

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Crecimiento en biomasa de *Nostoc* sp. como primer paso hacia la búsqueda de  
alternativas alimentarias para la niñez ecuatoriana**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Microbiología**

**ESTEFANY FABIANA QUIROZ ALVARADO**

Quito, 2024

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología de la señorita Estefany Fabiana Quiroz Alvarado ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

---

PhD. Diana Astorga García  
Directora de la Disertación  
Quito, 26 de junio 2024

## DEDICATORIA

Con profunda gratitud y sincero cariño, dedico esta tesis a aquellos que han sido mi pilar a lo largo de esta travesía académica:

A mis padres, Fabián, Liliana y Maritza, cuyo amor incondicional, sacrificios y sabias palabras me guiaron y me dieron la fuerza necesaria para nunca rendirme. Gracias por creer en mí incluso en los momentos de duda y por enseñarme el valor de la perseverancia y el trabajo duro. A mis hermanas, Daniela y Tatiana, mis cómplices de vida que, con su apoyo constante y su fe inquebrantable en mis capacidades, me inspiraron a seguir adelante. Su alegría y cariño han sido una fuente constante de motivación y esperanza. A mi pareja, Kevin, cuyo amor y comprensión me brindaron el refugio y la serenidad necesarios para superar los desafíos. Gracias por estar a mi lado en cada paso del camino, celebrando mis logros y consolándome en las dificultades. A mis amigos, Cristhian, Fiorella, Bianka y Jennifer, compañeros de sueños y aventuras, que con su aliento y camaradería hicieron de este viaje una experiencia más llevadera y enriquecedora. A mis mascotas, Aslan y Toby, por su leal compañía y alegría incondicional que han aliviado muchos momentos de estrés y cansancio. Vuestro apoyo y amistad han sido fundamentales para alcanzar esta meta.

A todos ustedes, les dedico este logro con profunda gratitud y amor sabiendo que, sin su apoyo inquebrantable, esta tesis no habría sido posible. Gracias por ser la luz en mi camino.

## AGRADECIMIENTOS

En la culminación de este trabajo, me es imposible dejar de expresar mi sincera gratitud a todas las personas que, con su apoyo, conocimiento y generosidad, hicieron posible la realización de esta tesis.

A Diana Astorga, por compartir desinteresadamente sus vastos conocimientos y materiales necesarios para mi disertación. Su apoyo constante y confianza en mis capacidades fueron esenciales para el desarrollo de este trabajo. Gracias por su paciencia y por creer en mí. A Bolívar Salas, por su invaluable ayuda con materiales y conocimientos. Su disposición para asistir y orientar fue una pieza clave en mi proceso de aprendizaje y en la culminación de esta investigación. Su generosidad y compromiso no pasarán desapercibidos. A Kelly López, por estar siempre dispuesta a resolver mis preguntas, sin importar cuán grandes o pequeñas fueran. Su paciencia y su disposición para ayudarme fueron un faro de luz en momentos de incertidumbre. A Magaly Estrella, por ser una guía excepcional y brindarme numerosas oportunidades a lo largo de mi carrera. Su dedicación y su capacidad para inspirar y motivar me han dejado una huella imborrable. Agradezco profundamente su orientación y su fe en mi potencial. A Gabriel Castro, por permitirme ser pasante y colaboradora en su laboratorio en Chile. La experiencia y los conocimientos adquiridos durante este tiempo fueron cruciales para mi formación académica y profesional. Su generosidad al compartir su espacio y sus recursos fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

A todos ustedes, les debo una profunda gratitud por su apoyo y generosidad. Este trabajo es el resultado de la colaboración, la guía y el aliento que me brindaron en cada etapa de este camino. Gracias por ser parte de este logro.

Esta investigación se enmarca en el contrato marco de acceso a recursos genéticos MAE-DNB-2019-0125-A sin el que no hubiera sido posible la investigación presentada.

## TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	VI
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	7
OBJETIVO GENERAL:.....	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4.1. MUESTREO.....	8
4.2. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>NOSTOC</i> SP.....	8
4.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	8
4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	9
4.4.1. DETERMINACIÓN DEL/DE LOS MEJORES TRATAMIENTOS PARA MAXIMIZAR LA BIOMASA DE <i>NOSTOC</i> SP.....	11
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	12
5. RESULTADOS.....	12
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	21
7. CONCLUSIONES.....	24
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

## LISTA DE FIGURAS, LISTA DE TABLAS Y LISTA DE ANEXOS

FIGURA 1. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA ESTIMACIÓN DE BIOMASA SECA EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	13
TABLA 1. PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> ..	13
FIGURA 2. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA ESTIMACIÓN DE FICOCIANINA EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	15
TABLA 2. PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA CUANTIFICACIÓN DE FICOCIANINA EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	15
FIGURA 3. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA ESTIMACIÓN DE ALOFICOCIANINA EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	16
TABLA 3. PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA CUANTIFICACIÓN DE ALOFICOCIANINA EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	17
FIGURA 4. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA ESTIMACIÓN DE FICOERITRINA EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	18
TABLA 4. PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA CUANTIFICACIÓN DE FICOERITRINA EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	18
FIGURA 5. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA ESTIMACIÓN DE CLOROFILA A EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	19
TABLA 5. PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA A EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	19
FIGURA 6. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA ESTIMACIÓN DE CAROTENOIDES EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	21
TABLA 6. PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES EN CULTIVOS DE <i>NOSTOC</i> SP. EN MEDIO LÍQUIDO BG11 Y BG11 <sub>0</sub> .....	21

## 1. RESUMEN

La desnutrición infantil en Ecuador es alarmante: afecta a una cuarta parte de los menores de cinco años. En un esfuerzo por encontrar soluciones sostenibles, se ha investigado el potencial de *Nostoc* sp., una cianobacteria versátil, en la producción de biomasa para combatir la malnutrición. El objetivo principal fue determinar las condiciones óptimas de incubación para la producción de biomasa algal de *Nostoc* sp. a escala de laboratorio. Se realizaron muestreos a lo largo de la vía Quito-Papallacta y se evaluaron características morfológicas de *Nostoc* sp., sometiéndolo a diferentes tratamientos en medios de cultivo sólidos y líquidos, con y sin nitrógeno. Los tratamientos en medio sólido se basaron en mediciones por cobertura vegetal. Por otro lado, los tratamientos en medio líquido hicieron posible estimar la evolución de la biomasa seca y la concentración de pigmentos hidrosolubles y liposolubles en el desarrollo de la cianobacteria. Los resultados mostraron que *Nostoc* sp. tiene una capacidad limitada de crecimiento en medios sólidos, pero puede crecer en medios líquidos sin diferencias significativas en la producción de biomasa seca entre tratamientos con y sin compuestos nitrogenados, destacando su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Sin embargo, se registró una mayor concentración de pigmentos liposolubles en presencia de compuestos nitrogenados. En conclusión, *Nostoc* sp. muestra potencial para la producción de biomasa en medios líquidos, lo que podría contribuir a soluciones sostenibles para la malnutrición infantil, aunque se necesitan más investigaciones para optimizar sus condiciones de cultivo.

Palabras clave: alimentación, biomasa, cianobacterias, desnutrición, pigmentos.

## 2. ABSTRACT

Child malnutrition in Ecuador is alarming: it affects a quarter of children under the age of five. In an effort to find sustainable solutions to combat malnutrition, the biomass production potential of *Nostoc* sp., a versatile cyanobacterium, was investigated. The main objective was to determine the optimal incubation conditions for the production of *Nostoc* sp. algal biomass at a laboratory scale. Sampling was conducted along the Quito-Papallacta route and morphological characteristics of *Nostoc* sp. were evaluated, subjecting it to different treatments in solid and liquid culture media, with and without nitrogen compounds. Treatments in solid media were based on measurements of vegetative coverage. On the other hand, treatments in liquid media were estimates of dry biomass and concentration of water-soluble and lipid-soluble pigments. Results showed that *Nostoc* sp. has limited growth capacity in solid media but can grow in liquid media without significant differences in dry biomass production between treatments with and without nitrogen compounds, highlighting its ability to fix atmospheric nitrogen. However, a higher concentration of lipid-soluble pigments was recorded in the presence of nitrogen compounds. In conclusion, *Nostoc* sp. shows potential for biomass production in liquid media, which could contribute to sustainable solutions for child malnutrition, although further research is needed to optimize its cultivation conditions.

Keywords: biomass, cyanobacteria, malnutrition, nutrition, pigments.

### 3. INTRODUCCIÓN

La situación de desnutrición y malnutrición infantil en Ecuador es alarmante. A pesar de que se ha observado una disminución generalizada de la desnutrición en el mundo, el caso de Ecuador es particularmente preocupante. Cerca de una cuarta parte de la población infantil menor de cinco años en el país sufre de desnutrición, una cifra que se encuentra cerca del doble del promedio latinoamericano (Rusydi et al., 2015). Esta situación se agrava aún más cuando se analiza por factores como etnia, provincia, quintil de ingreso y educación de la madre.

La malnutrición infantil, que abarca tanto la desnutrición como el sobrepeso y la obesidad, tiene efectos profundos en el desarrollo físico y cognitivo de los niños, lo que requiere una acción inmediata y efectiva (Rivera, 2019). En un mundo con una población en constante crecimiento y una creciente demanda de alimentos, es esencial explorar fuentes alternativas de alimentos que sean sostenibles. En ese sentido, surgen opciones microbianas interesantes como los microorganismos fotosintéticos: pueden cultivarse de manera eficiente y utilizar la luz solar como fuente de energía, lo que los hace una opción prometedora para la producción de alimentos (Aiyer et al., 2018).

