. Estas cianobacterias además sintetizan clorofila a y típicamente agua que transporta los electrones durante la fotosíntesis (Dasgupta, C.N. 2015).

Las cianobacterias terrestres a menudo toleran altos niveles de irradiación ultravioleta, mientras que, muchas formas planctónicas crecen favorablemente por su capacidad para utilizar luz suficiente para la fotosíntesis de manera eficiente a bajas densidades de flujo

de fotones. Además, algunas especies toleran el sulfuro libre en niveles mucho más elevados que la mayoría de las algas eucariotas y el H<sub>2</sub>S se utiliza a veces como conductor de electrones durante la fotosíntesis (Luimstra et al., 2018).

La temperatura óptima para el crecimiento de la mayoría de las cianobacterias es varios grados más elevada que para las demás algas procariotas y eucariotas (Berg & Sutula, 2015), lo que fomenta su éxito en climas más cálidos. Mientras que, para enfrentar la desecación y el estrés hídrico, estas cianobacterias poseen tolerancia generalizada y se encuentran entre los organismos más exitosos en ambientes extremos, sobreviviendo incluso en medios hipersalinos (Singh, 2018).

Se ha reconocido desde hace tiempo que las cianobacterias en aguas dulces y suelos tienden a ser mucho más diversas y abundantes en valores de pH más altos, siendo la concentración de sales de hierro una de las causas que provoca la variación del pH. Sin embargo, hay un número considerable de registros a valores de pH más bajos que benefician su crecimiento (Xiao et al., 2021).

Las cianobacterias están compuestas, básicamente, por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y ácidos grasos. Los ácidos grasos se encuentran en las membranas, junto a otros metabolitos de reserva celular. En algunas especies y representan el 40% de su peso seco, aspecto que resulta relevante para la producción de biodiesel, actividad que requiere que las células contengan un alto contenido lipídico y que sean fácilmente cultivables. Las mejores productoras de biodiesel son las microalgas con un diámetro menor a 2 mm, ya que producen más aceite y crecen más rápido que las macroalgas (Tejeda et al., 2015).

Uno de los aspectos más intrigantes es la capacidad de algunas cepas de cianobacterias para perforar directamente el sustrato y aprovechar el carbonato de calcio presente para acelerar su metabolismo. Gracias a este aporte cálcico algunas especies forman floraciones densas que causan problemas en el agua y suelo, en contraste, los métodos adoptados para controlar las floraciones se generan estudiando la composición del sustrato sobre el que se adhieren las cianobacterias. Un ejemplo destacado de esta estrategia de aprovechamiento de carbonatos es el género, *Microcystis*, que está aumentando rápidamente en cuerpos dulceacuícolas provocando floraciones algales nocivas (FAN) (Bi & Pan, 2017).

*Microcystis* además, responde de varias maneras ante la presencia de herbívoros, que incluyen cambios en la colonia morfología y contenido de microcistina e incremento de toxinas específicas (Xiao & Reynolds, 2018). La formación de floraciones de cianobacterias en cuerpos de agua con un alto contenido de nutrientes (principalmente P y N) es una ocurrencia frecuente que afecta la calidad del agua dulce en todas las latitudes. El desarrollo de la floración es de gran importancia ya que las cianobacterias biosintetizan una gran cantidad de metabolitos secundarios, y algunos de ellos son tóxicos para otros organismos, según algunos informes, las microcistinas (MC) son las toxinas cianobacterianas más abundantes y conocidas (Janssen, 2019).

La investigación en los últimos años se ha acelerado debido a la preocupación por las FANs producidas por cianobacterias en varios países del mundo, cuyas floraciones perjudican especialmente en lagos que son la fuente de agua potable para millones de personas. Forman floraciones principalmente en la primavera en ambientes templados,

pero también pueden permanecer durante todo el verano en ambientes eutróficos. Algunas poblaciones de todas las especies formadoras de floraciones de agua dulce estudiadas contienen toxinas, y también se han reportado toxinas de muchas otras cianobacterias, incluido el género marino *Trichodesmium* (Sant'Anna et al., 2018).

Por otro lado, géneros como *Arthrospira*, no son tóxicas. Estas se cultivan y comercializan como “Espirulina”, actualmente se cultiva a gran escala para su incorporación en alimentación animal y humana (Caporgno, M., & Mathys, A. 2018).

Con la cianobacteria *Synechococcus*, se obtiene la primera evidencia convincente de quimiotaxis para ficoeritrina marina que contiene que muestran motilidad natatoria. Los comportamientos de natación, que se limitó a mar abierto aislados, mostraron una marcada respuesta quimiotáctica a compuestos nitrogenados (Springstein et al., 2020).

Estudios de la quimiotaxis en cianobacterias se ha centrado principalmente en la atracción de hormogonios a posibles socios simbióticos. Un primer informe demostró que para *Nostoc* y la planta hepática *Blasia*, existe una marcada simbiosis, dicho fenómeno se ha demostrado para una variedad de asociaciones entre ambas especies (Liaimer et al. 2016).

Según Komarek (2015), el género *Leptolyngbya*, es descrito como una cianobacteria perteneciente al reino Eubacteria, phylum Cyanobacteria, clase Cyanophyceae, orden Synechococcales, dan familia Leptolyngbyaceae que tiene las siguientes características: es un filamento delgado con un grosor de 0,5 a 3,2  $\mu\text{m}$ , generalmente puede crecer de

manera óptima a 22 °C- 40 °C , sin embargo, algunas especies que puede crecer a 70,1° C, uno de los cuales es *Leptolyngbya tentaculiformis* (Prihantini et al., 2019).

*Leptolyngbya*, se puede utilizar para la producción de biocombustibles, porque puede producir lípidos. Giddings & Newman. 2015, verificaron la producción de lípidos producida por varios tipos de microalgas, una de las cuales fue *Leptolyngbya*, en dicho estudio se informó que *Leptolyngbya* producía lípidos del 19,09% de la biomasa total (Prihantini et al., 2018).

## **5.2. Género *Leptolyngbya***

### **5.2.1. Morfología.**

Se conoce que existen aproximadamente 30 000 especies de cianobacterias y microalgas, caracterizadas taxonómicamente, de estas muy pocas han sido estudiadas química y farmacológicamente. Esta falta de información incluso es más crítica cuando se considera a especies locales (Solano, J.R., 2017).

*Leptolyngbya* es un género de cianobacteria caracterizado por ser filamentosa alargada, solitario o enrollados en racimos y esteras finas (que a veces son macroscópicas y de varios cm de diámetro), arqueadas, onduladas o intensamente enrolladas, isopolares, delgadas, finas, 0.5-3.2 µm de ancho, con simples, delgadas pero firmes, generalmente de membrana celular incolora abierta en el extremo apical y unida a los tricomas o ligeramente distantes de ellos, que envuelven solo uno, muy raramente (en secciones cortas) dos tricomas; raramente hasta muy raramente ramificación falsa (más común en condiciones especiales de cultivo), generalmente con una sola rama lateral. Tricomas

finos, cilíndricos, por lo general no atenuados en los extremos o ligeramente atenuados, con células apicales redondeadas o cónicas, sin constricción o constricción en las paredes cruzadas, no móviles.

Las especies del género *Leptolyngbya* crecen en mucílago de forma endogloeica o colonial (Wang *et al.*, 2015). Sus células son asimétricas o más largas que anchas (varias veces), cilíndricas, con contenido homogéneo, sin aerótopos, raramente con gránulos prominentes escasos, azul pálido-verde, grisáceo, verde oliva, amarillento o rojizo; células finales sin paredes celulares engrosadas o caliptras. Heterocitos mayormente basales y acinetos ausentes (Shimura *et al.*, 2015).

Es el heterocisto en este caso implicado en la detección de otras células además de fijar  $N^2$ . El primer producto de la fijación de nitrógeno en heterocistos es el amoníaco, luego se crea la glutamina y, de esta forma, se transporta a las células vegetativas circundantes (Hajská, E. 2019).

Las cianobacterias presentan diferentes formaciones parecidas a un engrosamiento distintivo al final de la célula, un tapón apical o incluso una estructura más elaborada, llamada caliptra. No está claro si el engrosamiento, tapa y caliptra son distintos o hay una continuidad entre ellos, o si tienen diferentes funciones, pero son caracteres importantes que se utilizan como criterio para distinguir especies.

La caliptra es probablemente la estructura morfológica más conocida en cianobacterias de las que poco se conoce acerca de su función. Probablemente, la caliptra está

involucrada en la detección de la luz, ubicada en el extremo de los filamentos de *Leptolyngbya* sp., de acuerdo con el estudio realizado por Raabova, et al., (2019), no obstante, es probable que la caliptra esté involucrada en la detección de cambios de factores, como los gradientes de fosfato, la presencia de otros tricomas o posiblemente una combinación de ambos. Aparte de esto, es notable la falta de información detallada, sobre estas estructuras.

Aunque los registros taxonómicos rara vez aclaran esto, la célula especializada está presente en un solo extremo de un tricoma. La frecuencia de los tricomas con una célula terminal modificada varía marcadamente entre especies, por lo que presumiblemente se ve influenciado por el medio ambiente. En particular la presencia de caliptra es cuestionable ya que la mayor parte de cianobacterias muestran solo unos pocos tricomas con esta estructura, por lo que es esencial verifique al menos 20 tricomas para identificar una muestra y aun no se ha comprobado si esta es una característica genética o simplemente una respuesta al medio ambiente (El-Gamal, 2019).

### **5.2.2. Clasificación taxonómica.**

La taxonomía de este género no es bien conocida debido a su simplicidad morfológica y a su heterogeneidad filogenética molecular (Shimura *et al.*, 2015). El género *Leptolyngbya* pertenece a los siguientes clados taxonómicos, según Guiry & Guiry (2020).

**Dominio:** Prokaryota

**Reino:** Eubacteria

**Subreino:** Negibacteria

**Phylum:** Cyanobacteria

**Clase:** Cyanophyceae

**Subclase:** Synechococcophycidae

**Orden:** Synechococcales

**Familia:** Leptolyngbyaceae

**Género:** *Leptolyngbya* Anagnostidis & Komárek, 1988

Actualmente existen 159 especies reconocidas. De los nombres de especies, 138 se han marcado como aceptados taxonómicamente sobre la base de la literatura enumerada bajo el nombre del género.

*Leptolyngbya*, proviene etimológicamente del Griego *leptos*= delicados, delgados; *lyngbya* en honor de H.C. Lyngbye, un botánico danés; además *Lyngbya* pertenece a otro género de cianobacterias (Castenholz, 2015).

### **5.2.3. Reproducción.**

Este género se reproduce de manera asexual. Las células se dividen por fisión binaria transversal simétrica (raramente asimétrica), creciendo al tamaño normal previo a una subsecuente división (Guiry & Guiry, 2020).



Se reproducen por hormogonios móviles cuando se exponen a un estrés ambiental, liberándolos en los extremos del tricoma, fragmentada sin ayuda de las células necróticas típicas, pero en ocasiones después de la muerte de las células (Orlando et al., 2021).

#### **5.2.3.1. Cinética de crecimiento de la cianobacteria.**

Los ciclos de crecimiento se describen a continuación en función a criterios de duplicación celular de acuerdo con Sánchez-Bayo et al. (2020) para obtener las tasas de crecimiento utiliza en su formulación el número de células presentes al inicio y final de cada fase de crecimiento, así como el tiempo que dura cada una de estas.

**Fase de adaptación o Lag:** Se caracteriza por no presentar incremento en el número de células e incluso disminuir el mismo respecto al inóculo inicial.

**Fase exponencial o Log:** Posterior a la fase de adaptación las células comienzan a multiplicarse, esta división da origen a nuevas células capaces de aumentar su número dividiéndose sucesivamente hasta alcanzar su pico máximo.

**Fase estacionaria:** En esta fase es evidente la falta de división celular y se mantiene constante el número de células por un determinado periodo de tiempo.

**Fase de muerte:** Las células pueden permanecer en fase estacionaria durante meses, sin embargo, llega un punto en el que empiezan a morir y precipitar.

#### **5.2.4. Hábitat y distribución**

*Leptolyngbya*, es un miembro del orden Scynechococcales, es uno de los organismos cyanoprocariontes más comunes, y se encuentran en diversos rangos de hábitats

ecológicos, que van desde ambientes desérticos, aguas termales y aguas costeras de la Antártida (Castenholz et al., 2015).

Las especies de *Leptolyngbya* sp., son muy comunes en agua dulce, ambientes marinos, suelo y epífitos de macroalgas, pudiendo incluso habitar sitios más restrictivos como fuentes termales con temperaturas tan altas como 62–63°C y manantiales minerales (Shimura, 2015).

La señalización extracelular derivada de cianobacterias moléculas y fisiología de fagos y sistemas de autoinducción, evidencia la importancia de detección de quórum en la regulación de la actividad fosfomonoesterasa de superficie por bacterias epibiónicas asociadas con las colonias de *Trichodesmium* (Frischkorn, 2018).

*Leptolyngbya* sp., es importante debido a estudios que respaldan su rol como indicador, productor de sustrato (film), producción primaria, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de compuestos tóxicos, producción de estromatolitos, excavación de sustratos calcáreos y su peculiar simbiosis con otras especies plantónicas (Pagliara et al., 2020). Los siguientes son aspectos que parecen de interés particular para determinar la distribución de *Leptolyngbya* sp., hasta hace poco, la mayoría de los estudios se enfocan en la luz, N y P. En el caso de la luz, Yamamoto et al. (2020), concluyeron que la mayoría de las respuestas ocurren sólo después de movimientos aparentemente aleatorios dan como resultado el eje largo tendido paralelo al campo de luz.

El estudio del hábitat y distribución es de gran importancia para la producción de biomasa, producción primaria, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de compuestos tóxicos, producción de estromatolitos, excavación de substratos calcáreos y simbiosis (Castenholz et al., 2015).

### **5.2.5. Medios de cultivos para cianobacterias**

El medio de cultivo es una disolución acuosa que transporta los nutrientes inorgánicos que necesitan las microalgas para su crecimiento. El suministro de medio de cultivo y las concentraciones de los nutrientes deben estar acoplado con la producción de biomasa de forma que se suministren en cantidad suficiente para que nunca se produzca una limitación que tendría como consecuencia una disminución en la productividad de biomasa.

Los medios de cultivo están compuestos principalmente por C, H, O, N, macro y micronutrientes, siendo generalistas y específicos (Singh, M., & Das, K.m 2015). Los más conocidos para el cultivo de cianobacterias son:

- BG-11: Recomendado para el cultivo de cianobacterias, debido a su alta concentración de Nitrato de Sodio 17 mM, además presenta sales de Calcio, Magnesio, Cobre, Manganeso, Zinc, Molibdeno, Borato y EDTA.
- Zarrouk: Se recomienda para especies de agua dulce, contiene  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Fosfato diamónico), EDTA Fe, y  $\text{MgSO}_4$ .
- ASN-III : Medio estimulante de crecimiento para cianobacterias, contiene:  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.02 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,

Ácido cítrico, Citrato de amonio y hierro, Na<sub>2</sub>EDTA-Mg, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sol. Metales traza.

- Medio Allen: Este es el medio para algas verdiazules, adecuado para cultivos axénicos y xénicos; la *Spirulina platensis* marina (Medio: agua de mar enriquecida con ES), su fórmula contiene: NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, Ácido Cítrico.
- SAG Schlösser: Medio recomendado para cultivo de *Arthrospira*, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, Vitamina B12.
- CHU 10: Formulado para el cultivo de algas verdeazuladas, contiene: nitrato de calcio, sulfato de magnesio, fosfato dipotásico, carbonato de sodio, silicato de sodio, cloruro de hierro.
- Guillard F/2: Este es un medio de agua de mar enriquecido generalista y ampliamente utilizado diseñado para el cultivo de algas marinas costeras, contiene: NaNO<sub>3</sub>. H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>EDTA, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O y vitaminas B1, H y B12.

### **5.2.6. Cultivos a escala industrial**

Con el fin de proporcionar crecimiento y aprovechar el potencial de las cianobacterias, se requieren fotobiorreactores eficientes. Aunque se han propuesto muchos tipos de fotobiorreactores, no existe un reactor ideal, solo unos pocos pueden utilizarse para la producción de biomasa de cianobacterias. De hecho, la elección del fotobiorreactor más adecuado depende de la situación, ya que tanto las especies de algas disponibles y el

destino final jugarán un papel importante. Uno de los principales factores que limita su aplicación práctica en cultivos de biomasa es la transferencia de masa. Por esto, entender el coeficiente de transferencia de masa en los fotobiorreactores es necesario para una operación eficiente del cultivo de biomasa en cianobacterias (Huang et al., 2017).

### **5.2.7. Condiciones de estrés en cianobacterias**

La mayor conciencia sobre los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (UV) -B ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos protectores naturales de los rayos UV-B. La producción de shinorine en *Leptolyngbya* sp., aislado de la región intermareal. Con base en las características espectrales y el análisis de espectrometría de masas de cromatografía líquida, el compuesto absorbente de UV se identificó como brillante. Hasta donde sabemos, este es el primer informe sobre la aparición de shinorine en *Leptolyngbya*.sp. El efecto de la radiación UV-B artificial y la desecación periódica sobre la producción de clorofila-a, carotenoides totales y aminoácidos similares a las micosporinas (MAA).

La radiación UV-B tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento y la concentración de clorofila, mientras que mostró un efecto inductivo sobre la producción de carotenoides totales y MAA. La desecación junto con la radiación UV-B condujo a un aumento en la concentración de compuestos fotoprotectores. Estos resultados indican que los carotenoides y los MAA facilitan que las cianobacterias eviten y se protejan de los efectos deletéreos de los rayos UV-B y la desecación (Joshi et al., 2018).