Las cianobacterias y las microalgas tienen una capacidad única para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Esto significa que pueden cultivarse en diversas regiones y en una variedad de entornos, lo que las convierte en una opción versátil para la producción de alimentos en diferentes contextos geográficos y climáticos (Pekkoh et al., 2022). En comparación con la agricultura convencional, el cultivo de cianobacterias y microalgas suele requerir menos tierra, agua y recursos. Esto puede ayudar a reducir el impacto ambiental de la producción de alimentos y contribuir a la sostenibilidad a largo plazo (Celis-Plá et al., 2021). Además de su valor nutricional, estos organismos pueden producir una variedad de compuestos bioactivos con beneficios para la salud. Estos compuestos pueden incluir antioxidantes, agentes antibacterianos y más, lo que amplía su potencial utilidad en alimentos y suplementos nutricionales (Rosales et al., 2016).

*Nostoc* es un género de cianobacterias que ha recibido menos atención en comparación con otros géneros de microorganismos fotosintéticos (Torres-Maza et al., 2020). La mayoría de los estudios sobre cianobacterias se centran en aplicaciones

biotecnológicas más amplias, como biocombustibles o productos químicos industriales (Galetovic et al., 2017). Justamente, la biomasa de la cianobacteria *Nostoc* spp. ha emergido como un recurso multifacético y prometedor que encuentra aplicaciones en una variedad de campos, desde la biotecnología hasta la alimentación y la remediación ambiental (Devi y Parthiban, 2020). Su versatilidad se deriva de sus propiedades únicas y su capacidad para adaptarse a diferentes entornos (Mona et al., 2011).

Una de las características sobresalientes de *Nostoc* spp. es su capacidad para formar estructuras gelatinosas, un material adecuado para la impresión 3D de alimentos. Esta propiedad no solo permite la creación de alimentos con formas personalizadas, sino que también aporta propiedades nutricionales y reológicas deseables. Estudios han investigado específicamente la impresión 3D de *Nostoc sphaeroides* y han examinado su comportamiento en diferentes condiciones, como la incorporación de almidón y tratamientos de rehidratación. Estas investigaciones tienen el potencial de revolucionar la industria alimentaria al ofrecer opciones innovadoras para la preparación de alimentos (An et al., 2019).

Además de su función de fijación de nitrógeno, *Nostoc* sp. es conocido por establecer simbiosis con plantas, hongos y líquenes. Estas asociaciones permiten un intercambio beneficioso: *Nostoc* proporciona nutrientes, especialmente nitrógeno, a sus hospedadores, a la vez que recibe un ambiente propicio para su desarrollo. La capacidad de sus especies para establecer estas relaciones simbióticas amplía su influencia en la ecología de diversos hábitats (Celis-Plá et al., 2021; Gupta y Rastogi, 2008a).

*Nostoc* spp. también ha demostrado ser valiosa en la remediación ambiental. La especie *Nostoc linckia*, por ejemplo, ha destacado por su capacidad para acumular metales como cobre, hierro, níquel y zinc en sistemas contaminados (Cepoi et al., 2022; Lavado-Meza et al., 2022; Gururani et al., 2020). Este enfoque sostenible puede contribuir significativamente a la detoxificación de suelos y aguas contaminadas: esta cianobacteria ayuda a restaurar ecosistemas afectados por la actividad humana. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la alta tolerancia inicial de *Nostoc* spp. a los metales disminuye con la exposición continua, lo que implica la necesidad de considerar la durabilidad y la eficacia a largo plazo de su aplicación en la remediación (Gurani et al., 2020; Mona et al., 2011; Gupta y Rastogi, 2008b).

En el ámbito de la producción de biocombustibles y productos químicos, *Nostoc ellipso sporum* ha demostrado su potencial al ser cultivada exitosamente en aguas residuales municipales. En este contexto, no solo ofrece altos rendimientos de biomasa, sino que también permite la remoción eficiente de nutrientes y la producción de aceites valiosos. La optimización de condiciones de cultivo, como el uso de luz LED azul, fotoperíodos específicos y formulaciones de aguas residuales, ha sido fundamental para maximizar el crecimiento y la producción de *N. ellipso sporum*. Esta aplicación muestra cómo *Nostoc* spp. puede contribuir a soluciones sostenibles en la gestión de aguas residuales y la producción de recursos renovables (Devi y Parthiban, 2020).

La producción de biomasa de *Nostoc* spp. ha sido abordada desde diferentes perspectivas, como el uso de diferentes medios de cultivo modificados y sistemas de cultivo, además de invernaderos con condiciones controladas. Los resultados han sido prometedores, con incrementos significativos en la producción de biomasa y adaptación (Pekkoh et al., 2022; Saini et al., 2021). La composición de su biomasa varía según la especie y las condiciones de cultivo. También, depende del contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y otros compuestos. Además, se ha investigado la utilización de su biomasa residual para la producción de múltiples productos de valor añadido como biocombustibles, productos químicos y bioestimulantes agrícolas (Silambarasan et al., 2021).

Sin embargo, no todo es positivo en la historia de *Nostoc* spp. Un ejemplo es la tradicional Llayta, una biomasa seca de macrocolonias de *Nostoc* spp. que ha sido utilizada en la alimentación en comunidades andinas de Sudamérica (Sinzinger et al., 2022). Aunque posee nutrientes esenciales como aminoácidos y ácidos grasos insaturados, su contenido en arsénico plantea preocupaciones en términos de seguridad alimentaria. A medida que cambian las prácticas culturales y el conocimiento tradicional disminuye, la preservación de la Llayta como alimento tradicional se ve amenazada. Esto resalta la importancia de abordar las aplicaciones de *Nostoc* spp. con una perspectiva holística que considere tanto los beneficios como los riesgos potenciales (Galetovic et al., 2017).

En resumen, la biomasa de *Nostoc* spp. es un recurso altamente versátil con aplicaciones que abarcan desde la impresión 3D de alimentos hasta la remediación ambiental y la producción de biocombustibles. Su capacidad para formar estructuras gelatinosas y

adaptarse a diferentes entornos le confiere un valor significativo en múltiples industrias. Sin embargo, es esencial abordar los desafíos asociados, como la acumulación de metales, la seguridad alimentaria y la conservación de prácticas culturales tradicionales. Al aprovechar el potencial de la biomasa de *Nostoc* spp. de manera equilibrada y sostenible, se puede avanzar hacia un futuro donde este recurso sea una contribución valiosa para la sociedad y el medio ambiente, siempre y cuando se logren solventar las dificultades para su escalamiento.

En efecto, la producción de biomasa de *Nostoc* presenta varios desafíos significativos en su cultivo. Esta cianobacteria muestra una baja tasa de crecimiento y un patrón anormal de desarrollo cuando se cultiva en un medio líquido sin soporte, lo que conduce a una tendencia de las células a adherirse entre sí, formando biopelículas y migrando hacia áreas con escasez de medio de cultivo. Esta situación provoca despigmentación, muerte celular acelerada debido a la escasez de nutrientes y una inadecuada formación de su envoltura mucilaginoso, lo que facilita la degradación por parte de bacterias y hongos oportunistas (Celis-Plá et al., 2021).

Los sistemas de cultivo tradicionales, como estanques con canales de rodadura y fotobiorreactores, no resultan óptimos para *Nostoc*. Estos métodos requieren de la agitación que conduce a la adherencia celular no deseada y a la migración, lo que a su vez limita el crecimiento celular y la producción de biomasa. Superar estas dificultades demanda el empleo de un sustrato sólido inerte que permita la adhesión de microalgas perifíticas y facilite un crecimiento óptimo y una producción efectiva de biomasa. Asimismo, se requiere un sistema de cultivo que posibilite un intercambio eficiente de calor y nutrientes para alcanzar una alta tasa de crecimiento (Ortiz Moreno et al., 2020; Liang et al., 2022).

El análisis detallado de *Nostoc* revela una riqueza de nutrientes esenciales. Esto lo posiciona como un recurso prometedor para abordar la desnutrición (Temina et al., 2007; Li y Guo, 2018). La composición diversa de proteínas, péptidos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales y otros compuestos bioactivos sugiere su potencial para la creación de alimentos funcionales (Yue et al., 2011; Zhu et al., 2023). Considerando la alta proporción de nutrientes críticos como aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas, este organismo se perfila como una opción atractiva para el desarrollo de barras nutricionales o productos alimentarios fortificados. Esto se alinea con el estudio sobre el crecimiento en biomasa de

*Nostoc*. El entendimiento de su composición nutricional puede allanar el camino para la creación de alimentos dirigidos a combatir la desnutrición infantil.

La evaluación del crecimiento en biomasa de *Nostoc* no solo permite comprender su potencial como alimento, sino que también sienta las bases para futuras investigaciones destinadas a desarrollar productos alimenticios especializados que puedan ser beneficiosos para la niñez y contribuir a solventar el problema de desnutrición (Ortiz-Moreno et al., 2020). La inclusión de *Nostoc* en la dieta de niños en edad escolar podría tener un impacto positivo en su estado nutricional (Méndez-Ancca et al., 2023; Kaleem et al., 2023). En efecto, resultados preliminares de la investigación publicada por Morales y Villarroel (2017) indican que el consumo de esta cianobacteria como suplemento alimenticio ayuda a incrementar de forma significativa el peso de niños. Esto sugiere que *Nostoc* podría representar una opción viable para combatir la malnutrición infantil, especialmente en comunidades con necesidades alimentarias no satisfechas, como las de la zona andina del Ecuador.

### **3.1. OBJETIVOS**

#### **3.1.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar las condiciones de incubación más aptas para la producción de biomasa algal de *Nostoc* sp. a escala laboratorio.