En los desiertos y en la Tierra primitiva, la radiación ultravioleta intensa (UVR, 280-400 nm de longitud de onda) puede causar diversos daños a estos organismos, como daños en las proteínas y el ADN y degradación de los pigmentos. En particular, la clorofila *a* y carotenoides, dos pigmentos principales en cianobacterias, se degradan por UVR, pero a diferentes velocidades, con carotenoides generalmente más resistentes que la clorofila *a*. Para contrarrestar estos UVR dañinos, las cianobacterias han desarrollado múltiples mecanismos de defensa.

Estos organismos utilizan pigmentos de detección de rayos ultravioleta, como los aminoácidos similares a las micosporinas y la escitonamina. Estos aminoácidos especiales son un grupo común de compuestos intracelulares transparentes que absorben UVR. La escitonemina es un pigmento marrón amarillento contenido en ciertas vainas extracelulares de cianobacterias y es capaz de absorber radiación en el rango de los UVA.

Los carotenoides, es conocida por su actividad antioxidante y puede eliminar las especies reactivas de oxígeno en entornos oxidantes y, por lo tanto, previene la peroxidación lipídica. Las cianobacterias pueden alterar sus perfiles lipídicos. Por ejemplo, se han observado cambios en los perfiles de lípidos de las comunidades microbianas en los desiertos globales. Teniendo en cuenta que las composiciones de lípidos son sensibles a otras tensiones ambientales como la temperatura, la salinidad, la contaminación por metales, la inanición y las condiciones de luz, es razonable esperar cambios en la composición de lípidos en respuesta a UVR, pero tales estudios no se han realizado. Por último, ciertas especies de cianobacterias pueden reparar el ADN dañado y / o devolver las proteínas para revertir el daño inducido por la UVR (Kugler, A., & Dong, H., 2019).

Los estudios de regulación de la asimilación de N, P y C se han realizado con cianobacterias que crecían bien en presencia de altas concentraciones de nitrato y fosfato, ya que se conoce que la mayoría de estas son capaces de limitar eficientemente la captación y asimilación de N y P siempre que se asimilen al medio natural (Dengg et al., 2022).

Según Singh & Kumar (2020) y Verma & Bhattacharjee(2015), un bajo nivel de nitrato de sodio perjudica a la célula, que no puede hacer frente a la carencia del nutriente o al recurso endógeno limitante por tiempo prolongado.

En contraste, elevadas concentraciones de nitrato retrasan el crecimiento celular de las cianobacterias, mientras que, al incrementar la concentración de fosfato se retrasa e inhibe el crecimiento. Este último nutriente es necesario en concentraciones altas únicamente en etapa inicial del cultivo. Por lo tanto, la tolerancia al fosfato es directamente proporcional a una alta sensibilidad al nitrato presente en el medio de cultivo (Yaakob et al., 2021).

#### **5.2.8. Aplicaciones biotecnológicas de cianobacterias**

Las cianobacterias proveen moléculas bioactivas, su potencial biotecnológico ha sido estudiado por su capacidad de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados tipo EPA (Eicosapentanoico) y DHA (Docohexanoico), útiles en formulación de alimentos como leches infantiles, presentando un elevado potencial para la aplicación en diversas áreas de la nutrición humana (Schipper, 2021).

La investigación de aplicaciones está limitada a la identificación de *Leptolyngbya*, no obstante, a continuación, se exponen estudios que indican su potencial. Es un excelente prospecto para uso en bioremediación de aguas con CO<sub>2</sub> y producción de biodiesel y es un posible candidato para tratar aguas residuales. Además, es un potencial productor de ficobiliproteínas (Schipper, et al., 2020).

Mugnai et al., 2018, desarrollo un estudio para estabilizar sustratos arenosos desnudos utilizando *Leptolyngbya ohadii* nativo del desierto de Néguev, para promover la formación de biocostras, este es considerado un método ecológico potencial para contrarrestar la desertificación en tierras secas. *Leptolyngbya ohadii*, pudo formar biocostras con un espesor y una estabilidad física superiores, esto dependió de la síntesis de los EPS de composición compleja durante el tiempo de incubación y la capacidad de migrar en la arena.

Kokabi *et al.*, 2019 ha determinado que mediante estrés por exposición a altos niveles de luminosidad se puede inducir la biosíntesis de carotenoides, aloficocianina, ficoeritrina y escitonemina. Para la producción de pigmentos en ambientes controlados de una cianobacteria se hace uso de factores estresores ambientales como la irradiancia (Christmas et al., 2018) y déficit de nitrato de sodio en el medio, (Silveira & Odebrecht, 2021). Siendo los pigmentos más comunes en microalgas y cianobacterias los fotoprotectores como los carotenoides: escitonemina y gloeocapsina. Gloeocapsina es un pigmento azulado protegido por una vaina de color rojo, denominado así por ser descubierto en el género *Gloeocapsa* (esférico, colonial), soluble en lípidos.



Por otra parte, Escitonemina es un pigmento amarillo-marrón llamado por encontrarse presente en las vainas del género filamentoso *Scytonema*. Ambos pigmentos se encuentran en géneros de cianofitas filamentosas. Además, los dos pigmentos se expresan cuando la luz actúa como factor estresor en cianobacteria y actúan evitando la penetración de rayos UV con longitud 100-400 nm y fotosintética de 400-700 nm (Storme et al., 2015).

Paralelamente, Schembri & Zammit (2021), aislaron cianobacterias epilíticas del género *Leptolyngbya*, de hipogeos romanos a una intensidad lumínica extremadamente baja, estas cianobacterias son rojas y tienen una mancha naranja en la punta de la célula apical. El análisis micro-espectrofotométrico de esta punta mostró un espectro centradas en 456 y 504 nm. Los experimentos sobre el deterioro de la fotorientación de estas células y el análisis microespectrofotométrico de la punta de los tricomas deteriorados mostraron que en esta estructura podría estar presente una proteína similar a la rodopsina. La mancha apical de esta *Leptolyngbya* roja se asemeja a la mancha ocular o estigma de los glóbulos lipídicos ricos en carotenoides presentes casi invariablemente en las algas flageladas fototácticas.

Zainal Abidin et al., 2020, recalca que las cianobacterias tienen una cantidad sustancial de ácidos grasos que ayudan a su supervivencia en hábitats fríos, controlan la fluidez y las funciones metabólicas. El ácido palmítico reduce la oxidación de los ácidos grasos y aumenta el gasto energético diario, reduce el peso y el contenido lipídico total, regula el nivel de insulina e induce la degeneración de las miofibrillas en ratas adultas.

El ácido oleico es un ácido graso omega-9, que ayuda a reducir la presión arterial alta. Se informó que el contenido de éster metílico de ácido graso (FAME) de *Leptolyngbya* obtenido de cultivo de microalgas es del 18,9%, que se compone principalmente de ácido palmítico y el 21,4% de ácido esteárico. Hasta la fecha, el perfil de ácidos grasos de *Leptolyngbya* sp., aún está por explorar.

Singh & Thakur, 2015, evaluaron la capacidad de una cepa de cianobacterias endolíticas *Leptolyngbya* sp, para tratar sinérgicamente las aguas residuales municipales y producir biomasa. Se cultivó en afluente de aguas residuales sin diluir en modo discontinuo y modo semicontinuo en un fotobiorreactor de placa de mármol semicontinuo para explotar la capacidad innata del endolito de desarrollar biopelículas y utilizar bicarbonato como fuente de carbono inorgánico . Produjo un 25% de lípidos que consisten principalmente en ácidos grasos saturados y monoinsaturados (> 65%). Se alcanzaron tasas máximas. Los análisis posteriores al tratamiento de las aguas residuales mostraron una notable eliminación de los principales contaminantes orgánicos y metales trazas.

La investigación de Ratnaparkhe et al., (2021) estudiaron las propiedades antimicrobianas de extractos de cloroformo de *Leptolyngbya* sp., los efectos antimicrobianos de estos extractos se evaluaron individualmente y en combinación con antibióticos contra varios microorganismos. *Leptolyngbya* tuvo actividad antimicrobiana individualmente y en sinergia con antibióticos contra bacterias *Salmonella typhi*. La mayor actividad del extracto de cloroformo fue sobre las cepas gram positivas y sus efectos sobre los hongos fueron moderados, pero tuvo un pequeño efecto contra las gram negativas.

### **5.2.9. Composición Bioquímica**

*Leptolyngbya*, se caracteriza por ser un género ampliamente distribuido, por lo que la composición bioquímica de este género depende de la especie que se estudie. De forma general, las especies en este género tienden a ser ricas en glicolípidos, proteínas y ácidos grasos cuyo fin es de protección contra depredadores y desecación (Horath & Bachofen, 2009).

*Leptolyngbya*, es considerada, además, como un suplemento alimenticio de alta calidad, debido a que contiene una fuente rica en nutrientes, proteínas, carbohidratos, hierro, vitaminas A, K, complejo B, carotenoides, xantofilas, clorofila, grasas, ácido nucleicos y lípidos además de tener cualidades inmunológicas, antioxidantes, antiviral, protector contra el cáncer, retiene metales pesados por lo que es un antitóxico, se ha demostrado que estos compuestos actúan como reguladores contra la hiperglicemia y la hiperlipidemia (Castenholz et al., 2015).

El análisis proximal o de Weende es la técnica más conocida y utilizada para la determinación de la calidad nutritiva parcial de un alimento. Debido a su longevidad, ya que fue desarrollado en 1860 y los conceptos aplicados todavía prevalecen, ya que inclusive en la actualidad son los que predominan en las opiniones sobre la composición de los alimentos y su análisis; el análisis proximal sigue constituyendo la base del análisis de alimentos con fines regulatorios alimenticios en muchos países, donde a partir de los conceptos tradicionales se han desarrollado métodos de mayor confiabilidad.

Con la exploración proximal no se identifican compuestos químicos específicos, sino que posibilita analizar en fracciones ciertas propiedades de solubilidad o insolubilidad en diferentes reactivos, los cuales podrían estar integrados por los siguientes compuestos:

- Humedad: agua y compuestos volátiles.
- Ceniza: materia inorgánica en general.
- Proteína bruta: proteínas, péptidos, aminoácidos, bases nitrogenadas, amidas, nitrógeno vitamínico.
- Extracto etéreo: grasas, ceras, resinas, lípidos complejos, pigmentos, vitaminas liposolubles.

De acuerdo al estudio realizado por Zainal-Abidin *et al.*, (2020) indica que la composición lipídica, del género *Leptolyngbya* posee Clorofila a,d y f (Gómez-Lojero *et al.*, 2018; Lopes *et al.*, 2020). Posee, seis tipos de ácidos grasos principalmente: ácido láurico, ácido esteárico, ácido heptatriacontanoico, ácido palmitoleico, ácido oleico y ácido linoleico, mismos que componen de 160 a 210 mg/gr de peso seco (kumar *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2015). En general, en esta cianobacteria las concentraciones de carbohidratos tiende a ser muy bajas, con cantidades que oscilan entre 5.35 y 6.52 µg/g de peso seco (Mugnai *et al.*, 2018). Adicionalmente, contiene vitamina C, así como trazas de saponinas, flavonoides y alcaloides (Naganthran, *et al.*, 2022).

Algunas especies de *Leptolyngbya* son productoras de geosmina y methylisoborneol (MIB), con una acumulación que oscila entre 13,6 y 22,4 y entre 12,3 y 57,5 µg/L

respectivamente (Wang et al., 2015). Mientras que, las especies termófilas, poseen alto contenido de ficoeritrinas termoestables (Galetović & Dufossé, 2020).

### **5.2.9.1. Lípidos**

Los lípidos se encuentran principalmente en forma de triacilglicéridos (TAG), que constituyen hasta el 99% de los lípidos de origen vegetal y animal (Getachew et al., 2020). Entre los diferentes grupos de cianobacterias, las especies filamentosas fijadoras de nitrógeno son particularmente atractivas para la producción de biomasa y químicos, ya que son capaces de sintetizar toda su célula utilizando energía solar, agua, aire y algunos minerales ácidos grasos en cianobacterias. A pesar de estas claras ventajas y su importancia potencial para la biotecnología, ha habido muy poca investigación aplicada realizada con cianobacterias fijadoras de nitrógeno filamentosas no heterocísticas (Tomatsu et al., 2018).

Las propiedades de los lípidos dependen de la composición de los ácidos grasos, ya que la longitud de la cadena de carbono junto con el grado de insaturación son los factores clave que influyen en las propiedades del combustible. El índice de saponificación (SV), índice de yodo (IV), índice de cetano (CN), grado de insaturación (DU), factor de saturación de cadena larga (LCSF) y el punto de obturación del filtro en frío (CFPP) son las características esenciales del biodiésel que determinan la calidad del biocombustible (Tiwari et al., 2019).

Los métodos más comunes para cuantificar lípidos Los lípidos totales se extrajeron de la biomasa de algas secas utilizando una mezcla de disolvente de cloroformo: metanol (2:

1). Se sometieron a ultrasonidos muestras de algas secas (200 mg) en 5 ml de cloroformo: metanol (2: 1) durante aproximadamente 30 segundos.

La biomasa fue luego recogida en el fondo del tubo de ensayo por centrifugación y el disolvente se retiró a un tubo previamente pesado (de preferencia color ámbar y termo resistente). La extracción de biomasa se repitió dos veces siguiendo el proceso descrito anteriormente. Las extracciones orgánicas, recogidas en un tubo de ensayo pesado, se secaron durante 12 h. Posteriormente, los tubos secos se pesaron para establecer los lípidos totales (Tiwari et al., 2019).

#### **5.2.9.2. Las proteínas**

Los métodos que se usan actualmente para la cuantificación de proteínas vegetales se basan en la utilización de distintas técnicas: colorimétricas (Folin-Lowry, Biuret), espectrofotométricas (absorción en el ultravioleta próximo o lejano), volumétricas (Kjeldalh) y turbidimétricas (precipitación con determinados reactivos). De ellos, los que presenten una mayor aceptación en cuanto a sensibilidad y sencillez son las de Folin-Lowry, absorción en el ultravioleta y Kjeldalh (Amorim et al., 2021).

El fundamento del método de Lowry está basado en el experimento Folin-Lowry, el cual posibilita la formación del complejo proteína-Cu, el cual reduce al fosfomolibdato del reactivo Folin-220, produciendo un color azul determinable colorimétricamente. Este método, utilizado desde 1951, ha sido objeto de numerosas revisiones, particularmente en lo que respecta a la estabilidad de la reacción en función del tiempo y temperatura y longitud de onda apropiada para la medida del color (Amorim et al., 2021).

### **5.2.9.3.Humedad**

Todos los alimentos contienen agua en mayor o menor proporción. El agua se encuentra en los alimentos en dos formas: agua libre y agua ligada; siendo, la primera la forma predominante y se libera con facilidad por evaporación o secado.

Los métodos de secado son comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas (Pérez & Ayala, 2019). Es preciso tener presente que:

- a) En ocasiones es difícil eliminar por secado toda la humedad presente.
- b) A cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua.
- c) Pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua.

El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa con o sin utilización complementaria de vacío, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra. Antes de utilizar este procedimiento deben estimarse las posibilidades de error y tener en cuenta una serie de precauciones:

1. Los productos con un elevado contenido en azúcares y las carnes con un contenido alto de grasa deben deshidratarse en estufa de vacío a temperaturas que no excedan de 70°C.
2. Los métodos de deshidratación en estufa son inadecuados para productos, como las especias, ricas en sustancias volátiles distintas del agua.

3. La eliminación del agua de una muestra requiere que la presión parcial de agua en la fase de vapor sea inferior a la que alcanza en la muestra; de ahí que sea necesario cierto movimiento del aire; en una estufa de aire se logra abriendo parcialmente la ventilación y en las estufas de vacío dando entrada a una lenta corriente de aire seco.
4. Muchos productos son, tras su deshidratación, bastante higroscópicos; es preciso por ello colocar la tapa de la cápsula que contiene la muestra inmediatamente después de abrir la estufa e introducirla en un desecador. Es necesario también pesar tan pronto como la muestra alcance la temperatura ambiente.
5. La reacción de cambio de color a pardo-marrón se produce por interacción entre los aminoácidos y los azúcares reductores (reacción de Maillard) libera agua durante la deshidratación y se acelera a temperaturas elevadas. Los alimentos ricos en proteínas y azúcares reductores deben, por ello, desecarse con precaución, de preferencia en una estufa de vacío a 60°C (Watson et al., 2021).

#### **5.2.9.4. Cenizas**

Las cenizas de un alimento es un término analítico que se refiere al residuo inorgánico que queda después de la calcinación de la materia orgánica; constituido principalmente por óxidos, carbonatos, fosfatos y sustancias minerales. Las cenizas normalmente no son estructuralmente las sustancias inorgánicas presentes en el alimento original debido a las pérdidas por volatilidad o a la interacción química entre los constituyentes. Es importante la determinación de este parámetro debido a que constituye un método sencillo para el control de calidad de algunos alimentos. Tanto los granos como los tubérculos poseen minerales de suma importancia en la nutrición (calcio, magnesio y hierro) (Wang et al., 2020).



#### **5.2.9.5. Generación de pigmentos en cianobacterias**

Para la producción de pigmentos en ambientes controlados de una cianobacteria se hace uso de factores estresores ambientales como la irradiancia (Chrismas et al., 2018; Hamilton et al., 2018) y déficit de nitrato de sodio en el medio, (Silveira & Odebrecht, 2021). Siendo los pigmentos más comunes en microalgas y cianobacterias los fotoprotectores como los carotenoides: escitonemina y gloeocapsina. Gloeocapsina es un pigmento azulado protegido por una vaina de color rojo, denominado así por ser descubierto en el género *Gloeocapsa* (esférico, colonial). Soluble en lípidos. Mientras que, Escitonemina es un pigmento amarillo-marrón llamado por encontrarse presente en las vainas del género filamentoso *Scytonema*.

Ambos pigmentos se encuentran en géneros de cianofitas filamentosas. Además, los dos pigmentos se expresan cuando la luz actúa como factor estresor en cianobacteria y actúan evitando la penetración de rayos UV con longitud 100-400 nm y fotosintética de 400-700 nm (Storme et al., 2015). De las cianobacterias mencionadas, *Gloeocapsa* sp., es un género esférico colonial, por el contrario, el género *Scytonema* sp., se caracteriza por ser una microalga filamentosa.

#### **5.2.10. Influencia de la irradiancia**

Este estudio de Barnett et al., (2017), se enfoca en la radiación lumínica en que las cianobacterias son capaces de realizar fotosíntesis y crecimiento celular está entre 400 y 700 nm, con una iluminancia óptima de 11 klux. Si la cantidad de luz irradiada es insuficiente, disminuirá considerablemente la velocidad de crecimiento del

microorganismo; pero si hay exposición excesiva con alta intensidad por largos periodos de luz en el medio se producirá fotoinhibición, fenómeno donde los fotosistemas del microorganismo se dañan e inactivan procesos de transporte celular.

Por otra parte, el rango de irradiancia utilizado en este estudio parece influir poco en el crecimiento de la cianobacteria, no obstante, cianobacterias de un mismo género pueden presentar diferente respuesta de crecimiento al incremento de la irradiancia e incluso pueden tolerar desde la luz solar directa hasta muy bajas irradiancias.

En este estudio también se demostró que los cultivos de cianobacterias sometidos a bajas e intermedias irradiancias producen más clorofila y ficocianina que los crecidos a elevadas intensidades luminosas. El mayor contenido de clorofila puede ser encontrado a niveles intermedios de luz, en los que los beneficios de la inversión en nueva clorofila compensan el costo de su síntesis. Sin embargo, el contenido de carotenoides no varía con la irradiancia; lo cual significa que en esta cepa de cianobacteria no se estimula la síntesis de carotenoides con el incremento de la irradiancia.

En cambio, la irradiancia sí ejerció influencia en el contenido de proteínas. El hecho de producirse el mayor contenido que podría indicar una condición óptima de irradiancia para la síntesis proteica. La velocidad de transporte de este nutriente pueda estar influida a una determinada intensidad luminosa. Probablemente, a alta irradiancia se induce una elevada tasa de asimilación de carbono total, de tal manera que la incorporación de carbono a la fracción proteica es menor con respecto a la obtenida en la fracción de polisacáridos bajo estas condiciones.

La cianobacteria *Leptolyngbya* sp., es capaz de responder satisfactoriamente a cambios de irradiancia y de concentración de nutrientes en cultivos discontinuos. Es decir, su crecimiento no es inhibido, aun a bajas concentraciones de nitrógeno, ni a irradiancias de  $238 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En *Spirulina* y *Oscillatoria* spp., se ha descrito que la incorporación relativa de proteínas a las células es inversamente proporcional al incremento de la intensidad luminosa (Harada & Hirata, 2018; Rastogi et al., 2020).

## **6. MARCO METODOLÓGICO**

Esta investigación se llevó a cabo en la Universidad Estatal Península de Santa Elena, Facultad Ciencias del Mar, en el área de microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas y Prácticas Académicas-CIBPA. Bajo el marco de los proyectos: Proyecto INCYT-PNF-2017M3112 y CUP: 91870000.0000.384095 con el Permiso del Ministerio del Ambiente MAE-DNB-CM-2018-0099.

### **6.1. Aislamiento y cultivo de cepa PM003**

#### **6.1.1. Aislamiento de cepa PM003.**

La muestra seleccionada para este trabajo corresponde a la CEPA PM003, identificada taxonómicamente como cianobacteria de la familia Leptolyngbyaceae, fue obtenida en la Península de Santa Elena, comuna Palmar en la coordenada correspondiente: Latitud: -2.03333; Longitud: -80.7333.

El proceso de aislamiento en el laboratorio inició con la siembra aplicando la técnica de dilución seriada en 10 tubos eppendorff de un inóculo de 50 uL de muestra directa del campo en 50 uL de medio de cultivo líquido Guillard F/2. Los cultivos se expusieron a iluminación constante a  $442 \mu\text{mol de fotones } *m^{-2} *s^{-1}$ , estas condiciones se mantuvieron durante cinco días hasta que se produjo el crecimiento; a esta etapa lo llamaremos pre-inóculo. Todo el cultivo se realizó por triplicado. El proceso de siembra y cosecha fue realizado bajo una cámara de flujo laminar provista de luz UV.

Los tubos que presentaron coloración verde fueron revisados bajo estereomicroscopio trinocular Boeco y analizados su morfología crecimiento y concentración. Aquellos que presentaban buenas características se los consideró como pre-inóculos viables. Los inóculos viables fueron traspasados a cajas de Petri que contenían medio sólido nutrido con Guillard F/2 (Tabla 1), siguiendo el método de siembra en superficie por agotamiento descrito por Alonso-Urmeneta *et al.* 2000. Las cajas de Petri fueron almacenadas manteniendo condiciones ambientales constantes hasta su crecimiento: temperatura 23 °C, fotoperiodo 12 horas luz y 12 oscuridad; a 30 UPS de salinidad.

Posteriormente, con la ayuda de un estereomicroscopio, se seleccionaron y aislaron las colonias de la cianobacteria de interés y sembradas en nuevas cajas de Petri con el mismo medio y condiciones de cultivo. Este proceso se repitió varias veces hasta conseguir colonias grandes y libres de contaminantes a su alrededor (bacterias, hongos u otras microalgas). Diariamente se controlaba de forma directa la evolución del crecimiento de las colonias en placas de Petri y semanal de los cultivos renovados en medio sólido hasta verificar la inocuidad en estos.

Las cajas de Petri con colonias de mayor calidad fueron seleccionadas para extraer las mejores colonias e inocular en tubos de ensayo de 10 mL (1 colonia/5mL), con el afán de renovar el cultivo y mantener células en continua división; a esta etapa lo llamamos monocultivos. Se realizó el monitoreo diario del inóculo mediante microscopía para evaluar el estado celular, morfología, viabilidad celular y color; estas revisiones de rutina se realizaron con cámara de Neubauer.

El cultivo mono-específico de la Cepa PM003 se mantuvo a una salinidad de 30 UPS en tubos de ensayo con 10 mL (8 mL de medio de cultivo + 2 mL de inóculo), protegidos con algodón, papel de reciclaje y papel aluminio colocados en una gradilla y expuestos a iluminación artificial de lámparas fluorescentes (4200 lux) y temperatura ambiente (23 °C). El medio de cultivo fue re- nutrido con 1 mL de la solución de nutrientes cada 5 días, manteniendo a disposición los compuestos necesarios para favorecer el crecimiento y división celular del cultivo.

### **6.1.2. Evaluación del crecimiento de cepa PM003 en dos medios de cultivo**

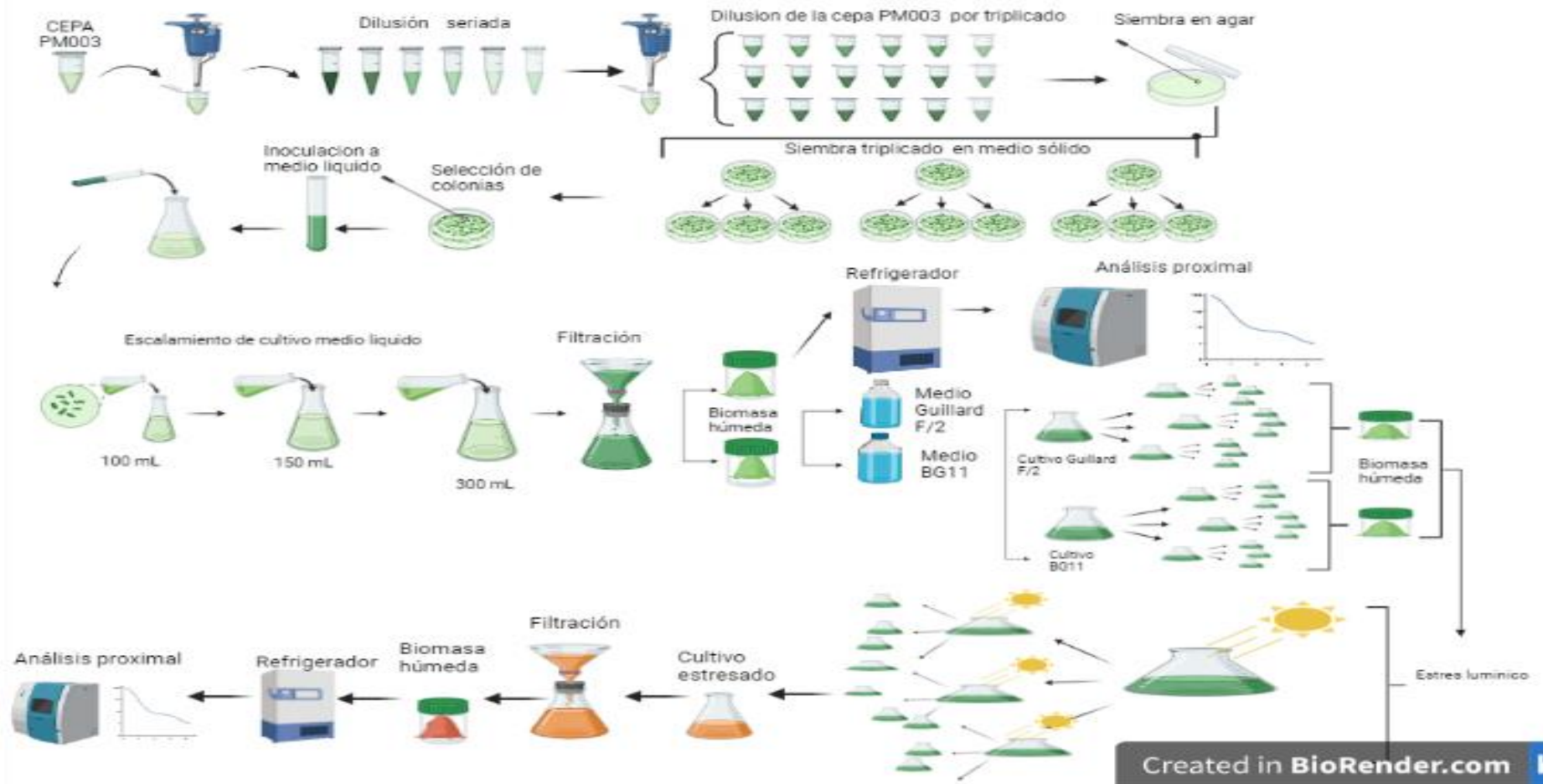
Todo el ciclo de cultivo a partir de matraces de 300 mL se mantuvo sin aireación inducida hasta la cosecha, realizando movimientos manuales tres veces al día fotoperiodo de 12:12, a 23 °C de temperatura, expuestos a una lámpara de luz artificial de luz blanca de 4200 lux, siguiendo la metodología de (Ahmed *et al.*, 2014).

Para escalar los cultivos, se partió desde los tubos de ensayo que alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, con los cuales se inocularon en concentración de biomasa húmeda a razón de  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  en matraces de 100 mL, que contenían medio de cultivo Guillard F/2 y BG11 por separado. Después de 5 días, se transfiere a matraces de 250 mL y sucesivamente se escala con una relación del 20% de inóculo y 80% de medio de cultivo hasta alcanzar 300 mL. Todos los experimentos se instalaron por triplicado y manteniendo un control de cultivo. Durante las etapas Se registró el peso diario para obtener datos que permitan demostrar en una gráfica las fases de crecimiento del cultivo en función a la biomasa. Todo el sistema de cultivo fue agitado manualmente y se cosechó parcialmente a los 15 días de cultivo mediante filtración por goteo utilizando filtros de nitrocelulosa Fisher de  $0.45 \mu$ .

Para evaluar el crecimiento de la cepa PM003 se probaron dos medios de cultivos el medio Guillard F/2 y BG11 (Anexos 1 y 2), sugeridos por Barreto-Hernández & Velasco, 2014. Bajo las condiciones recomendados por De Araujo et al., (2011), quienes se basan en la UTEX (2009), esta guía indica los siguientes parámetros a considerar en un cultivo estándar controlado: temperatura 23 °C, Salinidad de 30 UPS, pH 7-8, fotoperiodo 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Se mantuvo las condiciones propias que permitió el laboratorio.

La intensidad lumínica de 4200 lux que fue proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca *Sylvania*, aireación manual 3 veces durante el día. Los medios fueron preparados en agua salada filtrada con salinidad de 30 UPS (Tejeda et al., 2015.). En esta etapa se realizaron cultivos semi-continuos con tasas de renovación diaria del 40% con el fin de lograr una rápida obtención de biomasa, al escalar la biomasa se mantuvo la tasa de renovación.

La comparación de los medios de cultivo Guillard F/2 y BG11, consistió en evaluar el medio que más beneficia a la cianobacteria, estimula su crecimiento, produce mayor biomasa en menor tiempo y mantiene en buenas condiciones a las células durante el cultivo. Con esta prueba se determinó que el medio Guillard F/2 fue el más adecuado para nutrir a la cepa PM003.



**Gráfico 1.** Metodología de cultivo para la obtención de biomasa algal de la Cepa PM003.



El crecimiento de la cianobacteria se estimó mediante el peso de la biomasa húmeda total (sin secado de humedad) de los matraces de 300 mL, menos el peso del filtro de nitrocelulosa vacío, estos datos fueron obtenidos utilizando balanza digital CAMRY. El conjunto de datos de la biomasa microalgal obtenido mediante diferencia de pesos se tabuló en el software estadístico Excel. La biomasa obtenida fue dirigida para realizar al experimento de estrés.

La curva de crecimiento se obtuvo comparando el valor del peso de la biomasa como el eje de ordenadas Y con el tiempo de medición del peso de la biomasa como abscisa X (Betawati-Prihantini *et al.*, 2019). El control diario para determinar las curvas de crecimiento permitieron establecer la fase de adaptación (Lag), la fase exponencial (logarítmica), la fase estacionaria y la fase de muerte a través de la utilización del software Microsoft Excel (Betawati-Prihantini *et al.*, 2019). Se utilizaron los registros de peso diario para calcular el crecimiento y parámetros poblacionales de velocidad específica de crecimiento o tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de generación (T) t= tiempo de cultivo en días, para aplicar estos datos en la ecuación de crecimiento de Guillard (1973) (Vega & Lobina, 2017).

$$\mu = \frac{dx}{dt}$$

Donde x= concentración de biomasa (Cel/mL<sup>-1</sup>),

La curva permite reconocer las fases de crecimiento celular:

Fase Lag, fase de aceleramiento, fase exponencial, fase de desaceleración, fase estacionaria, fase de muerte.

### **6.1.2.1. Crecimiento poblacional**

Con los datos de las cinéticas de crecimiento obtenidos solo demuestra una variable de concentración-dependiente, por lo que su población puede ser descrita con la ecuación (Guillard, 1973):

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{T_2 - T_1}$$

Donde  $\mu$  = tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ )

X = concentración celular ( $cel/ml^{-1}$ ) en dos tiempos de la fase exponencial y/o logarítmica de crecimiento.

### **6.1.2.2. Tiempo de generación**

Se calcula para determinar el tiempo necesario para que la población se duplique, y se calcula con la siguiente ecuación:

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu} = 0.693$$

Donde  $T_g$  = tiempo de generación en días

$$\ln 2 = 0.693$$

$\mu$  = tasa de crecimiento en días

Esto permite representar una curva de crecimiento de la cianobacteria en función a su tasa de crecimiento.

## **6.2. Bioensayo de estrés en la cepa PM003 para la producción de compuestos bioquímicos.**

El experimento consistió en exponer a irradiancia solar (44200 Lux promedio referencial de exposición durante un día soleado) la biomasa re-suspendida de la Cepa PM003 en 300 mL de medio de cultivo Guillard F/2 con un fotoperiodo de 12:12 (Luz:oscuridad) (Tabla 1), ausente de un sistema de aireación, se aplicó agitación manual durante todo el período de prueba. La prueba de estrés se mantuvo hasta evidenciar un cambio de coloración en la biomasa.

La biomasa obtenida fue re-suspendida en medio de cultivo desprovisto de nitrógeno y expuestos a una fuente de luz solar, siguiendo la metodología de (Jonte et al., 2003). La intensidad de luz, sinónimo de densidad de flujo de fotones o irradiancia, está determinada por la altura del sol, que depende de la declinación terrestre y de la latitud del lugar. La irradiancia en días despejados aumenta desde un mínimo, al amanecer, hasta el máximo cuando el sol está en el cenit; de manera inversa disminuye hacia el atardecer.

Los datos ambientales para la época en que el cultivo fue sometido a estrés por luz solar fueron obtenidos del calendario solar del Ecuador del INOCAR e INHAMI.