#### **3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Examinar el crecimiento de *Nostoc* sp. sometido a tratamientos en medios de cultivo sólidos y líquidos con presencia o ausencia de nitrógeno a escala laboratorio mediante la cuantificación de biomasa y observaciones microscópicas.

Establecer las mejores condiciones para la optimización de la producción de biomasa en *Nostoc* sp. a escala laboratorio.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. MUESTREO**

Los muestreos se realizaron en diferentes puntos a lo largo de la vía Quito-Papallacta, en las coordenadas (0°22'58.2" S 78°11'39.2" W), dentro de los límites de la provincia de Pichincha. Las muestras de *Nostoc* sp. se obtuvieron de sustratos terrestres, colonias desarrolladas tanto a lo largo de la carretera como en áreas de césped, así como entre musgos y rocas húmedas. Las colonias se colectaron manualmente y se depositaron en fundas herméticas para ser transportadas al laboratorio de Ficología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. En el laboratorio, se eliminaron elementos no pertenecientes a las macrocolonias de *Nostoc* sp., tales como pequeñas piedras, restos vegetales e insectos (Cadena et al., 2013).

### **4.2. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *NOSTOC* SP.**

Se caracterizaron las distintas colonias recolectadas, clasificándolas según su relación con el sustrato. Esta caracterización incluyó la evaluación de la textura, color, tamaño y apariencia. Además, se observaron estructuras características de las cianobacterias, como heterocistos, acinetos y células vegetativas, con la ayuda de un microscopio óptico marca Olympus. En los sitios muestreados del páramo de Papallacta, se clasificaron las colonias obtenidas a partir de los morfotipos del género *Nostoc* que pudieran presentarse (Cadena et al., 2013): esférico-gelatinoso (I), amorfo-gelatinoso (II), verrugoso verde (III), verrugoso negro (IV), globoso (V) y granuloso-gelatinoso (VI).

### **4.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

Para preparar el inóculo, se homogenizaron 62,5 g de biomasa, del morfotipo verrugoso verde, con 500 ml de medio BG11 (con nitrógeno) (Cadena et al., 2013). Esta cepa se seleccionó por ser comúnmente encontrada en el campo, en contenedores de plástico, lonas de invernadero o suelos de distintos tipos (Laughinghouse et al., 2019). La cepa fue sometida a todos los tratamientos propuestos.

#### 4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Dado que *Nostoc* forma colonias perifíticas, aerofíticas y fitoplanctónicas que pueden ser o no fijadoras de nitrógeno (Sand-Jensen, 2014), se realizaron ensayos por triplicado en medios líquidos y sólidos con y sin nitrógeno, con cuatro tratamientos a dos niveles cada uno.

Para los tratamientos en medio sólido, con (BG11) y sin nitrógeno (BG11<sub>0</sub>), se marcó el centro de cada caja Petri (unidad experimental). Con una micropipeta, se tomaron 200 µl de inóculo y se sembraron en el punto marcado (Cadena et al., 2013). La variable dependiente en medios sólidos fue la cobertura o área ocupada por la cepa respecto al área total de la placa Petri. Se midió el radio de crecimiento de las cepas de *Nostoc* sp. en cada caja Petri tres veces a la semana durante dos meses (Memoli et al., 2022), tomando como punto central el lugar donde se sembró el inóculo. Las medidas resultantes se registraron en una hoja de cálculo en Microsoft Excel para el análisis estadístico.

Para los tratamientos en medios líquidos BG11 y BG11<sub>0</sub>, se sembraron 65 ml del inóculo preparado en cada uno de los seis Erlenmeyers de 500 mL con 300 mL del medio respectivo. Los cultivos se mantuvieron con aireación las 24 horas con un fotoperíodo de 12:12 horas (Cadena et al., 2013).

La variable dependiente en medios líquidos fue el crecimiento de *Nostoc* en términos de biomasa seca y concentración de los pigmentos: clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas. Para la extracción de clorofila *a* y carotenoides, se centrifugaron 15 ml del cultivo respectivo a 5500 rpm por 15 minutos (Morales, 2012). El sedimento se resuspendió en 4 ml de metanol y se centrifugó nuevamente, para luego medir la absorbancia de la clorofila *a* en el sobrenadante a 665 nm y determinar su concentración según Marker (1972). El contenido de carotenoides se analizó en la misma extracción, determinando la absorbancia a 480 nm y aplicando la ecuación de Britton (1985).

La extracción de ficobiliproteínas se realizó mediante el método de choque osmótico modificado de Wyman y Fay (1986). Se centrifugaron 15 mL del cultivo respectivo a 4000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron cuatro gotas de glicerol. La muestra se colocó bajo congelación por 30 minutos y, luego, se agregaron 4 mL de agua

destilada. El sedimento se sometió a un proceso de congelación/descongelación por 30 minutos por tres ocasiones. Se centrifugó nuevamente la muestra y el sobrenadante obtenido se analizó a 652, 615 y 562 nm en un espectrofotómetro. La concentración de ficobiliproteínas se determinó según la ecuación de Bennett y Bogorad (1973) y el contenido de todos los pigmentos se expresó en  $\mu\text{g/ml}$ . El peso seco se estimó siguiendo el protocolo de Morales (2012). Se tomaron 10 mL de cada réplica para ser filtrados con un embudo Buchner y una bomba de vacío. Antes de filtrar la muestra, el filtro de 90 mm fue envuelto en papel aluminio y colocado en cajas Petri de vidrio para ser secado a  $80^{\circ}\text{C}$  por cuatro horas hasta obtener un peso constante. La muestra de *Nostoc* sp. fue homogenizada en un vórtex y, luego, filtrada en los instrumentos antes mencionados. Estos procedimientos se realizaron tres veces a la semana durante 18 días.

El cálculo de las concentraciones de los diferentes pigmentos se realizó mediante las ecuaciones propuestas por Marker (1972) para clorofila *a*, Britton (1985) para carotenoides, Bennett y Bogorad (1973) para ficobiliproteínas y Morales (2012) para peso seco:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = [(13,14 \times A_{665}) \times \text{VE}] / \text{VM}$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g/mL)} = [(A_{480} \times 4) \times \text{VE}] / \text{VM}$$

$$\text{Ficocianina (mg/mL)} = [(\text{DO}_{652} - (\text{DO}_{615} \times 0,208))] / 5,09 \times \text{VE/VM}$$

$$\text{Aloficocianina (mg/mL)} = [(\text{DO}_{615} - (\text{DO}_{652} \times 0,474))] / 5,34 \times \text{VE/VM}$$

$$\text{Ficoeritrina (mg/mL)} = [(\text{DO}_{562} - (\text{FC} \times 2,41) - (\text{AFC} \times 0,849))] / 5,34 \times \text{VE/VM}$$

$$\text{PST (}\mu\text{g/mL)} = [(\text{PSFM}) - \text{PSF}] / \text{VF}$$

Donde:

PST: Peso seco total en  $\mu\text{g/mL}$

PSFM: Peso seco del filtro con muestra

PSF: Peso seco del filtro sin muestra

VE: Volumen del extracto

VF: Volumen de la muestra filtrada

VM: Volumen de la muestra

Se realizaron curvas de calibración de los pigmentos para asegurar precisión y exactitud de los datos obtenidos. Los resultados se registraron en una hoja de cálculo en

Microsoft Excel y se confeccionaron curvas de evolución de la biomasa seca y los pigmentos durante el periodo de experimentación para fines comparativos (Kumar et al., 2011).

#### **4.4.1. DETERMINACIÓN DE LOS MEJORES TRATAMIENTOS PARA MAXIMIZAR LA BIOMASA DE *NOSTOC SP.***

Para determinar los mejores tratamientos, se calculó la velocidad de crecimiento ( $\mu$ : mg o  $\mu\text{g/mL}$  según corresponda) y el tiempo de duplicación (días). Los resultados respectivos se incluyeron en una hoja de cálculo y se elaboró una gráfica de la curva de crecimiento promedio. En el eje vertical, se indicó el parámetro de crecimiento seleccionado en cada experimento, mientras que en el eje horizontal se indicó la edad del cultivo (días).

Según el protocolo de Morales (2012), para calcular  $\mu$  se seleccionaron dos puntos del muestreo que correspondieron al inicio y final de la fase de crecimiento exponencial, uno de los cuales coincidió con el valor inicial del eje vertical ( $X_1$ ) y el otro con el máximo valor alcanzado durante esta fase en el eje horizontal ( $X_2$ ). Por otra parte,  $t_1$  y  $t_2$  correspondieron al tiempo en que se alcanzaron  $X_1$  y  $X_2$ , respectivamente. Luego, para calcular  $\mu$  se aplicó la siguiente fórmula:

$$\mu = \text{Ln} (X_2 - X_1) / t_2 - t_1$$

Una vez obtenida  $\mu$ , se procedió a determinar el tiempo de duplicación ( $t_d$ ), con la siguiente fórmula:

$$T_d = \text{Ln}^2 / \mu$$

con  $\text{Ln}^2 = 0,693$

#### **4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Se llevaron a cabo análisis estadísticos utilizando el software Python para determinar la significancia de la diferencia entre los tratamientos aplicados. Para este propósito, se consideró el valor de probabilidad de prueba (*p-value*). Un *p-value* superior a 0,05 indicó que no existían diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que un *p-value* inferior a 0,05 señaló que los tratamientos presentaban diferencias significativas.