Al finalizar el experimento, la biomasa fue cosechadas por filtración con filtro de nitrocelulosa Fisher de 0.45  $\mu$  y luego se depositaron en un envase hermético y almacenados en congelación A -20 °C para realizar los respectivos análisis bioquímicos proximales.

**Tabla 1.** Condiciones de estrés aplicadas a la cianobacteria PM003.

<b>Ensayo</b>	<b>Intensidad lumínica</b>	<b>Replicas</b>	<b>Volumen</b>	<b>Biomasa</b>	<b>Tiempo de cultivo</b>
Luz solar	44200 Lux	3	300 m L	200 g	15 días

### **6.3. Evaluación de compuestos bioquímicos producidos por la cianobacteria PM003.**

El análisis del perfil bromatológico de la cianobacteria PM003 se realizó a muestras sin experimentar estrés y a muestras estresadas a través de análisis espectrofotométricos que a continuación se detalla.

#### **6.3.1. Extracción y cuantificación de lípidos**

La concentración de lípidos se cuantificó usando el método de Chen y Vaidyanathan (Chen & Vaidyanathan, 2012). Para esto, se pesó 0,05 g de biomasa seca para luego suspenderla en 100  $\mu$ L de una solución Tris-HCl 1M a pH 8. Se adicionó a la reacción 2,4 mL reactivo saponificante (metanol al 25% más NaOH 1N) además de 0,25 g de perlas de vidrio de 0,5 mm de diametro. Para activar la reacción de lisis celular se agitó constantemente la muestra por 3 minutos en un disruptor celular Thermo Scientific™.

Se agregó 2,5 mL del saponificante para someterse a baño María a 100 °C durante 30 minutos, agitándose en el disruptor cada 5 minutos para liberar ácidos grasos. Posterior a la saponificación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Se tomó una alícuota de 3 mL de la muestra agregándose a un tubo eppendorf que contenía 4,5 mL de solvente de

extracción (cloroformo – metanol a razón 2:1) y se agitó en vórtex durante 2 minutos. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se transfirieron 2,5 mL de la fase orgánica a un nuevo tubo eppendorf que contenía reactivo Cu-TEA (Trietanolamina 1M; Ácido acético 1 N;  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  a 6,45%).

Para la cuantificación, se transfirieron 1,5 mL de la fase orgánica a una cubeta de cuarzo y se leyó la absorbancia a 260 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV.

Con la lectura, fue posible aplicar la siguiente fórmula:

$$\textit{Contenido de lipidos} (\%) = 100 \times \frac{(B - A)}{C}$$

En donde:

A: Peso del matraz limpio y seco (g)

B: Peso del matraz con grasa (g)

C: Peso de la muestra (g)

### **6.3.2. Extracción y cuantificación de proteínas**

Se inició el experimento con 5 mg de una suspensión celular concentrada (biomasa) y se agregó 2,5 mL de (NaOH) 2N. La mezcla se calentó a 40 °C con agitación durante 1 hora, a continuación, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. Después, se transfirió una alícuota de 1 mL a un nuevo tubo de ensayo que contenía 5 mL del reactivo de Lowry y se agitó vigorosamente durante 30 segundos en un vórtex para posteriormente dejar reposar por 10 minutos.

Posteriormente, se añadió 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu de fenol mientras se agitaba la muestra. La muestra se dejó reposar por 30 minutos en ausencia de luz. Luego, fue medida por espectrofotometría UV a una absorbancia de 280 nm de longitud de onda empleando como blanco agua destilada a la que se aplicó el mismo procedimiento que a las muestras procesadas.

La concentración de proteína se cuantificó siguiendo las recomendaciones de Safi *et al.* (2013) y aplicando el protocolo de medición de proteína de Lowry *et al.* (1951) modificado por Oosta *et al.* (1978).

Con base en que las proteínas pueden determinarse también por absorción en el ultravioleta próximo (280-270 nm) o lejano (220-200 nm). En este trabajo se optó por la determinación en el UV próximo y concretamente a 280 nm, es la más utilizada, ya que ciertos factores que interfieren afectan a la determinación en menor grado a esta longitud de onda.

**Cálculos:**

$$1) \text{ Porcentaje de Nitrogeno de la muestra (\%)} = \frac{A \times B}{C} \times 0.014$$

Luego;

$$2) \text{ Proteina cruda (\%)} = \text{Nitrogeno de la muestra \%} \times 6.25$$

En donde:

A: Ácido clorhídrico usado en la titulación (mL)

B: Normalidad del ácido estándar

C: Peso de la muestra (g)

El contenido de **cenizas** de la cepa PM003 se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Liu *et al.*, 2015) modificado acorde a los equipos disponibles en el laboratorio.

En un mortero previamente pesado se le adicionó biomasa húmeda y se pesó (peso mortero + biomasa húmeda)  $l$  y se registró el peso de la biomasa húmeda.

Después, se adicionó 1 gr de biomasa húmeda en el mortero. Posterior, se colocó la muestra en un horno calefactor de aire seco a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min desde la temperatura ambiente a 180 °C; se mantuvo a esa temperatura durante 2 horas. La muestra fue extraída, luego del enfriamiento del horno, y se pesó. El contenido de ceniza se obtuvo por diferencia de peso, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Cenizas} = \left( \frac{P1-P2}{\text{Muestra (gr)}} \right) \times 100\%$$

La **humedad** fue medida en base al protocolo descrito por NTE INEN (2007) (Santín-Castillo, 2013). Mediante esta guía básica, se calienta la muestra y se registra la pérdida de peso debida a la evaporación de la humedad. Siendo una de las tecnologías de análisis de humedad más utilizadas el horno de secado en combinación con una balanza.

Está fundamentado en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua y se determina mediante un método termogravimétrico, es decir, diferencia entre peso inicial húmedo versus peso final seco.

Para ello se pesó un mortero vacío y se registró el peso (A), luego se adicionó la biomasa húmeda de la cepa PM003. Se pesó y se registraron los datos del peso del mortero más el peso de la biomasa húmeda (B). A continuación, se llevó la muestra a una estufa previamente configurada a una temperatura de 105°C durante 12 horas. Se dejó enfriar la muestra y se pesó la biomasa seca (C). La biomasa perdida y el porcentaje de humedad se calcularon por diferencia de pesos aplicando la fórmula:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = 100 \times \frac{(B-A)-(C-A)}{(B-A)}$$

*En donde:*

A: Peso del mortero seco, vacío y limpio (g)

B: Peso del mortero + biomasa húmeda (g)

C: Peso del mortero + biomasa seca (g)

#### **6.4. Análisis estadístico**

Se utilizó el estadístico T-Student para medias de dos muestras independientes, con un nivel de significancia de 95.0%, para determinar si existen diferencias significativas entre el peso de las biomásas obtenidas con ambos medios de cultivos (Campos *et al.*, 2013; Castrillo *et al.*, 2013).



Los valores reportados correspondientes a los valores obtenidos del análisis proximal fueron tratados con T student y graficado en Excel, adicionalmente se registró usando grafica de Excel el efecto de la irradiancia solar sobre la productividad de la biomasa y finalmente comparación entre los resultados del análisis bioquímico proximal estresado vs., no estresado.

Se realizó una prueba T-Student para medias de dos muestras independientes con el fin de evaluar si existen diferencias en la biomasa obtenida de ambos medios de cultivo, con un intervalo de confianza de 95% y un valor de  $p < 0,05$  utilizando el software Minitab 19.2.0 (Nascimento-Mata et al., 2020).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio se logró el aislamiento, purificación y cultivo de la Cepa PM003 (Gráfico 2) usando como método de aislamiento, la dilución seriada de la muestra proveniente del medio natural; esta técnica que consiste en tomar a partir de una solución madre, una alícuota y diluirla las veces que sea necesario hasta obtener una baja concentración de soluto. Generalmente se fracciona en números pares y sus múltiplos.

Este método es utilizado por investigadores que buscan aislar células cuya concentración original es excesivamente densa, entre los que figuran Hernández & Barreto (2014). Ellos aplican esta técnica para el aislamiento de especies bentónicas del Caribe colombiano. Lograron aislar *Cylindrotheca closterium*, *Komvophoron crassum* y *Tetraselmis* sp. Con estos resultados lograron iniciar un cepario de microalgas bentónicas del Caribe colombiano, así como determinar las temperaturas más apropiadas para el aislamiento microalgal (20 °C) y para la producción de células de Bacillariaceae morfotipo 1.

Por otro lado, Janssen (2002) Las esteras entrelazadas de cianobacterias (verdeazuladas) se aislaron usando micropipetas, se diluyeron en serie y se incubaron en placas de 96 pocillos a 30 ° C bajo 12 h de luz: ciclos de 12 h de oscuridad a 100 mol\* m<sup>-2</sup> \*s<sup>-1</sup> fotones en medio SOT o BG11 (Allen 1968). A continuación, las colonias individuales se subcultivaron repetidamente hasta que se obtuvo un aislado puro. En este experimento hubo crecimiento de todas las zonas de donde se tomó la muestra para sembrar en las cajas de Petri.

Ambos estudios refuerzan el criterio con el que se eligió esta técnica, habiendo obtenido excelentes resultados en el aislamiento de la Cepa PM003 a partir del medio natural hasta obtener el cultivo puro. Con respecto al número de replicas y volúmenes utilizados para realizar las diluciones, varían de acuerdo con el volumen madre y el número de réplicas deseadas. En nuestro caso optamos por diluir 1:10 y fraccionarlo en 10 tubos sucesivamente resultó exitoso.

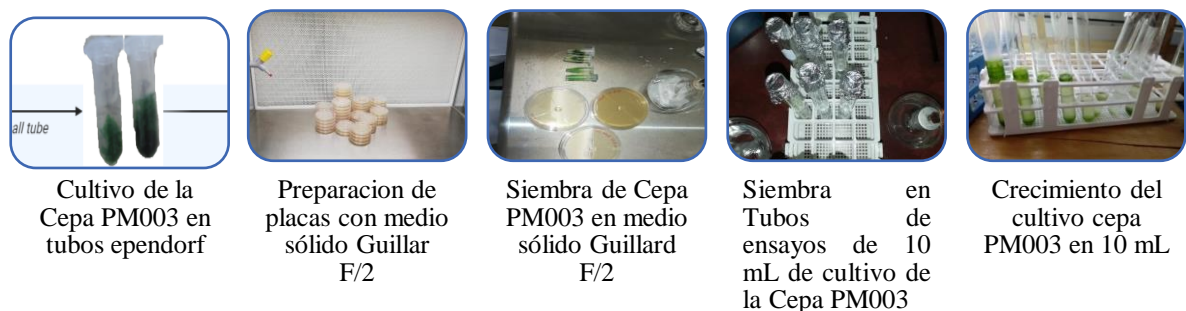
A continuación, se aplicó el método de siembra en superficie por agotamiento descrito en el protocolo de purificación de Alonso-Urmeneta *et al.* 2000, el cual, indica que se debe colocar 1 mL de cultivo y esparcirlo homogéneamente sobre la superficie del agar nutrido. Se mantuvieron condiciones constantes de cultivo con de medio Guillard F/2 con los componentes y cantidades descritos en el Anexo 1, a 23 °C de temperatura (Gráfico 4), iluminación artificial y agitación manual diaria. Alonso-Urmeneta *et al.*, 2000 logran purificar cultivos microbiológicos y establecer un protocolo de bajo costo para preparar medios y condiciones de cultivo, además de la selección de técnicas de siembra en agares. Basado en esto se procedió a realizar la siembra en Agar de la Cepa PM003.

En el experimento realizado por Kim *et al.*, 2015 con *Leptolyngbya* KIOST-1, se mencionan numerosas características ventajosas para la producción de biomasa, similares a *Arthrospira* sp. *Leptolyngbya* KIOST-1 se aisló y propagó fácilmente en medio SOT (ATCC Medio, 1679), con una productividad de biomasa eficiente, su crecimiento óptimo fue a 30 °C bajo condiciones alcalinas (pH 9) y salinas; en contraste, los medios de cultivo SOT, Guillard F/2 y BG11 varían en la concentración de sus compuestos, siendo el más notorio cambio en las soluciones del medio SOT que es más enriquecido que sus homólogos generalistas probados en el cultivo de la Cepa PM003. No obstante, los tres

medios de cultivo pudieran ser usados se forma escalar conjunta para comprobar su eficiencia en el crecimiento de *Leptolyngbya*. En cuanto a las condiciones alcalinas y salinas, en ambos casos se comprueba que son propicias para la proliferación de la cianaobacteria y la formación del biofilm o esterilla de *Leptolyngbya*.

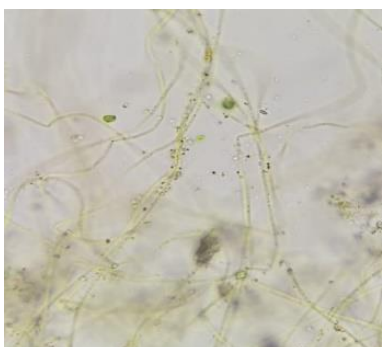
Mientras que, en la investigación de Orlando et al., 2021, el género *Leptolyngbya* con el código de cepa Hot Spring (HS) -16 es el microorganismo utilizado. Esta cepa autóctona fue aislada de Red Crater, Pancar Mountain, misma que fue aislada exitosamente por Prihantini en 2015. *Leptolyngbya* HS-16 se puede cultivar en medio fertilizante NPK de 80 ppm y produce un contenido de lípidos del 45%. Aunque esta prueba fue hecha con *Leptolyngbya*, los componentes del medio de cultivo inciden en los resultados obtenidos que en este caso presenta una elevada concentración lipídica a diferencia de los resultados obtenidos en este estudio que no alcanza tales cantidades.

La cepa aislada (Gráfico 2) pertenece a la división Cyanophyta, se identificó hasta el nivel de género a *Leptolyngbya* sp. (Figura 1 y 2), y se depositó en la Colección de Microalgas marinas de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, en el área de microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas y Prácticas Académicas-CIBPA.



**Gráfico 2.** Siembra de *Leptolyngbya* sp., en medio sólido y líquido.

## 7.1. Características morfológicas de la Cepa PM003



*Leptolyngbya* sp., presenta características macroscópicas y microscópicas bien definidas que permiten diferenciarla de otros géneros pertenecientes a las Synechococcales, entre las que se incluyen:

Figura 1. Muestra extraída del medio natural, contiene a la Cepa PM003 y otras microalgas. **Fuente:** El autor, 2020.

Forma filamentosa; en colonia presenta filamentos largos, solitarios, enrollados, en racimos o esteras finas (biofilm); estas suelen estar arqueadas, onduladas o intensamente enrolladas, isopolares, delgadas, finas entre 0,5 y 3,2  $\mu$  de ancho. Con vainas facultativas simples e incoloras, delgadas y firmes, según lo describen Guiry & Guiry, 2020; Albertano & Kovacik, 1994).

Por el contrario, Mai et al., 2018, expone que las especies pertenecientes al género *Leptolyngbya* corresponden a Pseudoanabaenaceae, Oscillatoriales y se caracterizan por tricomas cilíndricos de hasta 3  $\mu$ m de ancho. Aunque, recalca que existen numerosos criterios basados principalmente en la morfología y ultraestructura de los tricomas se utilizan como características diacríticas del delimitado género. Sin embargo, algunas cepas pertenecientes a especies de *Leptolyngbya* poseen caracteres que no están completamente de acuerdo con el diagnóstico genérico.

Con el fin de proporcionar una delimitación más satisfactoria del género, los autores analizaron los datos de la literatura y se estudiaron varias cepas de *Leptolyngbya* mediante

microscopios de luz y electrónicos, confirmando que en efecto las muestras pertenecen al género *Leptolyngbya* (Mai et al., 2018).

Los tricomas son finos, cilíndricos, no atenuados o ligeramente atenuados en los extremos, con células apicales redondeadas o cónicas, no constreñidos e inmóviles.

Las células son isodiamétricas, cilíndricas, de color: azul verdoso pálido, grisáceo, verde oliva, amarillento o rojizo. Presenta células terminales sin caliptras. Poca presencia de heterocitos y acinetos. Se dividen por fisión binaria transversal simétrica, las células crecen hasta alcanzar el tamaño original antes volver a dividirse. La reproducción es facilitada por hormogonias móviles, Liberadas en los extremos de los tricomas, fragmentadas.

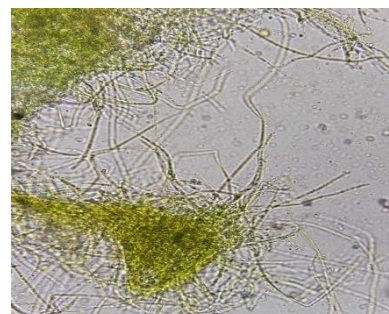
En efecto, *Leptolyngbya* puede reproducirse formando Hormogonia (células vegetativas), son filamentos cortos derivados de filamentos rotos largos y funcionan como células reproductoras asexuales. Esto según lo plasmado en el estudio de Orlando et al., 2021.

Taxonómicamente, el género *Leptolyngbya* pertenece a los siguientes clados taxonómicos, según Guiry & Guiry (2020) Albertano & Kovacic (1994).

**Dominio:** Prokaryota

**Reino:** Eubacteria

**Subreino:** Negibacteria



**Phylum:** Cyanobacteria

**Clase:** Cyanophyceae

**Subclase:** Synechococcophycidae

**Orden:** Synechococcales

**Familia:** Leptolyngbyaceae

**Género:** *Leptolyngbya* (Anagnostidis & Komárek, 1988)

Figura 2. *Leptolyngbya* sp.,  
aislada por difusión seriada.

**Fuente:** El autor,2020.

## 7.2. Evaluación del crecimiento de cepa PM003 en dos medios de cultivo

La prueba de los medios de cultivo demostró que el Guillard F/2 es más eficiente para en comparación con BG11, que fue más eficaz. Sin embargo, otros autores probaron medios de cultivo distintos para la misma cianobacteria filamentosa, citando el estudio de Kim et al., 2015, *Leptolyngbya* aislada se propagó bien en medios SOT y BG-11, y su crecimiento fue más prominente en el medio líquido en comparación con los de placas de agar. Las tasas de crecimiento óptimas del aislado en los medios BG 11 y SOT se lograron a 30° C bajo 12 h de luz: ciclos de 12 h de oscuridad a  $100 \mu\text{mol de fotones } 442 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . En estas condiciones, las esteras verdeazuladas enredadas se asentaron en el fondo del matraz de cultivo sin adherencia.

El medio utilizado en el estudio para el crecimiento de *Leptolyngbya* HS-16 fueron BG-11 y el medio NPK (mayor crecimiento) con una concentración de 80 ppm. El medio BG-11 se utiliza como medio de enriquecimiento. El medio de enriquecimiento es un medio que tiene componentes nutricionales que solo pueden ser utilizados por microorganismos específicos (Orlando et al., 2021).

### 7.2.1. Crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional del cultivo fue estimado con la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{T_2 - T_1}$$

$$\mu = \frac{\ln (1,6 \times 10^4) - \ln (1 \times 10^3)}{(360 - 32)}$$

$$\mu = 0,01962 \text{ cel/d}^{-1}$$

El valor de  $\mu$  determina el porcentaje de crecimiento poblacional del cultivo, este número entre más cercano a 0 tiene un alto porcentaje de división; es decir, el porcentaje se acerca al 100% y valores superiores. Contrastando, este resultado con el trabajo realizado por Astocondor et al., 2017, el crecimiento Poblacional algal en el alga *Chlorella peruviana*, se evaluó con la densidad celular (células/ml) calculada diariamente mediante contajes celulares en cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad hasta alcanzar el inicio de la fase estacionaria (día 20). La velocidad de crecimiento en la fase exponencial y el tiempo de generación fueron calculados según Wood et al. (2005), de la siguiente manera:

Tasa de crecimiento de la población ( $r$ ) =  $\text{Ln} (N_t / N_0) / \Delta t$ ,

donde;

$N_0$  = tamaño de la población al inicio de un intervalo de tiempo,

$N_t$  = tamaño de la población al final de un intervalo de tiempo,



$\Delta t$  = intervalo de tiempo ( $t_t - t_0$ ) en días  $- 0,6931 \text{ cel/d}^{-1} = \text{Ln } 2$

La fórmula aplicada es similar, con la diferencia del logaritmo natural, esto debido a que se toman como referentes a diferentes autores. Adicionalmente los valores resultantes fluctúan cercanos al 0; es decir, un crecimiento poblacional cercano al 100%; en el caso de *Leptolyngbya*, este valor es superior al de *C.peruviana* debido a que la primera netamente se calcula con formulación , mientras que, en el caso de la segunda la forma y tamaño de las células permiten ser contadas con facilidad y su valor es más preciso al valor real de crecimiento del cultivo.

### 7.2.2. Tiempo de generación

El tiempo de generación fue calculado en función a los días de cultivo. El agar específico utilizado fue Agar agar, con  $1,6 \times 10^4$  macrocolonias de *Leptolyngbya* sp.

$$T_g = \ln 2 = 0.693$$

$\mu$  = tasa de crecimiento en días (Velocidad de crecimiento)

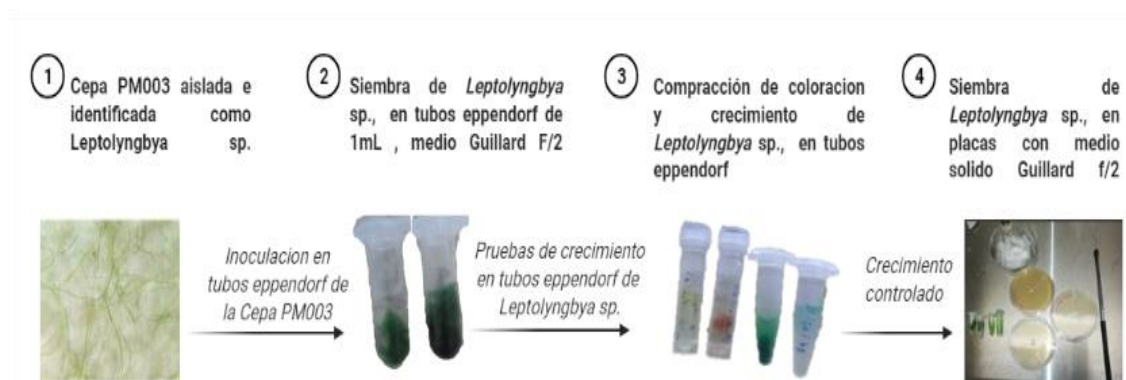
$$\mu = 0,693 / T_g$$

Un dato para acotar en el análisis de la velocidad de crecimiento de la investigación de Astocondor et al., (2017), que mostró que las tasas de crecimiento de población ( $r$ ) y la duplicación por día ( $k$ ) se van reduciendo conforme aumenta la salinidad, de modo que se puede afirmar que existe una relación significativa.

### 7.3. Cultivo de cepa PM003

### 7.3.1. Crecimiento en tubos eppendorf Versus crecimiento en placas de agar.

Los resultados obtenidos indican que, para que *Leptolyngbya* sp., crezca en el medio de cultivo artificial, este cumplió con los requerimientos nutricionales de la cianobacteria. Bajo ambos métodos de cultivo se logró obtener un monocultivo de *Leptolyngbya* sp., no obstante, varió la concentración de biomasa y tiempo de generación entre ambos; siendo, las placas de agar las que presentaron un menor tiempo de generación en comparación con los tubos eppendorf, ya que la superficie de las placas favorece un crecimiento uniforme y adherencia del biofilm en el agar como podemos observar en el Gráfico 3.



**Gráfico 3.** Proceso de cultivo de *Leptolyngbya* sp., a partir de un cultivo puro hasta la siembra en medio sólido.

La placa de agar que tuvo mejor crecimiento fue utilizada para inocular tubos de ensayo de 10 mL a razón de 1 colonia/5mL. Luego de continuar con el escalamiento del cultivo, hasta alcanzar los 300 mL se procedió a realizar la cosecha por filtración de biomasa húmeda de *Leptolyngbya* sp. (Gráfico 4).

Al culminar el experimento se comprobó que por el espacio y forma de los tubos eppendorf el tiempo de crecimiento en los tubos eppendorf oscila entre los 3 y 5 días posteriores a su inoculación.

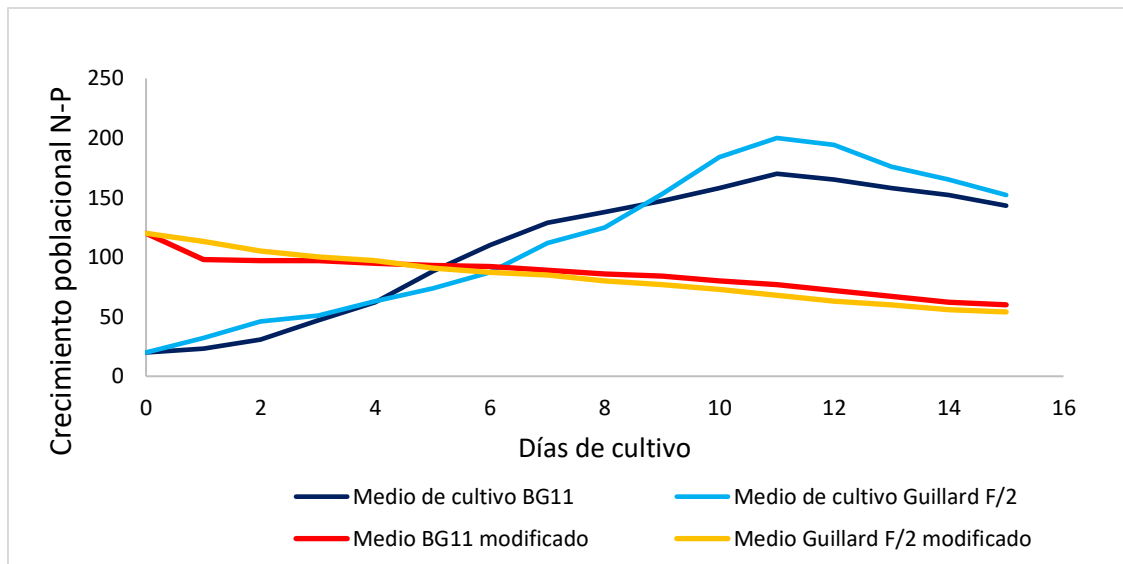


**Gráfico 4.** Proceso de cultivo de *Leptolyngbya* sp., a partir de placas hasta su cosecha.

### 7.3.2. Evaluación del cultivo y curva de crecimiento

El experimento se realizó por triplicado en 4 formatos 1) Medio BG11; 2) Medio GB11 (estrés); 3) Medio Guillard F/2 y 4) Guillard F/2 (estrés), para evitar y reducir cualquier variabilidad en los resultados. La media de los tres valores obtenidos se utilizó para calcular la desviación estándar. Los valores finales se representaron como media  $\pm$  Desviación estándar. El valor de la DE obtenido fue inferior a  $\pm 0,45\%$  para todos los casos, lo que indica la importancia de los resultados obtenidos.

Los ensayos fueron llevados a cabo durante 15 días (Tabla 2, Gráfico 5). El primer día de cultivo ( $t_0$ ) se sembró todas las pruebas con una densidad de siembra de  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Los resultados al segundo día de prueba mostraron una disminución, no significativa, de las 4 poblaciones.



**Gráfico 5.** Curva de crecimiento de la Cepa PM003 con Medio de cultivo BG11 Vs. Medio Guillard F/2.

En el medio de cultivo enriquecido con Guillard F/2 sin modificar la disminución poblacional fue menor respecto a los medios BG11 No modificado, modificado (estrés lumínico) y Guillard F/2 modificado (estrés lumínico); sin embargo, la disminución poblacional fue menos evidente con el medio Guillard F/2 sin modificar. Los medios de cultivo modificados revelaron una disminución poblacional mayor que el tercer día de cultivo.

Al quinto día de cultivo se observó un aumento poblacional, con los medios no modificados, superior respecto al día de siembra, denotándose un aumento mayor con el medio Guillard F/2.

En el noveno día de prueba, los ensayos con medios modificados mostraron una disminución poblacional mayor que los anteriores días de cultivos, por lo cual se procedió a descartar las muestras y continuar el estudio con los medios de cultivo sin modificar.

Respecto a los medios no modificados, los ensayos en Guillard F/2 mostraron un aumento poblacional dos veces superior a la población en medio BG11.

Durante las posteriores revisiones desde el día 6 al día 12 de cultivo las poblaciones de ambos ensayos aumentaron significativamente obteniéndose el pico de mayor crecimiento en el día 11; observándose una mayor concentración de biomasa en las pruebas con Guillard F/2 en relación con el medio BG11. A partir del día 13 se observó una notable reducción de la división celular en el cultivo o fase de decrecimiento poblacional en ambas pruebas, no obstante, la producción biomasa en Guillard F/2 se mantuvo mayor que la biomasa en BG11 hasta el final del cultivo.

En el estudio de Leal et al., 2012, realizaron pruebas de crecimiento con *Pseudoanabaena* sp., en varios medios de cultivo, demostrando que el medio BG11 está enriquecido con sales de nitrato, pequeñas cantidades de vitaminas y demás sales minerales (Fosfato, sales de Hierro, Cobalto, Zinc, Manganeso, Cobre, Molibdeno y EDTA) presentes en mayor concentración en el medio Guillard F/2 y Algal. A pesar de aportar con nitratos, el medio BG11 no logró inducir el crecimiento celular de la cianobacteria filamentosa.

Por el contrario, Mercado-Tupiño (2016) probó la abundancia de biomasa final con diferentes medios de cultivos como Guillard F/2, BG11 y Bayfolan Forte. Fueron comparados los datos obtenidos en cada uno de estos medios, concluyendo que el Bayfolan Forte tenía todos los nutrientes necesarios para estimular el crecimiento de las algas, mientras que, el medio BG11 al llegar a la fase estacionaria tuvo un 35% más de crecimiento que el medio F/2 de Guillard.

En cuanto a las pruebas de estrés el medio de cultivo BG11 la biomasa estresada se mantuvo en mejor condición en comparación con el medio Guillard F/2.

### **7.3.3. Análisis de la curva de crecimiento**

La curva de crecimiento permitió determinar la fase de adaptación (lag) desde el día 1 al día 6 de cultivo, la fase exponencial (logarítmica) se observó desde el día 8 al día 12, la fase estacionaria se evidenció entre el día 13. A partir del día 15 inició el decrecimiento del cultivo y posterior muerte celular (Gráfico 1).

El peso de la biomasa se calculó cada dos días, tiempo adecuado para evidenciar cambios; ya que, la división de las células de microalgas marinas es cada dos días a diferencia de sus homologas dulceacuícolas (Rosales, A. R. L., & RENOVBABLE, M. E. C. E. E. 2017).

En el Gráfico 1 se observa la fase de latencia o muerte luego de la fase estacionaria debido a que el objetivo era iniciar un nuevo cultivo en la fase de mayor producción para la obtención de la mayor cantidad de biomasa posible.

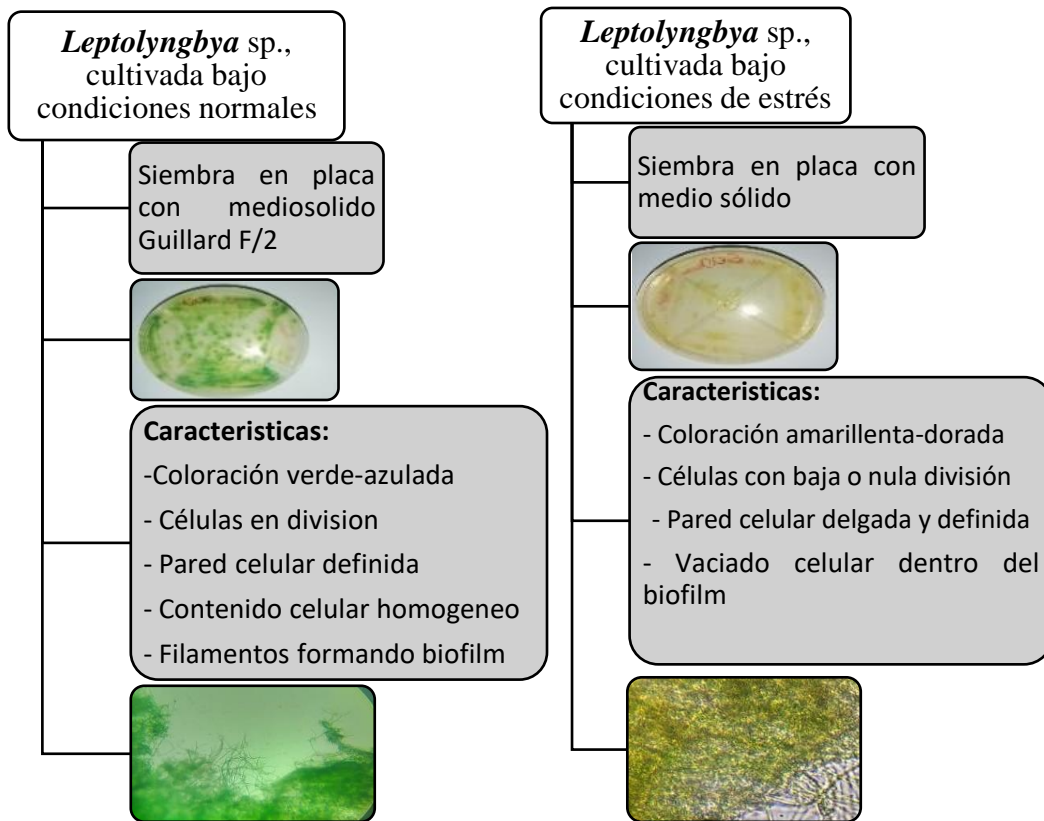
El medio de cultivo Guillard F/2 demostró resultados, aparentemente, superiores al cultivo con medio de cultivo BG11. Para constatar si existen diferencias significativas en la producción de la biomasa entre ambos medios de cultivo, se efectuó una comparación estadística. Dado que Guillard F/2 es un medio enriquecido como BG11, es apropiado usarlos tanto para microalgas de agua dulce como marinas, pero junto con los ingredientes

correctos de oligoelementos para agua dulce y definitivamente el pH correcto, tal como se modifica al medio BG11, basado en la información presente en la investigación de Ríos et al.,2015. Sin embargo, debe probarse la adaptación de la especie al medio, en lo que respecta a la cianobacteria *Leptolyngbya* sp., fue probado con éxito adaptativo porque pudo crecer en ambos medios hasta obtener la abundancia de biomasa requerida.

Según el análisis T-Student realizado, existen diferencias significativas entre las medias de las pruebas realizadas (valor  $p = 0.01468$ ), por tanto, se puede asegurar que la biomasa obtenida con el medio de cultivo Guillard F/2 fue significativamente mayor a la biomasa obtenida con BG11.