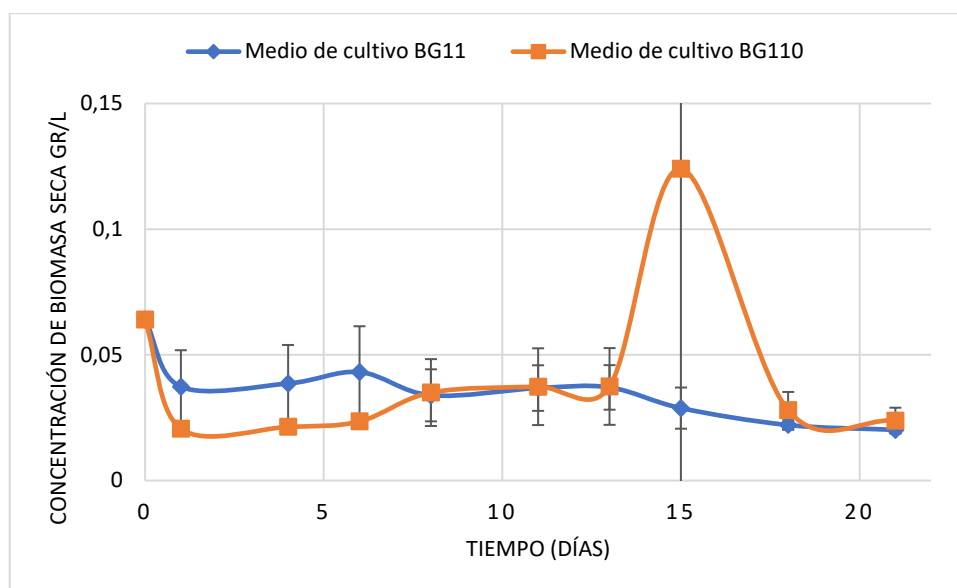
Estas pruebas estadísticas permitieron evaluar rigurosamente las variaciones observadas en las mediciones de biomasa y pigmentos, garantizando la validez de las conclusiones derivadas del experimento.

## 5. RESULTADOS

En el cultivo líquido enriquecido con compuestos nitrogenados (BG11), la biomasa seca presentó un prolongado periodo de adaptación que persistió a lo largo de los 21 días del experimento. Inicialmente, en el día 0, la biomasa promedio en BG11 fue de  $0.0641 \pm 0$  g/L. No obstante, el crecimiento máximo se observó en el día 6, alcanzando  $0.0432 \pm 0.0182$  g/L ( $gl_6 = 4$ ;  $t_6 = 1.86$ ;  $p_6 = 0.200 > 0.05$ ). Después, comenzó una fase de declive que continuó hasta la desaparición de *Nostoc* sp. en el día 21.

Por el contrario, en el medio de cultivo líquido sin compuestos nitrogenados (BG11<sub>0</sub>), que inició con una concentración de biomasa seca de  $0.0641 \pm 0$  g/L, se evidenció una fase de latencia durante los primeros 13 días. La fase de crecimiento exponencial ocurrió entre los días 11 y 15, alcanzando una concentración de  $0.1240 \pm 0.1588$  g/L ( $gl_{15} = 4$ ;  $t_{13} = -1.37$ ;  $p_{15} = 0.408 > 0.05$ ). Posteriormente, se observó una disminución en la biomasa hasta el día 21, marcando la última observación de *Nostoc* sp. en este medio. Ninguno de los tratamientos mostró una superioridad estadística significativa en algún momento (Tabla 1 y Figura 1).

En contraste con los medios líquidos, los cultivos sólidos de BG11 y BG11<sub>0</sub> no mostraron crecimiento de *Nostoc* sp. durante todo el experimento. El diámetro de inoculación inicial fue de  $0.08 \pm 0$  mm en BG11 y  $0.09 \pm 0$  mm en BG11<sub>0</sub>. *Nostoc* sp. solo estuvo presente en las placas Petri durante la primera semana del ensayo. Es relevante mencionar que el inóculo inicial en el medio sólido se derivó de la muestra homogeneizada con BG11 el día de la configuración del ensayo.



**Figura 1.** Evolución de la biomasa seca en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

**Tabla 1.**

Promedio y desviación estándar de la cuantificación de biomasa en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

Día	Promedio del peso seco de la biomasa en BG11 (gr/L)	DV del peso seco de la biomasa en BG11	Promedio del peso seco de la biomasa BG11 <sub>0</sub> (gr/L)	DV del peso seco de la biomasa en BG11 <sub>0</sub>
0	0,0641	0,0000	0,0641	0,0000
1	0,0374	0,0145	0,0206	0,0003
4	0,0386	0,0153	0,0214	0,0013
6	0,0432	0,0182	0,0235	0,0015
8	0,0339	0,0104	0,0350	0,0133
11	0,0368	0,0091	0,0373	0,0153
13	0,0371	0,0089	0,0374	0,0153
15	0,0288	0,0082	0,1240	0,1588
18	0,0221	0,0019	0,0280	0,0073
21	0,0202	0,0012	0,0238	0,0052

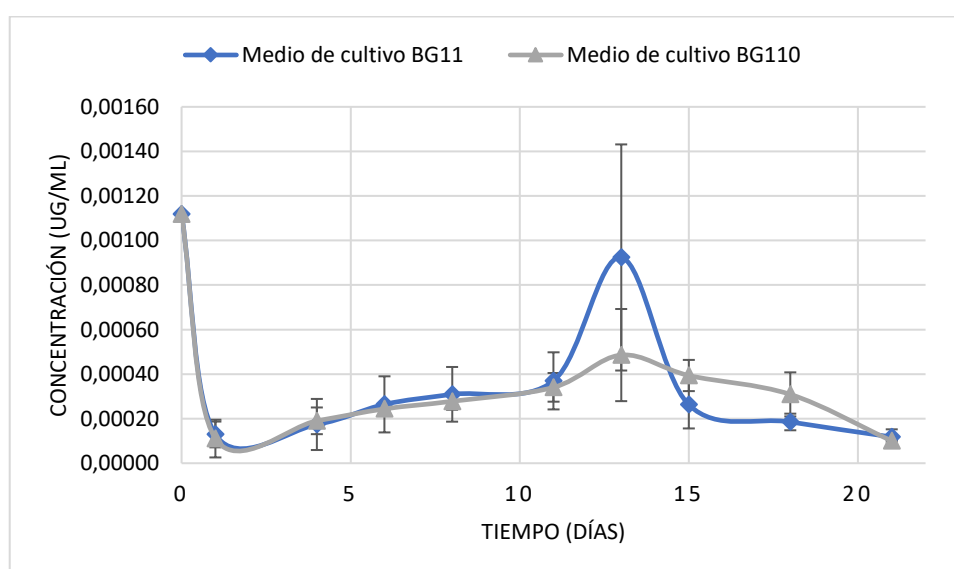
DV, Desviación estándar.

En el cultivo líquido con compuestos nitrogenados (BG11), la concentración de ficocianina presentó una fase de latencia durante los primeros ocho días. Al inicio, en el día 0, la concentración promedio fue de  $0.00112 \pm 0$  mg/mL. Una fase exponencial se observó del día 11 al 13, alcanzando una concentración máxima de  $0.00092 \pm 0.00051$  mg/mL. A

partir de este punto, comenzó una fase de declive hasta la desaparición de *Nostoc* sp. en el día 21. La velocidad de crecimiento fue de 0.693 mg/mL y el tiempo de duplicación fue de 1.00 día.

En el medio sin compuestos nitrogenados (BG11<sub>0</sub>), con una concentración inicial de  $0.00112 \pm 0$  mg/mL, la fase de latencia fue de 11 días. La fase de crecimiento exponencial se produjo entre los días 11 y 13, alcanzando una concentración máxima de  $0.00049 \pm 0.00021$  mg/mL ( $g_{13} = 4$ ;  $t_{13} = 0.131$ ;  $p_{13} = 0.742 > 0.05$ ). Después del día 13, la población disminuyó, coincidiendo con el día 21, último día de observación de *Nostoc* sp. La velocidad de crecimiento fue de 9,64 mg/mL y el tiempo de duplicación fue de 0,072 días. Tampoco se observó una superioridad significativa en ninguno de los tratamientos en ningún día (Tabla 2 y Figura 2).

En cuanto a la aloficocianina, en BG11, se observó una fase de latencia durante los primeros 11 días. La concentración inicial promedio fue de  $0.00094 \pm 0$  g/mL. Entre los días 11 y 13 se registró una fase exponencial, con una concentración máxima de  $0.00071 \pm 0.00036$  mg/mL. Posteriormente, comenzó una fase de declive hasta la desaparición de *Nostoc* sp. en el día 21. La velocidad de crecimiento fue de 0.693 mg/mL y el tiempo de duplicación es de 1.00 día.