#### **7.4. Respuesta al estrés lumínico de la Cepa PM003**

Las muestras sometidas a estrés lumínico por exposición solar (42000 Lux) denotaron una coloración amarillenta desde el cuarto día observándose una pigmentación fuerte a partir del octavo día de exposición. Los ensayos con luminosidad artificial (Lámpara de 4200 Lux) tardaron hasta el décimo día de exposición para empezar a mostrar esta misma coloración (Gráfico 6).



**Gráfico 6.** Características con estrés Versus sin estrés de *Leptolyngbya* sp.

Esta alteración en la pigmentación de la cepa PM003 puede representar la presencia del posible pigmento carotenoide, reportado en cianobacterias filamentosas sometidas a estrés, además de expresar otros pigmentos cuando la luz actúa como factor estresor en esta cepa, evitando la penetración de rayos UV (Mansouri & Talebizadeh, 2017; Storme et al., 2015).

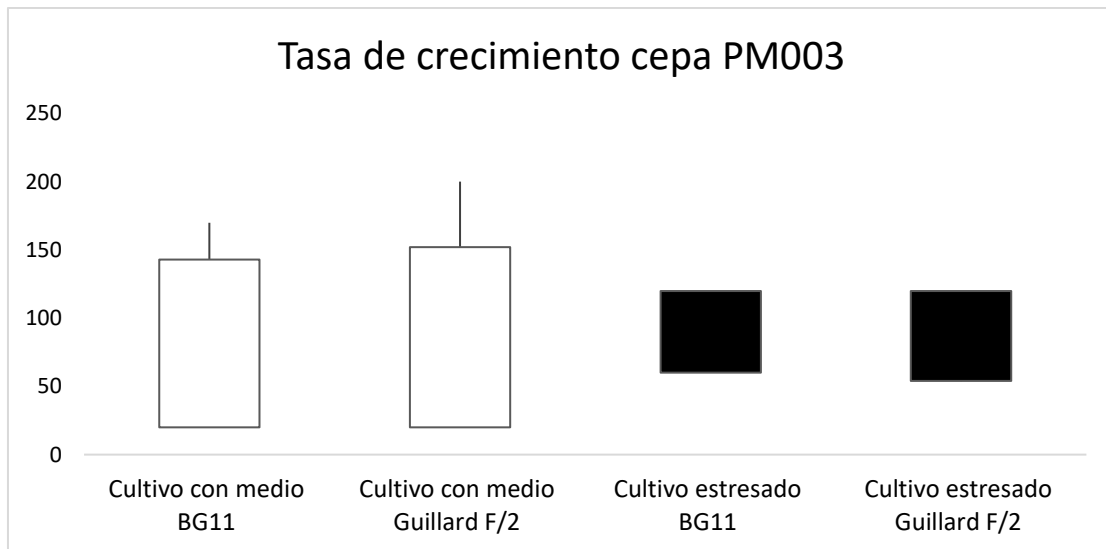
En el estudio de Kim et al., 2015, un cultivo de *Leptolyngbya* se mantuvo viable durante más de 6 meses, pero mostró un color verde amarillo cuando perdió la viabilidad; este cambio de coloración probando medio SOT y BG11, también se presentó durante el cultivo con Guillard F/2 y BG11 al ser expuestos a condiciones de estrés lumínico y en placas de agar no viables. En ambos casos la coloración amarillenta, retrasó el



crecimiento del cultivo después de la inoculación, pero al ser aislado nuevamente formó esteras (biofilm) verdeazuladas.

Este estudio es relevante por el tipo de productos analizados, presenta ventajas en el cultivo al utilizar factores ambientales para producir bio-compuestos en la cepa PM003 que no implica gastos adicionales. Además, constituye un avance en esta línea de investigación, demostrando que los dos medios de cultivo inducen el crecimiento de la cianobacteria y que se obtienen resultados relevantes al probar diferentes niveles de intensidad lumínica.

Con respecto a la intensidad de la luz Janssen, M. G. J. (2002), ha comprobado que, a intensidades de luz más altas, la productividad de la biomasa disminuye hasta un 15%, no obstante, la productividad de la biomasa se mantiene a la par con productividades reportadas en cianobacterias en condiciones óptimas de cultivo, lo que contrasta con los resultados obtenidos en la prueba de estrés lumínico a la que se expuso a *Leptolyngbya* sp., que detuvo su división celular un 80% aproximadamente, reduciendo la producción de la biomasa.



**Gráfico 7.** Tasa de Crecimiento de la cepa PM003 en condiciones de Estrés y No estresado

El Grafico 7, demuestra que el efecto de la luz sobre la cepa PM003, estimula la producción de metabolitos (pigmentos), cambio perceptible al exponer el cultivo a luz solar y los cambios en la biomasa obtenida al final del cultivo comparando además la eficiencia de medios Guillard F/2 y BG11.

Una recomendación de los autores Tripathi, R., Singh, J., & Thakur, I. S. (2015) es realizar un cultivo continuo porque permite el mantenimiento del cultivo muy cerca a la tasa máxima de crecimiento, que aumenta la productividad de la biomasa. No obstante, en este estudio se optó por un cultivo discontinuo y demostró ser eficiente para obtener biomasa a corto plazo en cultivos en exteriores. Se descartó el uso del sistema continuo por las siguientes razones: carecer de los implementos necesarios, la cianobacteria tiene características bentónicas (capacidad de fijarse sobre las paredes de los recipientes de cultivo y crecer formando biopelículas) y porque el cultivo continuo limita los efectos de la distribución de nutrientes y provoca cambios en la producción biomasa.

En este estudio, se demostró que el medio Guillard F/2 es más eficiente para la producción de biomasa microalgal de *Leptolyngbya* sp., pues el medio BG11 no logro superarlo, estos resultados concuerdan con lo reportado por Wang et al. (2015), quienes concluyen que limitar la concentración de nutrientes permite estimular la funcionalidad de activos celulares de reserva y el medio Guillard F/2 se caracteriza por contener bajas concentraciones de nutrientes lo que activaría la función de reserva de biocompuestos de *Leptolyngbya* sp.

Adicionalmente, en condiciones normales de cultivo la acumulación de lípidos en las células de la cepa PM003, impacta en la reducción de la biomasa algal, lo que sugiere que las dos condiciones, alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser mutuamente excluyentes (Giordano *et al*, 2015).

En función con los resultados se optó por utilizar la biomasa estresada con luminosidad solar para el análisis bioquímico proximal o bromatológico debido a que mostraron una alteración metabólica en menor tiempo, debido a la penetración de los rayos solares sobre el cultivo a cielo abierto de *Leptolyngbya* sp.

Las muestras fueron cosechadas al día 24, El 50% de la biomasa fue liofilizada, secada y almacenada en refrigeración a -5°C para su posterior análisis bromatológico. El tipo de cosecha fue por filtración, es un método comúnmente utilizado para la separación sólido-líquido. Estos métodos tienden a ser costosos en energía, con reemplazos frecuentes de

membrana y bombeo continuo de la biomasa. A pesar de ello, se continúa avanzado en el mejoramiento técnico del proceso (Mendoza et al. 2017).

**Tabla 2.** Peso promedio de la biomasa de la cepa PM003 con medios de cultivo Guillard /F2 y BG11.

Tiempo de análisis (Días).	Promedio de biomasa medida ( $g \cdot L^{-1}$ ).			
	BG11		Guillard F/2	
	Sin modificar	Modificado (estrés)	Sin modificar	Modificado (estrés)
T0	20	120	20	120
T2	31	97	46	105
T4	62	95	63	97
T6	110	92	87	87
T8	138	86	125	80
T10	158	80	184	73
T12	165	72	194	63
T14	152	62	165	56

**Tn.:** Tiempo de cultivo.

Finalmente, con los resultados de este estudio se pudo también confirmar que el efecto positivo de los nutrientes de los medios de cultivo sobre la cepa PM003, el aporte de nutrientes limitantes como nitrógeno en los diferentes medios de cultivo.

### 7.5. Evaluación de compuestos bioquímicos producidos por la Cepa PM003.

Los niveles de lípidos, proteínas, humedad y cenizas medidas presentaron diferencias a considerar entre ambos ensayos (Gráfico 8). La concentración lipídica fue dos veces mayor en las muestras no estresadas en referencia a las muestras estresadas (Tabla 3), lo

cual es corroborado por el análisis estadístico, que indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ambas pruebas (Tabla 4).

De manera similar, el estudio de Orlando et al., 2021, comprueba que el contenido de lípidos de *Leptolyngbya* HS-16 varía en función de los diferentes tratamientos en los que fue probada. Se sabe que *Leptolyngbya* HS-16 contiene varios tipos de lípidos, incluidos ácidos grasos saturados en un 40,56%, ácidos grasos monoinsaturados en un 31,04%, ácidos grasos ramificados en un 25,67% y ácidos grasos hidroxilados en un 2,74%.

Con base en los resultados de la medición, se sabe que el contenido de lípidos de *Leptolyngbya* HS-16 en el sistema de biorreactor BCPBR2 es de 1,30% con un peso de biomasa de 0,6 mg y un peso de lípidos de 46,2 mg; mientras que el contenido de lípidos de *Leptolyngbya* HS-16 en el sistema de biorreactor BCPBR1 fue del 4,41% con un peso de biomasa de 2,9 mg y un peso de lípidos de 65,8 mg. Mientras tanto, el contenido de lípidos de *Leptolyngbya* en el sistema biorreactor TPBR (sin aireación) fue del 15,23% con un peso de biomasa de 3,9 mg y un peso de lípidos de 25,6 mg.

Estos resultados contrastan con pocas investigaciones, entre las que resaltan las realizadas por investigadores como Singh et al. (2014), quienes obtuvieron un 21% de lípidos del peso de biomasa seca; Tsolcha et al. (2018) obtienen un porcentaje de lípidos del 14,8%. Mientras tanto, Mai et al. (2018) obtienen un porcentaje de lípidos del 31,34%.

La concentración proteica presentó diferencias de  $8,6 \text{ mg} \cdot \text{gr}^{-1}$  entre ambas pruebas (Tabla 3), no obstante, la prueba T-student indicó que las diferencias entre ambos no son

estadísticamente significativas (Tabla 4); no quiere decir que sea relevante o importante no es lo mismo significación estadística que significación conceptual o relevancia práctica.

Con relación a la humedad se evidencio una diferencia de  $20,7 \text{ mg}\cdot\text{gr}^{-1}$  entre los promedios de ambos ensayos (Tabla 3), sin embargo, el análisis estadístico revelo que ambos valores eran estadísticamente similares (Tabla 4).

El promedio de cenizas para las muestras no estresadas fue de  $39,0 \text{ mg}\cdot\text{gr}^{-1}$ , mientras que para la biomasa no estresada fue de  $53,6 \text{ mg}\cdot\text{gr}^{-1}$  presentando una diferencia de  $14,6 \text{ mg}\cdot\text{gr}^{-1}$  entre ambos (Tabla 3) (Gráfico 8)). Tal discrepancia acorde al estadístico T-Student es significativamente diferente (Tabla 4).

El contenido de cenizas en la biomasa de *Leptolyngya* es considerablemente elevada (87-89%) en comparación con otras especies microalgales con *Scenedesmus* sp., La producción de biomasa seca de *Scenedesmus* sp., cultivado a cielo abierto en un periodo de 15 días en medio Nitrofoska foliar, cuyo contenido de cenizas, estuvo por debajo del 30% registrando el mayor valor en el control con 28,13% (Andrade et al., 2009).

**Tabla 3.** Análisis bromatológico realizado a la cepa PM003

Análisis Bromatológicos.	Concentración promedio de compuestos ( $\text{mg}\cdot\text{gr}^{-1}$ ).	
	<b>PM003 no-est.</b>	<b>PM003 est.</b>
Lípidos	1,2	0,6
Proteínas	63,6	72

Humedad (%)	89,42	87,35
Cenizas	39,0	53,6

- **Cálculo de cuantificación de lípidos**

$$\text{Contenido de lípidos muestra 1 (\%)} = 100 \times \frac{(172,4 - 170)}{200} = 1,2$$

$$\text{Contenido de lípidos muestra 2 (\%)} = 100 \times \frac{(171,2 - 170)}{200} = 0,6$$

- **Cálculo de cuantificación de proteínas**

**Cálculos:**

$$3) \text{ Porcentaje de Nitrogeno de la muestra 1 (\%)} = \frac{310 \times 4}{200} \times 0,014 = 63,6$$

Luego;

$$4) \text{ Proteína cruda (\%)} = 63,6 \times 6.25 = 397,5$$

$$\text{Porcentaje de Nitrogeno de la muestra 2 (\%)} = \frac{1 \times 6}{200} \times 0.014 = 72$$

$$\text{Proteína cruda (\%)} = 72 \times 6.25 = 450$$

- **Cenizas**

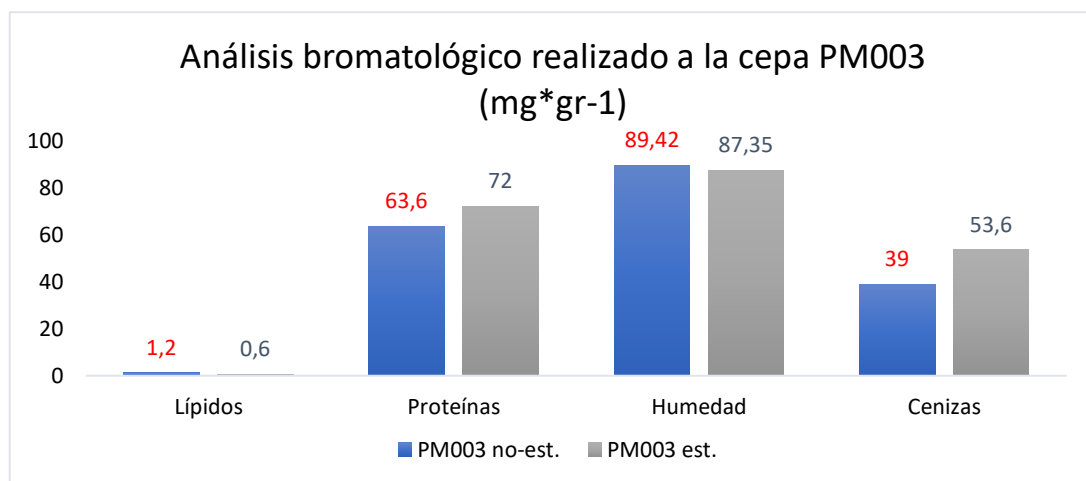
$$\%Cenizas\ 1 = \left( \frac{800 - P2}{200} \right) \times 100\% = 39$$

$$\%Cenizas\ 2 = \left( \frac{800 - P2}{200} \right) \times 100\% = 53,6$$

- **Humedad**

$$Contenido\ de\ humedad\ 1\ (\%) = 100 \times \frac{(232,5 - 32,5) - (53,67 - 32,5)}{(232,5 - 32,5)} = 89,42$$

$$Contenido\ de\ humedad\ 2\ (\%) = 100 \times \frac{(232,5 - 32,5) - (57,71 - 32,5)}{(232,5 - 32,5)} = 87,3$$



**Gráfico 8.** Análisis bioquímico proximal de biomasa Estresada y No estresada.

## 7.6. Análisis estadístico



El valor obtenido de la t de Student (para muestras independientes) junto con la probabilidad (p) asociada al valor obtenido de t (es decir, la significación estadística). Este valor de p es la probabilidad de obtener una diferencia distinta de cero en el caso de que ambas muestras pertenezcan a la misma población sin más diferencias que las puramente aleatorias. Como nuestro nivel de confianza es  $p = .05$ , la diferencia es estadísticamente significativa siempre que este valor de p sea igual o inferior a 0.05.

**Tabla 4.** Valores p obtenidos en la prueba T-Student para medias de dos muestras independientes.

<b>Análisis Bromatológicos.</b>	<b>Valor p obtenido.</b>
Lípidos	0.0220
Proteínas	0.0295
Humedad	0.0879
Cenizas	0.0018

## 1. CONCLUSIONES

En la siguiente sección se exponen las conclusiones de los resultados obtenidos en el ensayo de cultivo, así como la prueba de estrés lumínico, el análisis del crecimiento de la cepa PM003 a escala laboratorio, finalmente los resultados obtenidos de la extracción de proteínas, lípidos, cenizas y humedad de la biomasa cultivada bajo condiciones normales versus la biomasa estresada.

La cepa PM003 ha sido aislada de la comuna Palmar, Península de Santa Elena- Ecuador, identificado taxonómicamente como *Leptolyngbya* sp., basado en datos morfológicos. Esta cianobacteria es una cepa de rápido crecimiento, crece con éxito en el medio de cultivo Guillard F/2 cuyos compuestos (Solución de nitrato y fosfato, solución de meta-silicatos, solución de metales traza y vitaminas) generó mayor producción volumétrica, alcanzó la fase exponencial alcanzó el pico máximo de crecimiento en el día 11, se obtuvo 200 gr biomasa húmeda. Bajo estas condiciones produjo 1,2 mg\*gr<sup>-1</sup> de lípidos, *Leptolyngbya* sp., requiere mantener condiciones ambientales estables para elevar la producción lipídica y de humedad.

Las condiciones de estrés para la cianobacteria *Leptolyngbya* sp., con exposición lumínica estable de 42000 lux, con fotoperiodo 12:12h, 300 mL de medio de cultivo, temperatura ambiente y agitación manual diaria. El estrés lumínico demostró ser eficiente para elevar la producción de proteínas en una muestra de 200 gr de biomasa húmeda se obtuvo 72 mg\*gr<sup>-1</sup> y cenizas 53,6 mg\*gr<sup>-1</sup>.