**Figura 2.** Evolución de la ficocianina en cultivos de *Nostoc* sp. en medios líquidos BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

**Tabla 2.**

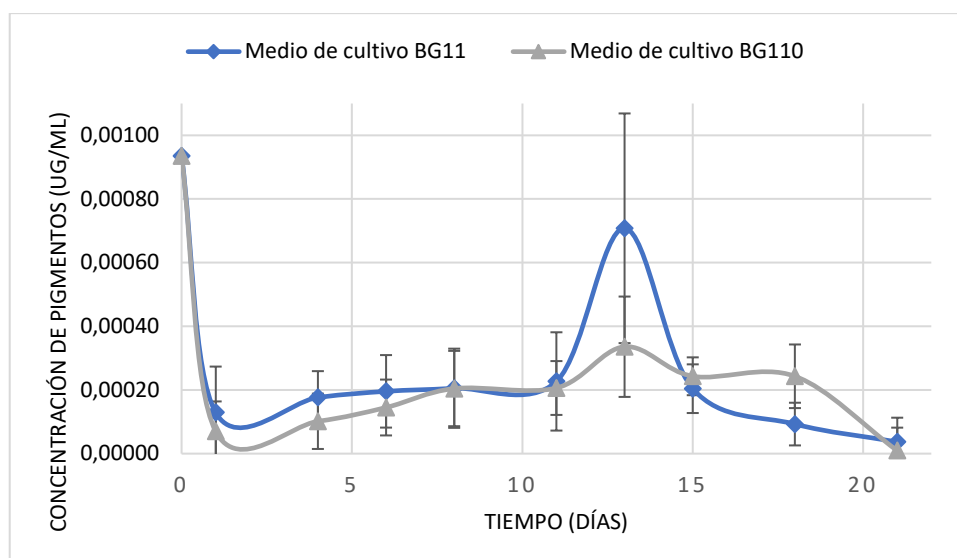
Promedio y desviación estándar de la concentración de ficocianina en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

Día	Promedio de la concentración de ficocianina en BG11 (ug/mL)	DV de la concentración de ficocianina en BG11	Promedio de la concentración de ficocianina en BG11 <sub>0</sub> (ug/mL)	DV de la concentración de ficocianina en BG11 <sub>0</sub>
0	0,00112	0,00000	0,00112	0,00000
1	0,00013	0,00006	0,00011	0,00008
4	0,00017	0,00011	0,00019	0,00006
6	0,00026	0,00013	0,00024	0,00001
8	0,00031	0,00012	0,00028	0,00004
11	0,00037	0,00013	0,00034	0,00006
13	0,00092	0,00051	0,00049	0,00021
15	0,00026	0,00011	0,00039	0,00007
18	0,00019	0,00004	0,00031	0,00010
21	0,00012	0,00003	0,00010	0,00000

DV, Desviación estándar.

En BG11<sub>0</sub>, con una concentración inicial de  $0.00094 \pm 0$  mg/mL, la fase de latencia duró 11 días. La fase exponencial se extendió del día 11 hasta el día 13, alcanzando una concentración máxima de  $0.00034 \pm 0.00016$  mg/mL ( $gl_{13} = 4$ ;  $t_{13} = 0.377$ ;  $p_{13} = 0.324 > 0.05$ ). Después del día 13, se observó una disminución hasta el día 15, seguida de una fase estacionaria hasta el día 18. Posterior a ello, se registró la fase de muerte hasta el día 21, cuando *Nostoc* sp. desapareció del medio. La velocidad de crecimiento fue de 9.707 mg/mL y el tiempo de duplicación fue de 0.071 días. Ningún tratamiento mostró superioridad estadística significativa en ningún momento de la experimentación (Tabla 3 y Figura 3).

La concentración de ficoeritrina en BG11 mostró una fase de latencia durante los primeros 11 días, con una concentración inicial de  $0.00049 \pm 0$  mg/mL. La fase exponencial ocurrió entre los días 11 y 13, con una concentración máxima de  $0.00127 \pm 0.00074$  mg/mL, seguida de una fase de declive hasta la desaparición de *Nostoc* sp. en el día 21. La velocidad de crecimiento fue de 0,693 mg/mL y el tiempo de duplicación fue de 1,00 día.



**Figura 3.** Evolución de la concentración de aloficocianina en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

**Tabla 3.**

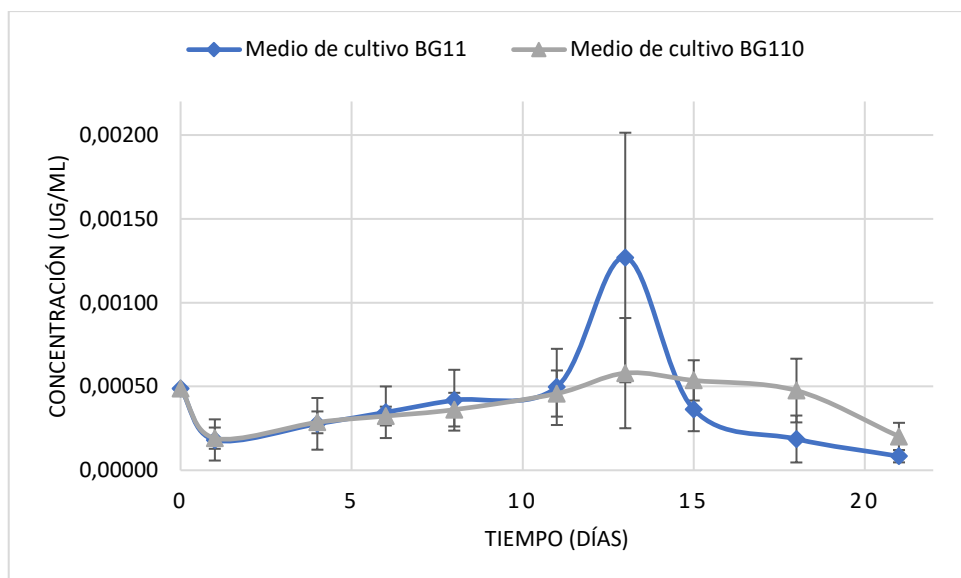
Promedio y desviación estándar de la concentración de aloficocianina en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

Día	Promedio de la concentración de aloficocianina en BG11 (ug/mL)	DV de la concentración de aloficocianina en BG11	Promedio de la concentración de aloficocianina en BG11 <sub>0</sub> (ug/mL)	DV de la concentración de aloficocianina en BG11 <sub>0</sub>
0	0,00094	0,00000	0,00094	0,00000
1	0,00013	0,00014	0,00007	0,00009
4	0,00018	0,00008	0,00010	0,00009
6	0,00020	0,00011	0,00014	0,00009
8	0,00021	0,00012	0,00020	0,00012
11	0,00023	0,00015	0,00021	0,00008
13	0,00071	0,00036	0,00034	0,00016
15	0,00020	0,00008	0,00024	0,00006
18	0,00009	0,00007	0,00024	0,00010
21	0,00004	0,00008	0,00001	0,00007

DV, Desviación estándar.

En BG11<sub>0</sub>, con una concentración inicial de  $0.00049 \pm 0$  mg/mL, la fase de latencia duró 11 días, seguida de una fase exponencial del día 11 al 13, alcanzando  $0.00058 \pm 0.00033$  mg/mL ( $g_{13} = 4$ ;  $t_{13} = 0.467$ ;  $p_{13} = 0.444 > 0.05$ ). Posteriormente, se observó una

disminución hasta el día 21, sin superioridad significativa entre tratamientos (Tabla 4 y Figura 4). La velocidad de crecimiento fue de 9.707 mg/mL y el tiempo de duplicación fue de 0.071 días.



**Figura 4.** Evolución de la concentración de ficoeritrina en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

**Tabla 4.**

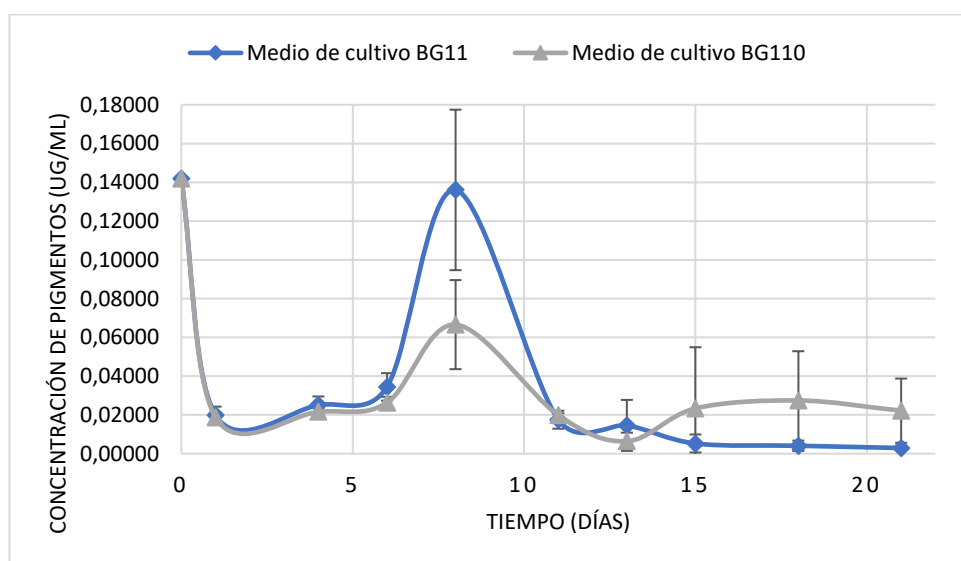
Promedio y desviación estándar de la concentración de ficoeritrina en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

Día	Promedio de la concentración de ficoeritrina en BG11 (ug/mL)	DV de la concentración de ficoeritrina en BG11	Promedio de la concentración de ficoeritrina en BG11 <sub>0</sub> (ug/mL)	DV de la concentración de ficoeritrina en BG11 <sub>0</sub>
0	0,00049	0,00000	0,00049	0,00000
1	0,00018	0,00012	0,00019	0,00006
4	0,00028	0,00015	0,00029	0,00007
6	0,00035	0,00015	0,00032	0,00006
8	0,00042	0,00018	0,00036	0,00010
11	0,00050	0,00023	0,00046	0,00014
13	0,00127	0,00074	0,00058	0,00033
15	0,00036	0,00013	0,00054	0,00012
18	0,00019	0,00010	0,00048	0,00013
21	0,00008	0,00004	0,00020	0,00008

DV, Desviación estándar.

En el caso de la clorofila *a*, en BG11, la fase de latencia se observó durante los primeros seis días, con una concentración inicial de  $0.14191 \pm 0 \mu\text{g/mL}$ . La fase exponencial se produjo entre los días 6 y 8, alcanzando una concentración máxima de  $0.13607 \pm 0.04140 \mu\text{g/mL}$ , seguida de una fase de declive hasta el día 21, cuando *Nostoc* sp. desapareció. La velocidad de crecimiento fue de  $0.641 \mu\text{g/mL}$  y el tiempo de duplicación fue de 1.081 días.

En BG11<sub>0</sub>, con una concentración inicial de  $0.14191 \pm 0 \mu\text{g/mL}$ , la fase de latencia duró seis días, seguida de una fase exponencial del día 6 al 8, alcanzando  $0.06658 \pm 0.02298 \mu\text{g/mL}$  ( $g_{l8} = 4$ ;  $t_8 = 2.54$ ;  $p_8 = 0.04 < 0.05$ ). En el día 8, se observa una mayor concentración de clorofila *a* en BG11 que en BG11<sub>0</sub>. Luego, se observó una disminución hasta el día 13 y, a continuación, un incremento hasta el día 18, con una concentración de  $0.02745 \pm 0.02541 \mu\text{g/mL}$  ( $g_{l18} = 4$ ;  $t_{18} = -1.58$ ;  $p_{18} = 0.251 > 0.05$ ) y otra disminución hasta el día 21, sin superioridad estadística significativa (Tabla 5 y Figura 5). La velocidad de crecimiento fue de  $3.905 \mu\text{g/mL}$  y el tiempo de duplicación fue de 0.177 días.



**Figura 5.** Evolución de la concentración de clorofila *a* en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

Finalmente, la concentración de carotenoides, en BG11, mostró una fase de latencia durante los primeros seis días, con una concentración inicial de  $0.06880 \pm 0 \mu\text{g/mL}$ . La fase exponencial ocurrió entre los días 6 y 8, alcanzando  $0.07644 \pm 0.01525 \mu\text{g/mL}$ , seguida de una fase de declive hasta el día 21. La velocidad de crecimiento fue de  $0.641 \mu\text{g/mL}$  y el tiempo de duplicación fue de 1.081 días.

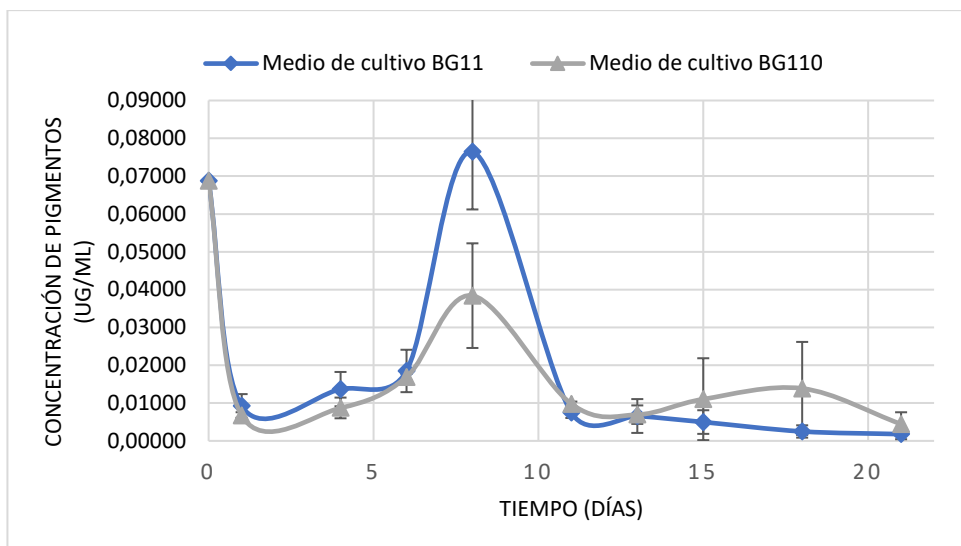
**Tabla 5.**

Promedio y desviación estándar de la concentración de clorofila *a* en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

Día	Promedio de la concentración de clorofila <i>a</i> en BG11 (µg/mL)	DV de la concentración de clorofila <i>a</i> en BG11	Promedio de la concentración de clorofila <i>a</i> en BG11 <sub>0</sub> (µg/mL)	DV de la concentración de clorofila <i>a</i> en BG11 <sub>0</sub>
0	0,14191	0,00000	0,14191	0,00000
1	0,01986	0,00441	0,01869	0,00268
4	0,02511	0,00441	0,02161	0,00202
6	0,03446	0,00708	0,02628	0,00303
8	0,13607	0,04140	0,06658	0,02298
11	0,01752	0,00464	0,01986	0,00101
13	0,01460	0,01315	0,00642	0,00441
15	0,00526	0,00464	0,02336	0,03155
18	0,00409	0,00268	0,02745	0,02541
21	0,00292	0,00101	0,02219	0,01656

DV, Desviación estándar.

En BG11<sub>0</sub>, con una concentración inicial de  $0.06880 \pm 0$  µg/mL, la fase de latencia duró seis días, seguida de una fase exponencial del día 6 al 8, alcanzando  $0.03840 \pm 0.01384$  µg/mL ( $g_{l8} = 4$ ;  $t_8 = 3.20$ ;  $p_6 = 0.03 < 0.05$ ). En el día 8, BG11 registra una mayor concentración de carotenoides que BG11<sub>0</sub>. Posteriormente, se observó una disminución hasta el día 13, un incremento hasta el día 18 con una concentración de  $0.02745 \pm 0.02541$  µg/mL ( $g_{l18} = 4$ ;  $t_{18} = -1.58$ ;  $p_{18} = 0.250 > 0.05$ ) y otra disminución hasta el día 21, sin superioridad estadística significativa (Tabla 6 y Figura 6). La velocidad de crecimiento fue de 3.905 µg/mL y el tiempo de duplicación fue de 0.177 días.



**Figura 6.** Evolución de la concentración de carotenoides en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

**Tabla 6.**

Promedio y desviación estándar de la concentración de carotenoides en cultivos de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11 y BG11<sub>0</sub> a lo largo de 21 días

Día	Promedio de la concentración de carotenoides en BG11 (µg/mL)	DV de la concentración de carotenoides en BG11	Promedio de la concentración de carotenoides en BG11 <sub>0</sub> (µg/mL)	DV de la concentración de carotenoides en BG11 <sub>0</sub>
0	0,06880	0,00000	0,06880	0,00000
1	0,00924	0,00313	0,00676	0,00081
4	0,01369	0,00454	0,00871	0,00274
6	0,01849	0,00560	0,01689	0,00081
8	0,07644	0,01525	0,03840	0,01384
11	0,00747	0,00141	0,00978	0,00062
13	0,00658	0,00447	0,00693	0,00244
15	0,00498	0,00313	0,01102	0,01083
18	0,00249	0,00163	0,01387	0,01230
21	0,00178	0,00134	0,00444	0,00313

DV, Desviación estándar.

## 6. DISCUSIÓN

En el estudio, no se observó crecimiento de *Nostoc* sp. en medio de cultivo BG11 sólido, independientemente de la presencia de compuestos nitrogenados. Asimismo, no hubo diferencias significativas en la producción de biomasa seca ni en la concentración de pigmentos hidrosolubles (ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina) entre los tratamientos con medio de cultivo BG11 líquido con y sin compuestos nitrogenados. Sin embargo, se registró una mayor concentración de pigmentos liposolubles (clorofila *a* y carotenoides) en el tratamiento con medio de cultivo BG11 líquido que contenía compuestos nitrogenados, en comparación con los tratamientos desprovistos de estos compuestos.

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio de diferentes variables de crecimiento en cultivos de *Nostoc* sp. en medio de cultivo BG11 sólido, en presencia o ausencia de compuestos nitrogenados, proporciona una visión profunda sobre la influencia de estos compuestos en la producción de biomasa seca y la concentración de pigmentos liposolubles e hidrosolubles. El hecho de que *Nostoc* sp. no mostrara crecimiento en medios sólidos con o sin compuestos nitrogenados indica que estas cianobacterias pueden tener requerimientos específicos no satisfechos en estos medios.

Este fenómeno ha sido observado en estudios previos donde cianobacterias como *Nostoc linckia* y *Nostoc commune* han mostrado crecimiento óptimo en medios líquidos bajo condiciones controladas, pero un rendimiento significativamente menor en medios sólidos (Rivera, 2019; Cepoi et al., 2022; Gupta y Rastogi, 2008b). Esto puede deberse a la naturaleza de los medios sólidos que no permiten la difusión adecuada de nutrientes o a la incapacidad de las cianobacterias para colonizar eficazmente una superficie sólida sin condiciones de humedad y sustrato adecuadas.

En cuanto a la producción de biomasa seca en medio de cultivo líquido, la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos con y sin compuestos nitrogenados sugiere que *Nostoc* sp. tiene una capacidad inherente para fijar nitrógeno atmosférico, un rasgo bien documentado en otros estudios sobre cianobacterias. Por ejemplo, investigaciones han demostrado que *Nostoc* sp. puede fijar nitrógeno en ausencia de fuentes exógenas, lo que le permite sobrevivir y crecer en entornos pobres en nitrógeno (Devi y Parthiban, 2020;

Saini et al., 2021; Silambarasan et al., 2021). Este rasgo adaptativo es clave para su supervivencia en hábitats terrestres donde la disponibilidad de nitrógeno puede ser limitada.