El análisis proximal, determinó que existe diferencia significativa en los resultados de producción de lípidos entre la biomasa obtenida en condiciones normales y la biomasa estresada. La cantidad obtenida a partir de 200 gr de biomasa húmeda para condiciones normales corresponde a 1,2 mg\*gr<sup>-1</sup> lípidos; 63,6 mg\*gr<sup>-1</sup> Proteínas; 89,42 mg\*gr<sup>-1</sup> humedad y 39 mg\*gr<sup>-1</sup> de cenizas, mientras que, bajo condiciones de estrés los resultados son 0,6 mg\*gr<sup>-1</sup> lípidos; 72 mg\*gr<sup>-1</sup> Proteínas; 87,35 mg\*gr<sup>-1</sup> humedad y 53,6 mg\*gr<sup>-1</sup> cenizas.

## 2. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios posteriores probando otros medios de cultivos para cianobacterias que mejoren el sistema de cultivo de *Leptolyngbya* sp., a escala piloto bajo condiciones estandarizadas como: fotoperíodo, temperatura, salinidad, pH y aporte de CO<sub>2</sub>, de vitaminas, macro y micronutrientes en el medio de cultivo y correlacionarlo con el crecimiento celular y conversión de bio-compuestos.

Se sugiere realizar el análisis proximal utilizando biomasa seca para la cuantificación de lípidos, proteínas, cenizas, humedad y en experimentos futuros, hacer ahínco en el estudio de otros componentes de interés biotecnológico presentes en *Leptolyngbya* sp., como pigmentos y carbohidratos.

Mediante el estrés lumínico incrementó la producción proteica, por lo que es recomendable realizar más ensayos para determinar el punto de conversión y establecer un posible protocolo de obtención de proteínas a partir de *Leptolyngbya* sp. Además de aplicar otras metodologías actualizadas como la extracción de proteínas asistido por ultrasonido utilizando el método NTC 282 aplicado en la investigación de Bernal López, C. (2015).

### 3. BIBLIOGRAFÍA

Agudelo Rivera, E. (2020). Las microalgas como fuente de nutrientes en vías de desarrollo. <http://hdl.handle.net/10045/107312>

Ahmed, M., Stal, L. J., & Hasnain, S. (2014). The morphology and bioactivity of the rice field cyanobacterium *Leptolyngbya*. *Revista de Biología Tropical*, 62(3), 1251–1260. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i3.8657>

Amorim, M. L., Soares, J., Coimbra, J. S. D. R., Leite, M. D. O., Albino, L. F. T., & Martins, M. A. (2021). Microalgae proteins: Production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(12), 1976-2002.

Andrade, R., Charity, E., Vera, B., Alexandra, L., Cardenas, L., Carmen, H., ... & Ever, D. (2009). Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp., with wastewater from fishery. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 32(2), 126-134.

Andreeva, N. A., Melnikov, V. V., & Snarskaya, D. D. (2020). The role of cyanobacteria in marine ecosystems. *Russian Journal of Marine Biology*, 46(3), 154-165.

Astocondor, M. M., Mayta Huatuco, E., Montoya Terreros, H., & Tarazona Delgado, R. (2017). Crecimiento poblacional y productividad de la microalga nativa *Chlorella peruviana* bajo diferentes salinidades. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 976-986.

Awasthi, A., & Singh, M. D. P. (2021). Cyanobacteria: A Source of Bio Fertilizers For Sustainable Agriculture. *International Journal of Modern Agriculture*, 10(2), 4117-4122.

Barahona Guacollante, D. G., Almeida Andrade, M. I., Valencia Arias, E. J., & Pineda Naranjo, K. E. (2020). *Desarrollo de una bebida a base de espirulina, maracuyá y agua de coco* (Bachelor's thesis, Quito).

Barnett, J. Z., Foy, J., Malone, R., Rusch, K. A., & Gutierrez-Wing, M. T. (2017). Impact of light quality on a native Louisiana *Chlorella vulgaris/Leptolyngbya* sp. co-culture. *Engineering in life sciences*, *17*(6), 678–685. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600013>

Bentzon-Tilia, M., Traving, S. J., Mantikci, M., Knudsen-Leerbeck, H., Hansen, J. L., Markager, S., & Riemann, L. (2015). Significant N<sub>2</sub> fixation by heterotrophs, photoheterotrophs and heterocystous cyanobacteria in two temperate estuaries. *The ISME journal*, *9*(2), 273-285.

Berg, M., & Sutula, M. (2015). Factors affecting the growth of cyanobacteria with special emphasis on the Sacramento-San Joaquin Delta. *Southern California Coastal Water Research Project Technical Report*, 869.

Bernal López, C. (2015). Extracción de proteínas de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana* asistido por ultrasonido.

Betawati-Prihantini, N., Dianing-Pertiwi, Z., Yuniati, R., Sjamsuridzal, W., & Putrika, A. (2019). The effect of temperature variation on the growth of *Leptolyngbya* (cyanobacteria) HS-16 and HS-36 to biomass weight in BG-11 medium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *19*(March). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101105>

Bi, L., & Pan, G. (2017). From harmful *Microcystis* blooms to multi-functional core-double-shell microsphere bio-hydrochar materials. *Scientific reports*, *7*(1), 1-9.

Campos, A., Araújo, P., Pinheiro, C., Azevedo, J., Osório, H., & Vasconcelos, V. (2013). Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *94*, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.019>

Caporgno, M. P., & Mathys, A. (2018). Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Frontiers in nutrition*, *5*, 58.

Castenholz, R., Rippka, R., Herdman, M., & Wilmotte, A. (2015). No Title. In *Form-Leptolyngbya. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.

Castrillo, M., Lucas-Salas, L. M., Rodríguez-Gil, C., & Martínez, D. (2013). High pH-induced flocculation-sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, *128*, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.114>

Chen, Y., & Vaidyanathan, S. (2012). A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids. *Analytica Chimica Acta*, *724*, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.049>

Christmas, N. A., Williamson, C. J., Yallop, M. L., Anesio, A. M., & Sánchez-Baracaldo, P. (2018). Photoecology of the Antarctic cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. BC1307 brought to light through community analysis, comparative genomics and in vitro photophysiology. *Molecular ecology*, *27*(24), 5279-5293.

Daniel, L., Angulo, M., & Mérida, R. (2017). Estado actual de las empresas productoras de microalgas destinadas a alimentos y suplementos alimenticios en América

Latina. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(2), 130-147.

Dasgupta, C. N. (2015). Algae as a source of phycocyanin and other industrially important pigments. In *Algal biorefinery: An integrated approach* (pp. 253-276). Springer, Cham.

De Araujo, E. D., Patel, J., de Araujo, C., Rogers, S. P., Short, S. M., Campbell, D. A., & Espie, G. S. (2011). Physiological characterization and light response of the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in the filamentous cyanobacterium *Leptolyngbya* sp., CPCC 696. *Photosynthesis research*, 109(1), 85-101.

Dengg, M., Stirling, C. H., Reid, M. R., Verburg, P., Armstrong, E., Kelly, L. T., & Wood, S. A. (2022). Growth at the limits: comparing trace metal limitation of a freshwater cyanobacterium (*Dolichospermum lemmermannii*) and a freshwater diatom (*Fragilaria crotonensis*). *Scientific reports*, 12(1), 1-12.

El-Gamal, A. D. (2019). Notes on isolation of *Leptolyngbya* (plectonema) nostocorum capable to withstand liquid hands detergent. *Egyptian Journal of Phycology*, 20(1), 183-199.

Freire, E., Koch, A., & Salvador, L. (2016). Evaluación del potencial biofertilizante de consorcios de Cianobacterias en pasto Raygrass (*Lolium multiflorum*). *ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica Ecuatoriana*, 4(1).

Frischkorn, K. R. (2018). *Physiological ecology of Trichodesmium and its microbiome in the oligotrophic ocean*. Columbia University.

Galarza, V. O. (2019). Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos



funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22. Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P. Y. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 523–529. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9886-1>

Galetović, A., & Dufossé, L. (2020). Phycobiliproteins as Food Additives. In *Pigments from Microalgae Handbook* (pp. 559-573). Springer, Cham.

Galindo-Alcázar, O., Medina-Jaritz, N. B., Garduño-Solórzano, G., & Olvera-Ramírez, R. (2018). Cianobacterias y microalgas de biopelículas superficiales de la zona arqueológica de Malinalco, México. *Polibotánica*, (45), 131-146.

Gérin, S., Delhez, T., Corato, A., Remacle, C. y Franck, F. (2020). Un medio de cultivo novedoso para diatomeas de agua dulce promueve la producción por lotes fotoautotrófica eficiente de biomasa, fucoxantina y ácido eicosapentaenoico. *Revista de psicología aplicada*. doi: 10.1007 / s10811-020-02097-1

Getachew, A. T., Jacobsen, C., & Holdt, S. L. (2020). Emerging technologies for the extraction of marine phenolics: Opportunities and challenges. *Marine Drugs*, 18(8), 389.

Giddings, L. A., & Newman, D. J. (2015). Bioactive compounds from terrestrial extremophiles. In *Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles* (pp. 1-75). Springer, Cham.

Giordano, M., Palmucci, M., & Raven, J. A. (2015). Growth rate hypothesis and efficiency of protein synthesis under different sulphate concentrations in two green algae. *Plant, cell & environment*, 38(11), 2313-2317.

Gómez Pedraza, A. Y. (2018). Relación entre cianobacterias con Geosmina y 2-MIB de la bocATOMA del río Suratá (AMB).

Gómez-Lojero, C., Leyva-Castillo, L. E., Herrera-Salgado, P., Barrera-Rojas, J., Ríos-Castro, E., & Gutiérrez-Cirlos, E. B. (2018). *Leptolyngbya* CCM 4, a cyanobacterium with far-red photoacclimation from Cuatro Ciénegas Basin, México. *Photosynthetica*, 56(1), 342-353.

Guiry, M., & Guiry, G. (2020). *Leptolyngbya Anagnostidis & Komárek, 1988, nom. et typ. cons.* World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway.  
<http://www.algaebase.org>

Hajská, E. (2019). *Leptolyngbya* sensu lato as a source of cyanobacterial diversity.

Hamilton, T. L., Klatt, J. M., De Beer, D., & Macalady, J. L. (2018). Cyanobacterial photosynthesis under sulfidic conditions: insights from the isolate *Leptolyngbya* sp. strain hensonii. *The ISME journal*, 12(2), 568-584.

Harada, K., & Hirata, K. (2018). Effect of medium and light quality on pink pigment production of cyanobacteria *Oscillatoria* sp. BTCC/A0004. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 47, p. 03002). EDP Sciences.

He, H., Miao, R., Huang, L., Jiang, H., & Cheng, Y. (2021). Vegetative cells may perform nitrogen fixation function under nitrogen deprivation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 based on genome-wide differential expression analysis. *PloS one*, 16(3), e0248155.

Hernández, A. B., & Velasco, L. A. (2014). Aislamiento y cultivo de microalgas bentónicas del caribe colombiano bajo diferentes condiciones de temperatura. *Intropica*, 23-32.

Horath, T., & Bachofen, R. (2009). Molecular characterization of an endolithic microbial community in dolomite rock in the central Alps (switzerland). *Microbial Ecology*, *58*(2), 290–306. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9483-7>

Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., & Yang, C. (2017). Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering*, *3*(3), 318-329.

Janssen, E. M. L. (2019). Cyanobacterial peptides beyond microcystins—A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research*, *151*, 488-499.

Janssen, M. G. J. (2002). *Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield*.

Joshi, D., Mohandass, C., & Dhale, M. (2018). Effect of UV-B radiation and desiccation stress on photoprotective compounds accumulation in marine *Leptolyngbya* sp. *Applied biochemistry and biotechnology*, *184*(1), 35-47.

Jovel, V. H. C. (2019). Caracterización de la estructura de la comunidad de microorganismos en cuerpos de agua dulce del norte de la Península de Yucatán.

Kageyama, H., Waditee-Sirisattha, R., Sirisattha, S., Tanaka, Y., Mahakhant, A., & Takabe, T. (2015). Improved alkane production in nitrogen-fixing and halotolerant cyanobacteria via abiotic stresses and genetic manipulation of alkane synthetic genes. *Current microbiology*, *71*(1), 115-120.

Kim, J. H., Choi, W., Jeon, S. M., Kim, T., Park, A., Kim, J., ... & Kang, D. H. (2015). Isolation and characterization of *Leptolyngbya* sp. KIOST-1, a basophilic and euryhaline filamentous cyanobacterium from an open paddle-wheel raceway *Arthrospira* culture pond in Korea. *Journal of applied microbiology*, *119*(6), 1597-1612.

Kim, J., & Kang, D.-H. (2016). Draft genome sequence of *Leptolyngbya* sp. KIOST-1, a

filamentous cyanobacterium with biotechnological potential for alimentary purposes. *Genome Announcements*, 4(5), 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00984-16>

Kokabi, M., Yousefzadi, M., Soltani, M., & Arman, M. (2019). Effects of different UV radiation on photoprotective pigments and antioxidant activity of the hot-spring cyanobacterium *Leptolyngbya cf. fragilis*. *Phycological Research*, 67(3), 15-220.

Kuffner, I. B., & Paul, V. J. (2001). <Effects of nitrate, phosphate and iron on the.pdf>. *Marine Ecology Progress Series*, 222(Noviembre), 63–72.

Kugler, A., & Dong, H. (2019). Phyllosilicates as protective habitats of filamentous cyanobacteria *Leptolyngbya* against ultraviolet radiation. *PloS one*, 14(7), e0219616.

Kumar- Ramesh, V., Narendrakumar, G., Thyagarajan, R., & Melchias, G. (2018). A comparative analysis of biodiesel production and its properties from *Leptolyngbya* sp. BI-107 and *Chlorella vulgaris* under heat shock stress. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 502–506. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.007>

Liaimer, A., Jensen, J. B., & Dittmann, E. (2016). A genetic and chemical perspective on symbiotic recruitment of cyanobacteria of the genus *Nostoc* into the host plant *Blasia pusilla* L. *Frontiers in microbiology*, 7, 1693.

Liu, J., Pan, Y., Yao, C., Wang, H., Cao, X., & Xue, S. (2015). Determination of ash content and concomitant acquisition of cell compositions in microalgae via thermogravimetric (TG) analysis. *Algal Research*, 12, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.018>

Llopiz, A. (2016). Active compounds from cyanobacteria and microalgae: Properties and potential applications in biomedicine. *Revista Bionatura*, 1(2), 79–87.

<https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.02.8>

Lopes, G., Clarinha, D., & Vasconcelos, V. (2020). Carotenoids from cyanobacteria: a biotechnological approach for the topical treatment of psoriasis. *Microorganisms*, 8(2), 302.

López Saldarriaga, C. D. (2019). Influencia de la salinidad en la producción de biomasa y su incidencia sobre la composición bioquímica de *Arthrospira maxima* (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2019).

Luimstra, V. M., Schuurmans, J. M., Verschoor, A. M., Hellingwerf, K. J., Huisman, J., & Matthijs, H. C. (2018). Blue light reduces photosynthetic efficiency of cyanobacteria through an imbalance between photosystems I and II. *Photosynthesis research*, 138(2), 177-189.

Ma, J., & Wang, P. (2021). Effects of rising atmospheric CO<sub>2</sub> levels on physiological response of cyanobacteria and cyanobacterial bloom development: A review. *Science of The Total Environment*, 754, 141889.

Mai, T., Johansen, J. R., Pietrasiak, N., Bohunicka, M., & Martin, M. P. (2018). Revision of the Synechococcales (Cyanobacteria) through recognition of four families including Oculatellaceae fam. nov. and Trichocoleaceae fam. nov. and six new genera containing 14 species. *Phytotaxa*, 365(1), 1-59.

Mansouri, H., & Talebizadeh, R. (2017). Effects of indole-3-butyric acid on growth, pigments and UV-screening compounds in *Nostoc linckia*. *Phycological Research*, 65(3), 212–216. <https://doi.org/10.1111/pre.12177>

Méndez Rodríguez, L. (2018). Optimización de la digestión anaerobia de microorganismos fotosintéticos: pretratamiento térmico y uso de cianobacterias.

Mendoza Rodriguez, M. G., Pohlenz, C., & Gatlin III, D. M. (2017). Supplementation of organic acids and algae extracts in the diet of red drum *Sciaenops ocellatus*: immunological impacts. *Aquaculture Research*, 48(4), 1778-1786.

Mercado Tupiño, E. (2016). Cultivo de la microalga *Scenedesmus Obliquus* var. *Dimorphus* (TURPIN) para la obtención de biomasa y lípidos.

Moncayo Medina, A. E. (2017). Caracterización morfológica, análisis proximal y análisis microbiológico de una muestra de la Cianobacteria *Nostoc* sp., recolectada en el páramo de Papallacta (Bachelor's thesis, Quito: UCE.).

Moya Serrano, A. V. (2016). Efecto de los bajos en la estructura y composición de las comunidades fitoplanctónicas al norte y sur de la isla Santa Cruz, abril-octubre 2015 (Bachelor's thesis, QUITO/UIIDE/2016).

Mugnai, G., Rossi, F., Felde, V. J. M. N. L., Colesie, C., Büdel, B., Peth, S., ... & De Philippis, R. (2018). The potential of the cyanobacterium *Leptolyngbya ohadii* as inoculum for stabilizing bare sandy substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 127, 318-328.