La diferencia en la concentración de pigmentos liposolubles, como la clorofila *a* y los carotenoides, en medios de cultivo líquido con compuestos nitrogenados destaca la importancia del nitrógeno en la síntesis de estos pigmentos. Los pigmentos liposolubles son esenciales para la fotosíntesis y la protección contra el estrés oxidativo. Estudios previos han demostrado que la disponibilidad de nitrógeno puede aumentar la producción de clorofila y carotenoides, mejorando así la capacidad fotosintética y la tolerancia al estrés de las cianobacterias (Celis-Plá et al., 2021; Ortiz Moreno et al., 2020; Zhu et al., 2023). Esto es consistente con los resultados obtenidos, donde los medios enriquecidos con nitrógeno mostraron una mayor concentración de estos pigmentos.

Por otro lado, la producción constante de pigmentos hidrosolubles como ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina en medio de cultivo líquido, independientemente de la presencia de compuestos nitrogenados, sugiere que estos pigmentos tienen una función más fundamental y menos dependiente de la disponibilidad de nitrógeno. Los pigmentos hidrosolubles son componentes indispensables del ficobilisoma, el complejo proteico que captura la luz para la fotosíntesis. La producción constante de estos pigmentos puede indicar su papel esencial en la fotosíntesis y la adaptación a cambios en la disponibilidad de luz (Méndez-Ancca et al., 2023; Rosales et al., 2016; Galetovic et al., 2017).

La condición de simbiosis con plantas en el sustrato terrestre de donde se recogió la muestra también puede influir significativamente en el comportamiento de *Nostoc* sp. en condiciones de laboratorio. En su entorno natural, *Nostoc* sp. recibe nutrientes y protección de las plantas con las que forma asociaciones simbióticas. Esta relación puede proporcionar un microambiente óptimo que no se replica adecuadamente en condiciones de laboratorio, lo que podría explicar la falta de crecimiento en medios sólidos estándar. Investigaciones han mostrado que las cianobacterias simbióticas a menudo dependen de señales y nutrientes específicos proporcionados por sus socios simbióticos, lo que no siempre se reproduce en experimentos controlados (Devi y Parthiban, 2020; Mona et al., 2011; An et al., 2019).

Las condiciones de estrés, como la limitación de nutrientes, juegan un papel fundamental en la producción de biomasa y pigmentos. Las cianobacterias han desarrollado

mecanismos para adaptarse a condiciones de estrés mediante la producción de compuestos protectores y el ajuste de sus rutas metabólicas. La mayor concentración de pigmentos liposolubles en medios con nitrógeno sugiere una respuesta adaptativa para protegerse del daño oxidativo bajo condiciones de alta luz y estrés (Cepoi et al., 2022; Lavado-Meza et al., 2022; Mona et al., 2011). En contraste, la producción constante de pigmentos hidrosolubles puede reflejar una estrategia para mantener la eficiencia fotosintética y la captura de luz en condiciones fluctuantes.

Las curvas de crecimiento y la producción de biomasa y pigmentos están intrínsecamente relacionadas con las fases de crecimiento de las cianobacterias. Durante la fase logarítmica, el crecimiento es rápido y la demanda de nutrientes es alta, lo que se refleja en una mayor producción de biomasa. En la fase estacionaria, el crecimiento se ralentiza y las cianobacterias a menudo acumulan pigmentos y otros compuestos protectores en respuesta al estrés ambiental y a la limitación de nutrientes. Estudios sobre *Nostoc* sp. han demostrado que, en la fase estacionaria, la producción de pigmentos puede aumentar como una estrategia de adaptación (Pekkoh et al., 2022; Saini et al., 2021; Galetovic et al., 2017).

Hay un interesante estudio cuyos resultados son similares a los que se presentan aquí en términos de la evolución de biomasa seca y concentración de pigmentos hidrosolubles y liposolubles en el crecimiento *Nostoc* sp. En efecto, Touloupakis et al. (2022) encontraron que la mayor producción de biomasa seca ocurre entre los días 6 y 18 del cultivo, lo que pudo corroborarse en este estudio pese a las grandes fluctuaciones en la biomasa registradas tanto en BG11 como en BG11<sub>0</sub> a lo largo de la experimentación. En cuanto a la producción de pigmentos liposolubles (clorofila *a* y carotenoides), estos autores hallaron que su concentración máxima se alcanza durante los primeros 12 días de cultivo, con lo que haberlos alcanzado en el día 8 no se contrapone. Además, los resultados obtenidos para los pigmentos hidrosolubles (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina) son también consistentes, pues se registran para el día 13 y Touloupakis et al. (2022) afirmaron que se los alcanzaba en los primeros 15 días del cultivo.

La variación en los tiempos de máxima concentración de pigmentos liposolubles e hidrosolubles se debe a sus diferentes roles en el metabolismo y adaptación celular. Los pigmentos liposolubles son críticos para la fotosíntesis y protección antioxidante durante el rápido crecimiento inicial, mientras que los pigmentos hidrosolubles son importantes para la

adaptación y supervivencia en condiciones de estrés y limitación de nutrientes durante la fase estacionaria.

Finalmente, el control del fotoperiodo y la agitación continua en cultivos líquidos asegura una distribución uniforme de luz y nutrientes, lo que es indispensable para el crecimiento óptimo y la producción de pigmentos en *Nostoc* sp. Un fotoperiodo de 12:12 horas proporciona un equilibrio entre la fotosíntesis y los procesos de reparación celular, mientras que la agitación continua previene la sedimentación y asegura una exposición uniforme a la luz y a los nutrientes (Gupta y Rastogi, 2008a).

## 7. CONCLUSIONES

*Nostoc* sp. presenta una capacidad limitada de crecimiento en medios de cultivo sólidos, independientemente de la presencia de compuestos nitrogenados: los medios sólidos no satisfacen sus requerimientos específicos para un crecimiento óptimo, lo que podría estar relacionado con la inadecuada difusión de nutrientes o la incapacidad de colonización efectiva de superficies sólidas sin condiciones de humedad y sustrato adecuadas. Estos aspectos son fundamentales para futuras investigaciones que busquen mejorar las condiciones de cultivo de *Nostoc* sp.

No se observaron diferencias significativas en la producción de biomasa seca entre los tratamientos con y sin compuestos nitrogenados. *Nostoc* sp. tiene una capacidad inherente para fijar nitrógeno atmosférico, un rasgo adaptativo crucial que le permite crecer en ausencia de fuentes exógenas de nitrógeno, lo que subraya la resiliencia y adaptabilidad de esta cianobacteria en diferentes condiciones ambientales.

La concentración de pigmentos hidrosolubles (ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina) no varió significativamente entre los tratamientos con y sin compuestos nitrogenados en medios líquidos. Estos pigmentos desempeñan un papel esencial en la fotosíntesis y la adaptación a cambios en la disponibilidad de luz, independientemente de la disponibilidad de nitrógeno en la fase exponencial.

En contraste, la concentración de pigmentos liposolubles (clorofila *a* y carotenoides) fue mayor en los tratamientos con compuestos nitrogenados, destacando la importancia del nitrógeno en la síntesis de estos pigmentos en la fase estacionaria. Los pigmentos liposolubles son esenciales para la fotosíntesis y la protección contra el estrés oxidativo, y su mayor concentración en presencia de nitrógeno refuerza la necesidad de este elemento para una fotosíntesis eficiente y una mejor tolerancia al estrés en *Nostoc* sp.

Finalmente, el comportamiento de *Nostoc* sp. en condiciones de laboratorio puede estar influenciado por su simbiosis con plantas en su entorno natural. Las asociaciones simbióticas proporcionan un microambiente óptimo que no se replica adecuadamente en condiciones de laboratorio, lo que podría explicar la falta de crecimiento en medios sólidos estándar. Este aspecto subraya la necesidad de considerar las interacciones ecológicas de *Nostoc* sp. en futuros estudios para optimizar sus condiciones de cultivo.

En resumen, este estudio proporciona una comprensión integral de las condiciones necesarias para la producción de biomasa y pigmentos en *Nostoc* sp. a escala laboratorio. Los hallazgos subrayan la importancia de la fijación de nitrógeno y la disponibilidad de compuestos nitrogenados en la producción de pigmentos, así como la necesidad de optimizar las condiciones de cultivo para satisfacer los requerimientos específicos de estas cianobacterias. Estas conclusiones son fundamentales para el desarrollo de estrategias efectivas en la búsqueda de alternativas alimentarias sostenibles para la niñez ecuatoriana, considerando el potencial nutricional y adaptativo de *Nostoc* sp.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiyer, C., Akshai, A., Prakash Kumar, B. G. y Ramachandran, S. (2018). Optimization of macronutrient kinetics for biomass production in *Nostoc calcicola*. *IOP conference series. Materials science and engineering*, 346(8), 012028. doi.org/10.1088/1757-899x/346/1/012028
- An, Y.-J., Guo, F., Zhang, M. y Zhong, P. (2019). Investigation on characteristics of 3D printing using *Nostoc sphaeroides* biomass: Characteristics of 3D printing using

*Nostoc sphaeroides* biomass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 639–646. doi.org/10.1002/jsfa.9226

Bennett, A. y Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *J. Cell Biol.*, 58(7), 419-435. doi.org/10.1083/jcb.58.2.419

Britton, G. (1985). General carotenoids methods. *Methods Enzymol.* 111(6), 113-158. doi.org/10.1016/s0076-6879(85)11007-4

Cadena, M., Molina, D., Carvajal, A., Ontaneda, D. y Morales, E. (2013). Bioprospección de macrocolonias de *Nostoc* sp. en Los Andes ecuatorianos. *Acta Botánica Venezolana*, 36(2), 287-307. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/862/86238659013.pdf>

Celis-Plá, M., Rearte, A., Neori, A., Masojídek, J., Bonomi-Barufi, J., Álvarez-Gómez, F., Ranglová, K., Carmo da Silva, J., Abdala, R., Gómez, C., Caporgno, M., Torzillo, G., Silva Benavides, A. M., Ralph, P. J., Fávero Massocato, T., Atzmüller, R., Vega, J., Chávez, P. y Figueroa, F. L. (2021). A new approach for cultivating the cyanobacterium *Nostoc calcicola* (MACC-612) to produce biomass and bioactive compounds using a thin-layer raceway pond. *Algal Research*, 59(10), 102421. doi.org/10.1016/j.algal.2021.102421

Cepoi, L., Zinicovscaia, I., Valuta, A., Codreanu, L., Rudi, L., Chiriac, T., Yushin, N., Grozdov, D. y Peshkova, A. (2022). Peculiarities of the edaphic Cyanobacterium *Nostoc linckia* culture response and heavy metal accumulation from copper-containing multimetal systems. *Toxics*, 10(3), 113. doi.org/10.3390/toxics10030113

Devi, E. y Parthiban, R. (2020). Hydrothermal liquefaction of *Nostoc ellipsosporum* biomass grown in municipal wastewater under optimized conditions for bio-oil production. *Bioresource Technology*, 316(123943), 845. doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123943 123943.

Galetovic, A., Araya, E. y Gómez-Silva, B. (2017). Composición bioquímica y toxicidad de colonias comestibles de la cianobacteria andina *Nostoc* sp. Llayta. *Revista Chilena de Nutrición: Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología*, 44(4), 360–370. doi.org/10.4067/s0717-75182017000400360

- Gupta, K. y Rastogi, A. (2008a). Sorption and desorption studies of chromium (VI) from nonviable cyanobacterium *Nostoc muscorum* biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1–3), 347–354. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.032
- Gupta, K. y Rastogi, A. (2008b). Biosorption of lead (II) from aqueous solutions by non-living algal biomass *Oedogonium* sp. and *Nostoc* sp.—A comparative study. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*, 64(2), 170–178. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.01.019
- Gururani, N., Bhatt, D., Srivastava, A. y Srivastava, P. C. (2020). Effect of iron treatment and equilibrium pH on the kinetics of removal of some substituted phenols from synthetic wastewater onto *Nostoc* sp. biomass. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 81(10), 2140–2151. doi.org/10.2166/wst.2020.270
- Kaleem, M., Minhas, A., Hashmi, M. Z., Ali, M. A., Mahmoud, R. M., Saqib, S., Nazish, M., Zaman, W. y Samad Mumtaz, A. (2023). Biosorption of cadmium and lead by dry biomass of *Nostoc* sp. MK-11: Kinetic and isotherm study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(5), 2292. doi.org/10.3390/molecules28052292
- Kumar, M., Kulshreshtha, J. y Singh, G. P. (2011). Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. *Brazilian journal of microbiology*, 42(3), 1128–1135. doi.org/10.1590/s151783822011000300034
- Laughinghouse, D., Berthold, D., Marble, C. y Debalina S. (2019). *Biología y manejo de Nostoc (cianobacterias) en viveros*. AskIfas. Recuperado de <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/AG430> e invernaderos.
- Lavado-Meza, C., De la Cruz-Cerrón, L., Lavado-Puente, C., Angeles-Suazo, J. y Dávalos-Prado, J. (2022). Efficient lead Pb (II) removal with chemically modified *Nostoc commune* biomass. *Molecules (Basel Switzerland)*, 28(1), 268. doi.org/10.3390/molecules28010268
- Li, Z. y Guo, M. (2018). Healthy efficacy of *Nostoc commune* Vaucher. *Oncotarget*, 9(18), 14669–14679. doi.org/10.18632/oncotarget.23620
- Liang, Y., Shu, X. y Wang, W. (2022). Biochemical composition, heavy metal content and their geographic variations of the form species *Nostoc commune* across China. *Food Science and Technology*, 5(67), 21-42. doi.org/10.1590/fst.20022

- Marker, A. (1972) The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biol*, 8(7), 361-385. doi.org/10.1111/j.1365-2427.1972.tb00377.x
- Memoli, V., Santorufo, L., Santini, G., Ruggiero, G., Giarra, A., Ranieri, P., Di Natale, G., Ceccherini, T., Trifuoggi, M., Barile, R., De Marco, A. y Maisto, G. (2022). The combined role of plant cover and fire occurrence on soil properties reveals response to wildfire in the Mediterranean basin. *European Journal of Soil Biology*, 112(103430), 103430. doi.org/10.1016/j.ejsobi.2022.103430
- Méndez-Ancca, S., Pepe-Victoriano, R., Gonzales, H. H. S., Zambrano-Cabanillas, A. W., Marín Machuca, O., Rojas, J. C. Z., Maquera, M. M., Huanca, R. F., Aguilera, J. G., Zuffo, A. M. y Ratke, R. F. (2023). Physicochemical evaluation of cushuro (*Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet y Flahault) in the region of Moquegua for food purposes. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(10), 1939. doi.org/10.3390/foods12101939
- Mona, S., Kaushik, A. y Kaushik, C. P. (2011). Biosorption of reactive dye by waste biomass of *Nostoc linckia*. *Ecological Engineering*, 37(10), 1589–1594. doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.04.005
- Morales, E. (2012). *Manual de laboratorio de ficología*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Ortiz-Moreno, L., Solarte-Murillo, L. V. y Sandoval-Parra, K. X. (2020). Analysis of *Nostoc muscorum* biomass production in a hydroponic system. *Orinoquia*, 24(1), 23–31. doi.org/10.22579/20112629.599
- Pekkoh, J., Lomakool, S., Chankham, J., Duangjan, K., Thurakit, T., Phinyo, K., Ruangrit, K., Tragoolpua, Y., Pumas, C., Pathom-aree, W. y Srinuanpan, S. (2022). Maximizing biomass productivity of cyanobacterium *Nostoc* sp. through high-throughput bioprocess optimization and application in multiproduct biorefinery towards a holistic zero waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 5(78), 365-785. doi.org/10.1007/s13399-021-02285-0
- Rusydi, R., Rusydi, R., Yakupitiyage, A., Gallardo, W. G., Dabbadie, L. y Anal, A. K. (2015). Potential of *Nostoc muscorum* cultured in BG11 medium as biodiesel feedstock source: Evaluation of nutrient requirement for culture and its daily lipid content. *KnE Life Sciences*, 2(1), 103. doi.org/10.18502/cls.v1i0.93

- Saini, D. K., Rai, A., Devi, A., Pabbi, S., Chhabra, D., Chang, J.-S. y Shukla, P. (2021). A multi objective hybrid machine learning approach-based optimization for enhanced biomass and bioactive phycobiliproteins production in *Nostoc* sp. CCC-403. *Bioresource Technology*, 329(124908), 124908. doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124908
- Sand-Jensen, K. (2014). Ecophysiology of gelatinous *Nostoc* colonies: unprecedented slow growth and survival in resource-poor and harsh environments. *Annals of Botany*, 114(1), 17–33. doi.org/10.1093/aob/mcu085
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Sivaramakrishnan, R., Kamaraj, B., Lan Chi, N. T. y Cornejo, P. (2021). Cultivation of *Nostoc* sp. LS04 in municipal wastewater for biodiesel production and their deoiled biomass cellular extracts as biostimulants for *Lactuca sativa* growth improvement. *Chemosphere*, 280(130644), 130644. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130644
- Sinzinger, K., Schieder, D., Rühmann, B. y Sieber, V. (2022). Towards a cyanobacterial biorefinery: Carbohydrate fingerprint, biocomposition and enzymatic hydrolysis of *Nostoc* biomass. *Algal Research*, 65(102744), 894-965. doi.org/10.1016/j.algal.2022.102744 102744
- Temina, M., Rezankova, H., Rezanka, T. y Dembitsky, V. M. (2007). Diversity of the fatty acids of the *Nostoc* species and their statistical analysis. *Microbiological Research*, 162(4), 308-321. doi.org/10.1016/j.micres.2006.01.010
- Torres-Maza, A., Yupanqui-Bacilio, C., Castro, V., Aguirre, E., Villanueva, E. y Rodríguez, G. (2020). Comparison of the hydrocolloids *Nostoc commune* and *Nostoc sphaericum*: Drying, spectroscopy, rheology and application in nectar. *Scientia agropecuaria*, 11(4), 583–589. doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.14
- Touloupakis, E., Zittelli, G. C., Benavides, A. M. S. y Torzillo, G. (2022). Growth and photosynthetic performance of *Nostoc linckia* (formerly *N. calcicola*) cells grown in BG11 and BG110 media. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 22(4), 795–807. doi.org/10.1007/s43630-022-00353-6
- Wyman, M. y Fay, P. (1986). Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (cyanobacteria). I. Influence of light quantity.

*Proceedings of the Royal Society of London*, 227(1248), 367-380.  
doi.org/10.1098/rspb.1986.0027

Yue, S. J., Jia, S. R., Yao, J. y Dai, Y. J. (2011). Nutritional analysis of the wild and liquid suspension cultured *Nostoc* flagelliforme and antitumor effects of the extracellular polysaccharides. *Advanced materials research*, 345(89), 177–182.  
doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.345.177

Zhu, S., Xu, J., Adhikari, B., Lv, W. y Chen, H. (2023). *Nostoc sphaeroides* Cyanobacteria: a review of its nutritional characteristics and processing technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(27), 8975-8991.  
doi.org/10.1080/10408398.2022.2063251



---

**Firma de la estudiante**

Estefany Fabiana Quiroz Alvarado  
Quito, 26 de junio de 2024

---

**Firma del director/a de disertación**

PhD. Diana Astorga García  
Quito, 26 de junio de 2024

---

**Firma de la coordinadora de carrera**

PhD. Diana Astorga García  
Quito, 26 de junio de 2024