Naganthran, A., Verasoundarapandian, G., Khalid, F. E., Masarudin, M. J., Zulkharnain, A., Nawawi, N. M., ... & Ahmad, S. A. (2022). Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles. *Materials*, 15(2), 427.

Nandagopal, P., Steven, A. N., Chan, L. W., Rahmat, Z., Jamaluddin, H., & Mohd Noh, N. I. (2021). Bioactive Metabolites Produced by Cyanobacteria for Growth Adaptation and Their Pharmacological Properties. *Biology*, 10(10), 1061.

Nascimento-Mata, S., de Souza-Santos, T., Guimarães-Cardoso, L., Bomfim-Andrade, B., Hartwig-Duarte, J., Vieira-Costa, J. A., Oliveira-de Souza, C., & Druzian, J. I. (2020). *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in a raceway-type bioreactor using wastewater from desalination process: Production of carbohydrate-rich biomass. *Bioresource Technology*, 311(May). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123495>

Ohkubo, S., & Miyashita, H. (2017). A niche for cyanobacteria producing chlorophyll f within a microbial mat. *The ISME journal*, 11(10), 2368-2378.

Olofsson, M., Suikkanen, S., Kobos, J., Wasmund, N., & Karlson, B. (2020). Basin-specific changes in filamentous cyanobacteria community composition across four decades in the Baltic Sea. *Harmful Algae*, 91, 101685.

Oosta, G. M., Mathewson, N. S., & Catravas, G. N. (1978). Optimization of Folin-Ciocalteu reagent concentration in an automated Lowry protein assay. *Analytical Biochemistry*, 89(1), 31–34. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90723-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90723-6)

Orlando, A. M., Nasruddin, W. S., Wardhana, W., & Prihantini, N. B. Biomass Production and Lipid Content of *Leptolyngbya* HS-16 grown in Bubble Column Photobioreactors (BCPBR) with Air Bubbler Pore Variation.

Orlando, A. M., Sjamsuridzal, W., Wardhana, W., & Prihantini, N. B. (2021). Biomass Production and Lipid Content of *Leptolyngbya* HS-16 grown in Bubble Column Photobioreactors (BCPBR) with Air Bubbler Pore Variation.

Pagliara, P., Barca, A., Verri, T., & Caroppo, C. (2020). The marine sponge *Petrosia ficiformis* harbors different cyanobacteria strains with potential biotechnological application. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(9), 638.

Pérez Zambrano, E. T., & Ayala Agudelo, Y. (2019). Producción de clorofila y astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* bajo estrés inducido por deficiencia de nitrógeno en el biorreactor Biostat Aplus de 5 litros.

Philippis, R. (2018). The potential of the cyanobacterium *Leptolyngbya ohadii* as inoculum for stabilizing bare sandy substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, *127*, 318–328. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.007>

Prihantini, N. B., Handayani, S., Sjamsuridzal, W., & Yokota, A. (2018). Fatty acid characterization of indigenous cyanobacterial strains isolated from five hot springs in Indonesia. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 67, p. 02021). EDP Sciences.

Prihantini, N. B., Pertiwi, Z. D., Yuniati, R., Sjamsuridzal, W., & Putrika, A. (2019). The effect of temperature variation on the growth of *Leptolyngbya* (cyanobacteria) HS-16 and HS-36 to biomass weight in BG-11 medium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *19*, 101105.

Raabova, L., Kovacik, L., Elster, J., & Strunecký, O. (2019). Review of the genus *Phormidesmis* (Cyanobacteria) based on environmental, morphological, and molecular data with description of a new genus *Leptodesmis*. *Phytotaxa*, *395*(1), 1-16.

Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology advances*, *34*(1), 14-29.

Rastogi, R. P., Madamwar, D., Nakamoto, H., & Incharoensakdi, A. (2020). Resilience and self-regulation processes of microalgae under UV radiation stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, *43*, 100322.

Ratnaparkhe, S., Mali, D., & Nabar, B. (2021). Study of Potential Application of



Cyanobacteria *Leptolyngbya Valderiana* in Skin Cosmeceuticals. *International journal of applied pharmaceutical sciences and research*, 6(04), 44-49.

Rigonato, J., Alvarenga, D. O., & Fiore, M. F. (2017). Tropical cyanobacteria and their biotechnological applications. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* (pp. 139-167). Springer, Cham.

Rios, L. F., Kleina, B. C., Luz Jr, L. F., Maciela, M. R. W., & Filhoa, R. M. (2015). Influence of culture medium on *Desmodesmus* sp. growth and lipid accumulation for biodiesel production. *Chem Eng*, 43, 601-6.

Rodríguez Valdez, G. (2017). Actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur.

Romero, L., Guevara, M., Gómez, B., Arredondo-Vega, B., Cortez, R., & Licet, B. (2017). Producción de pigmentos procedentes de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 108–114. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.59671>

Rosales, A. R. L., & RENOVALABLE, M. E. C. E. E. (2017). *Potencial de cepas de microalgas aisladas de la costa de Yucatán para la producción de biodiesel* (Doctoral dissertation, Tesis de maestría, CICY, México).

Rosales-Loaiza, N., Díaz, L., Aiello-Mazzarri, C., & Morales-Avenidaño, E. (2017). Cultivos a cielo abierto de las cianobacterias *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 para la producción de biomasa enriquecida. Pruebas piloto para cultivos masivos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 48(3), 81-86.

Sánchez-Bayo, A., Morales, V., Rodríguez, R., Vicente, G., & Bautista, L. F. (2020). Cultivation of microalgae and cyanobacteria: effect of operating conditions on growth and biomass composition. *Molecules*, 25(12), 2834.

Sant'Anna, C. L., Gama, W. A., Silva, T. G., & Vieira, A. A. H. (2018). A new species of *Trichodesmium* (Cyanobacteria) from freshwaters, Brazil. *Rodriguésia*, 69(4), 2019–2024. doi:10.1590/2175-7860201869433

Santín-Castillo, S. (2013). Elaboración de lomo enrollado de cerdo adicionando proteína de soya, en la microempresa santini de la ciudad de Loja. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Schembri, S., & Zammit, G. (2021). The Biodiversity of Epilithic Microalgal Communities Colonising a Central Mediterranean Coastline. *Journal of Coastal Research*.

Schipper, K. (2021). Producing algae in the Qatari desert: from strain to process.

Schipper, K., Fortunati, F., Oostlander, P. C., Al Muraikhi, M., Al Jabri, H. M. S., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2020). Production of phycocyanin by *Leptolyngbya* sp. in desert environments. *Algal Research*, 47, 101875.

Shimura, Y., Hirose, Y., Misawa, N., Osana, Y., Katoh, H., Yamaguchi, H., & Kawachi, M. (2015). Comparison of the terrestrial cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. NIES-2104 and the freshwater *Leptolyngbya boryana* PCC 6306 genomes. *DNA Research*, 22(6), 403–412. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsv022>

Silveira, S. B., & Odebrecht, C. (2021). Effects of light intensity and nutrients (N and P) on growth, toxin concentration, heterocyte formation and akinete germination of *Nodularia spumigena* (Cyanobacteria). *Hydrobiologia*, 848(18), 4387-4400.

Singh, H. (2018). Desiccation and radiation stress tolerance in cyanobacteria. *Journal of basic microbiology*, 58(10), 813-826.

Singh, J., & Thakur, I. S. (2015). Evaluation of cyanobacterial endolith *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for integrated wastewater treatment and biodiesel production: a toxicological perspective. *Algal Research*, 11, 294-303.

Singh, J., Tripathi, R., & Shekhar-Thakur, I. (2014). Characterization of endolithic cyanobacterial strain, *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for prospective recycling of CO<sub>2</sub> and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 166, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.055>

Singh, J., Tripathi, R., & Thakur, I. S. (2014). Characterization of endolithic cyanobacterial strain, *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for prospective recycling of CO<sub>2</sub> and biodiesel production. *Bioresource technology*, 166, 345-352.

Singh, M., & Das, K. C. (2014). Low cost nutrients for algae cultivation. In *Algal biorefineries* (pp. 69-82). Springer, Dordrecht.

Singh, P., & Kumar, D. (2020). Biomass and Lipid Productivities of Cyanobacteria-*Leptolyngbya foveolarum* HNBGU001. *BioEnergy Research*, 1-14.

Singh, P., & Kumar, D. (2021). Biomass and Lipid Productivities of Cyanobacteria-*Leptolyngbya foveolarum* HNBGU001. *BioEnergy Research*, 14(1), 278-291.

Solano, J. R. (2017). Evaluación del potencial antibacteriano en extractos lipofílicos de cianobacterias y microalgas cultivadas a partir de muestras de agua recolectadas en el sector del Cajas.

Springstein, B. L., Nürnberg, D. J., Weiss, G. L., Pilhofer, M., & Stucken, K. (2020). Structural determinants and their role in cyanobacterial morphogenesis. *Life*, 10(12), 355.

- Stal, L. J. (2017). The effect of oxygen concentration and temperature on nitrogenase activity in the heterocystous cyanobacterium *Fischerella* sp. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Storme, J., Golubic, S., Wilmotte, A., Kleinteich, J., Velázquez, D., & Javaux, E. (2015). Raman Characterization of the UV-Protective Pigment Gloeocapsin and Its Role in the Survival of Cyanobacteria. *Astrobiology*, 15(10), 843–857. <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1292>
- Stoyanov, P., Teneva, I., Mladenov, R., & Belkinova, D. (2016). Filamentous cyanoprokaryotes (Cyanoprokaryota / Cyanobacteria) in standing waters of Bulgaria: diversity and ecology. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 5(1), 19–28.
- Tang, J., Li, L., Li, M., Du, L., Shah, M. M. R., Waleron, M. M., ... & Daroch, M. (2021). Description, taxonomy, and comparative genomics of a novel species, *Thermoleptolyngbya sichuanensis* sp. nov., isolated from Hot Springs of Ganzi, Sichuan, China. *Frontiers in microbiology*, 12.
- Tejeda-Benítez, L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Facultad de Ingeniería*, 24(39), 43-54.
- Tiwari, O. N., Bhunia, B., Bandyopadhyay, T. K., & Oinam, G. (2019). Strategies for improved induction of lipid in *Leptolyngbya* sp. BTA 287 for biodiesel production. *Fuel*, 256, 115896.
- Tomatsu, C., Uesaka, K., Yamakawa, H., Tsuchiya, T., Ihara, K., & Fujita, Y. (2018). In vivo transposon tagging in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *FEBS letters*, 592(10), 1634-1642.

Tovar Salamanca, J. C., & Ruíz Díaz, J. P. (2016). Propuesta de escalamiento de un fotobiorreactor para la microalga *Chlorella Vulgaris* a nivel piloto (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).

Tripathi, R., Singh, J., & Thakur, I. S. (2015). Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO<sub>2</sub> sequestration and biodiesel production. *Renewable Energy*, *74*, 774-781.

Tsolcha, O. N., Tekerlekopoulou, A. G., Akrotos, C. S., Antonopoulou, G., Aggelis, G., Genitsaris, S., ... & Vayenas, D. V. (2018). A *Leptolyngbya*-based microbial consortium for agro-industrial wastewaters treatment and biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(18), 17957-17966.

Urmeneta-Alonso, B., Aragón, V., Bengochea, R., Díaz, C., Gamazo, I., García-Jalón, S., Vitas, A. (2003). Manual práctico de Microbiología (Segunda ed.). Barcelona (España): MASSON, S.A.

Vega, B. O. A., & Lobina, D. V. (2017). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.

Verma, V. y Bhattacharjee, MB (2015). Crecimiento y metabolismo de nitratos en la cianobacteria termohalófila *Leptolyngbya*. *J Algal Biomass Util*, *6*, 68-75.

Wang, E., Sorolla, M., Gopal-Krishnan, P., & Sorolla, A. (2020). From seabed to bedside: A review on promising marine anticancer compounds. *Biomolecules*, *10*(2), 1–43. <https://doi.org/10.3390/biom10020248>

Wang, Z., Xiao, P., Song, G., Li, Y., & Li, R. (2015). Isolation and characterization of a new reported cyanobacterium *Leptolyngbya bijugata* coproducing odorous geosmin and 2-methylisoborneol. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(16), 12133–

12140. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4470-2>

Wang, Z., Xiao, P., Song, G., Li, Y., & Li, R. (2015). Isolation and characterization of a new reported cyanobacterium *Leptolyngbya bijugata* coproducing odorous geosmin and 2-methylisoborneol. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(16), 12133–12140. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4470-2>

Watson, J., Swoboda, M., Aierzhati, A., Wang, T., Si, B., & Zhang, Y. (2021). Biocrude oil from algal bloom microalgae: a novel integration of biological and thermochemical techniques. *Environmental science & technology*, 55(3), 1973-1983.

Xiao, L. J., Lei, L. M., Peng, L., Lin, Q. Q., & Naselli-Flores, L. (2021). Iron operates as an important factor promoting year-round diazotrophic cyanobacteria blooms in eutrophic reservoirs in the tropics. *Ecological Indicators*, 125, 107446.

Xiao, M., Li, M., & Reynolds, C. S. (2018). Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. *Biological Reviews*, 93(3), 1399-1420.

Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Ravishankar, G. A., & Ambati, R. R. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: an overview. *Cells*, 10(2), 393.

Yamamoto, H., Kojima-Ando, H., Ohki, K., & Fujita, Y. (2020). Formation of prolamellar-body-like ultrastructures in etiolated cyanobacterial cells overexpressing light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in *Leptolyngbya boryana*. *The Journal of general and applied microbiology*.

Zainal-Abidin, Z., Zainuddin, Z., Wan-Mastrai, S., Mohd-Sidik-Merican, F., & Convey, P. (2020). Fatty acid profiles of Antarctic cyanobacteria *Leptolyngbya*. *Journal of Environmental Biology*, *41*(July), 687–694.

#### 4. ANEXOS

**Tabla 5.** Composición de los elementos del medio de cultivo Guillard F/2 (Li & Brand, 2007), usado para el cultivo de la cianobacteria PM003, en agua de mar.

#	Compuesto	Solución Stock (g/L)	Dosis	
1	NaNO <sub>3</sub>	75	1 ml	
2	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5	1 ml	
3	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	30	1 ml	
4	Solución de metales traza	Na <sub>2</sub> EDTA	0.436 g	1 ml
		FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.315 g	
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.010 g	
		ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.022 g	
		CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.010 g	
		MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.180 g	
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.006 g	
5	Vitaminas	Tiamina-HCl	0,001	1 ml
		Biotina	0,001	
		Cianocobalamina	0,4	



**Tabla 6.** Composición de los elementos del medio de cultivo BG-11 (Singh et al., 2014) usado para el cultivo de la cianobacteria PM003, en agua de mar.

#	Componente	Stock en dH20	Cantidad	Concentración final	
1	NaNO <sub>3</sub>	150 g/L	10 ml / L	17,6 m	
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9 g/L	10 ml / L	0,23 mM	
3	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	2.5 g/L	10 ml / L	0,3 mM	
4	CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	3.6 g/L	10 ml / L	0,24 mM	
5	Ácido cítrico • H <sub>2</sub> O	1.6 g/L	10 ml / L	0,031 mM	
6	Citrato de amonio férrico	1.6 g/L	10 ml / L	0,021 mM	
7	Na <sub>2</sub> EDTA • 2H <sub>2</sub> O	0.1 g/L	10 ml / L	0,0027 mM	
8	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 g/L	10 ml / L	0,19 mM	
9	Solución Metales Traza.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g/L	1 ml/L	46 mM
		MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	1.81 g/L		9 mM
		ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.22 g/L		0,77 mM
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.39 g/L		1,6 mM
		CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0.079 g/L		0,3 mM
		Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	49.4 mg/L		0,17 mM
10	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> • 5H <sub>2</sub> O	250 g/L	1 ml/L	1 mM	

# INFORME DE RESULTADOS

Habiendo cumplido con los protocolos y requisitos, cumpliendo con los criterios establecidos en la norma de análisis y bioseguridad (INEN-ISO), certifico mediante el siguiente informe que los resultados emitidos corresponden al valor real sin alteración mediante la custodia de las muestras receptadas.

Los resultados a continuación se detallan:

NOMBRE DE LA EMPRESA : LABORATORIO FORTIDEX S.A  
FECHA DE RECEPCIÓN : 02/09/2020  
NÚMERO DE MUESTRA : 0209/20  
IDENTIFICACIÓN DE MUESTRA : Cepa 003-INCYT-V4  
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO #1 : Recipiente Biomasa húmeda  
200 g  
FECHA DE EMISIÓN : 10/09/2020

MUESTRA #1	RESULTADO
Humedad	87,35%
Cenizas	5,36%
Grasas	0,06%
Proteína	7,2%

NOMBRE DE LA EMPRESA : LABORATORIO FORTIDEX S.A  
FECHA DE RECEPCIÓN : 06/09/2020  
NÚMERO DE MUESTRA : 0609/20  
IDENTIFICACIÓN DE MUESTRA : Cepa 003-INCYT-N3  
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO #2 : Empaque Biomasa húmeda  
120 g  
FECHA DE EMISIÓN : 18/09/2020

MUESTRA #2	RESULTADO
Humedad	87,89%
Cenizas	4,6%
Grasas	0,3%
Proteína	7,81%

Posorja, 23 de enero de 2021

FORTIDEX S.A

DATA-POSORJA

CI: 092990963-8  
*Reyes Lucero Issac de Jesus*

REYES LUCERO ISSAC DE JESUS  
TEC. LABORATORIO  
FORTIDEX S.A

**Gráfico 9.** Informe de resultados Análisis proximales de la Cepa PM003. Emitido por Fortidex

